

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AGRICOLTURA,
LE FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA**

Corso di Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Vegetali – XXVI Ciclo

Approccio TILLING per il miglioramento delle caratteristiche qualitative ed agronomiche del frumento duro

(AGR/07)

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Samuela Palombieri

Firma.....

Coordinatore del corso

Prof.ssa Stefania Masci

Firma.....

Tutor

Prof. Domenico Lafiandra

Firma.....

30 Maggio 2014

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Il frumento oggi	1
1.1.1. Produttività e qualità in risposta alle esigenze globali del XXI secolo	2
1.2. Filogenesi ed organizzazione del genoma di frumento	3
1.3. Il frumento duro e le ragioni del suo successo	5
1.4. La cariosside	6
1.5. Il miglioramento genetico	7
1.5.1. La mutagenesi nel miglioramento genetico e nella genetica inversa	8
1.6. <i>Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING)</i>	9
1.6.1. Sviluppo della popolazione mutagenizzata	9
1.6.2. Preparazione dei <i>pool</i> di DNA	11
1.6.3. Sistemi di rilevamento delle mutazioni	11
1.6.3.1. <i>Analisi High Resolution Melting (HRM)</i>	13
1.6.4. Programmi bioinformatici per il TILLING	15
1.6.5. EcoTILLING	16
1.7 TILLING per il miglioramento genetico nel frumento	16
1.8. La qualità del frumento	18
1.8.1. Qualità merceologica e tecnologica	18
1.8.2. Qualità nutrizionale	19
1.8.2.1. <i>Proteine</i>	20
1.8.2.2. <i>Lipidi</i>	20
1.8.2.3. <i>Vitamine, minerali e phytochemicals</i>	21
1.8.2.4. <i>I carboidrati nella cariosside</i>	22
1.8.2.4.1. <i>Le fibre alimentari</i>	23
1.9. L'amido	24
1.9.1. Composizione chimica e struttura fisica dell'amido	25
1.9.2. I granuli di amido	26
1.10. L'importanza dell'amido nell'industria alimentare e non	27
1.11. Biosintesi dell'amido	27
1.11.2. Sintesi dell'amilosio	29
1.11.3. Sintesi dell'amilopectina	30
1.11.3.1. <i>Le amido sintasi di classe I (SSI)</i>	31
1.11.3.2. <i>Le amido sintasi di classe II (SSII)</i>	31
1.11.3.3. <i>Le amido sintasi di classe III (SSIII)</i>	32
1.11.3.4. <i>Le amido sintasi di classe IV (SSIV)</i>	32
1.11.3.5. <i>Gli enzimi di ramificazione di classe I (SBEI)</i>	33

1.11.3.6. Gli enzimi di ramificazione di classe II (<i>SBEIIa</i> e <i>SBEIIb</i>)	33
1.11.3.7. Gli enzimi di deramificazione	34
1.11.3.8. Il ruolo di altri geni nella sintesi dell'amido	36
1.11.4. Produzione ed interesse negli amidi a basso contenuto di amilosio	36
1.11.5. Produzione ed interesse negli amidi ad alto contenuto di amilosio	37
1.12. L'amido resistente	39
1.12.1. Composizione dell'amido influenzata da mutazioni naturali o indotte	40
1.13. Le rese in frumento	43
1.14. Produttività potenziale del frumento	43
1.15. Incremento della capacità fotosintetica e della sua efficienza (RUE)	44
1.16. Incremento dell'indice di raccolta (HI)	47
1.16.1.1. Numero delle cariossidi	48
1.16.1.2. Dimensione delle cariossidi	50
1.17. Il gene <i>Grain Weight 2</i> (GW2)	52
1.17.1. Geni omologhi a GW2 in mais	55
1.17.2. GW2 in frumento	55
1.18. La reazione di ubiquitinazione	58
1.18.1. La ligasi E3 di tipo RING finger	59
2. Finalità	61
3. Materiali e metodi	63
3.1. Materiali vegetali	63
3.2. Estrazione Acidi Nucleici	63
3.2.1. Estrazione DNA genomico	63
3.2.2. Estrazione RNA totale dalle cariossidi	64
3.3. Separazione degli acidi nucleici con elettroforesi su gel di agarosio	64
3.4. Metodi per l'isolamento di frammenti genici	64
3.4.1. Amplificazione PCR	64
3.4.2. Isolamento del gene <i>SBEIIa-B</i> dalla cultivar di frumento duro Svevo	65
3.4.3. Metodo per l'isolamento dei frammenti genici GW2	65
3.4.4. Disegno di oligonucleotidi allele specifici (AS-PCR) per discriminare il polimorfismo <i>In/Del</i> nella regione del promotore del gene GW2-A	66
3.4.5. Retrotrascrizione dell'RNA	67
3.4.6. Analisi d'espressione quantitativa (qRT-PCR)	67
3.4.7. Estrazione e purificazione dei frammenti di DNA da gel di agarosio	67
3.4.8. Determinazione delle sequenze nucleotidiche	68
3.5. TILLING	68
3.5.1. Generazione dei <i>pool</i> di DNA	68
3.5.2. Amplificazione allele specifici per i geni di interesse	68

3.5.3. Analisi HRM	70
3.6. HRM genotyping	71
3.7. Metodi per la determinazione delle proprietà chimico fisiche dell'amido	71
3.7.1. Isolamento e purificazione dell'amido (Dought Method)	71
3.7.2. Isolamento dei granuli di amido	72
3.7.3. Determinazione dell'amilosio	72
3.8. Programmi Bionformatici	73
3.8.1. Predizione struttura secondaria delle proteine	73
3.8.2. Analisi filogenetica della proteina GW2	73
4. Risultati	75
4.1. Costituzione della popolazione TILLING in frumento duro	75
4.2. Caratterizzazione genetica della popolazione TILLING di frumento duro	76
4.3. Identificazione di nuove varianti alleliche nei geni <i>SBEIIa</i>	76
4.3.1. Nuove varianti alleliche identificate per i due geni omeologhi <i>SBEIIa</i>	78
4.3.2. Mutazioni nonsense identificate per gli omeoalleli <i>SBEIIa-A</i> e <i>SBEIIa-B</i>	82
4.3.3. Analisi delle mutazioni nonsense e deleterie nella progenie M ₃ e nelle popolazioni segreganti	82
4.3.4. HRM <i>genotyping</i> della famiglia M ₃ segregante per la mutazione <i>SBEIIa-B</i>	83
4.3.5. Piramidizzazione delle mutazioni di interesse per <i>SBEIIa-A</i> e <i>SBEIIa-B</i>	84
4.3.6. Analisi genotipica delle popolazioni segreganti F ₂ derivanti dalla piramidizzazione delle mutazioni di interesse per <i>SBEIIa-A</i> e <i>SBEIIa-B</i>	84
4.3.7. Analisi di espressione degli omeoalleli <i>SBEIIa</i> nei genotipi singoli e doppio <i>nulli</i>	85
4.3.8. Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) dei granuli di amido delle linee mutanti di interesse	85
4.3.9. Determinazione del contenuto di amilosio nelle linee mutanti di interesse	86
4.3.10. Sequenziamento dell'allele <i>SBEIIa-B</i> nella linea SVEMS_1433	88
4.3.11. Predizione della struttura secondaria delle proteine omeologhe SVEMS_1433	89
4.4. Identificazione di nuove varianti alleliche nei geni omeologhi GW2	90
4.4.1. Isolamento dei geni GW2-A e GW2-B dalla cultivar Svevo di frumento duro	90
4.4.2. Analisi delle sequenze nucleotidiche dei due omeoalleli GW2-A e GW2-B	92
4.4.3. Caratterizzazione della proteina GW2	92
4.4.4. Analisi filogenetica della proteina GW2	95
4.4.5. TILLING	96
4.4.5.1. Sviluppo di primer allele specifici per l'analisi di TILLING	96
4.4.5.2. Produzione degli ampliconi per l'analisi High Resolution Melting	99
4.4.5.3. Nuove varianti alleliche identificate per i due omeologhi GW2	100
4.4.6. Predizione struttura secondaria delle proteine omeologhe GW2 mutate	103
4.4.7. HRM <i>genotyping</i> delle mutazioni predette deleterie nella progenie M ₄	103

4.4.8. Analisi del gene <i>GW2-A</i> nel mutante naturale Lankaodali	104
4.4.9. Disegno di un saggio di tipo PCR-MAS per l'identificazione della delezione nel promotore identificata in Lankaodali	105
4.4.10. Analisi del promotore del gene <i>GW2-A</i> in diverse specie e varietà di frumento	106
5. Discussione	107
6. Conclusioni	117
7. Bibliografia	119
Sitografia	145
Ringraziamenti	147

Riassunto

Nel presente lavoro di dottorato è stata utilizzata una nuova piattaforma TILLING di frumento duro per la selezione di linee ad alto contenuto di amilosio e di linee caratterizzate da variabilità genetica nei loci GW2, putativamente coinvolti nell'aumento delle rese.

In frumento, i geni *SBEIIa* sono stati associati a caratteristiche qualitative di interesse relative alle proprietà nutrizionali e tecnologiche delle farine. La perdita di funzione di tali geni produce un fenotipo caratterizzato da un drastico incremento del contenuto di amilosio. I frumenti *high amylose* presentano un aumento della percentuale di "amido resistente" e sono caratterizzati da una ridotta digeribilità. Tale caratteristica contribuisce alla diminuzione dell'indice glicemico degli alimenti e rappresenta una nuova opportunità nella gestione di diverse malattie legate a disturbi alimentari, molto diffuse nel mondo occidentale.

L'aumento delle rese è uno dei maggiori obiettivi nei programmi di miglioramento genetico delle specie coltivate. In particolare per il frumento, data la grande importanza agronomica che riveste, un incremento della produttività sarebbe auspicabile. Le rese rappresentano un carattere molto complesso, controllato da numerosi geni e con una forte influenza ambientale. Recenti lavori hanno dimostrato che la soppressione o la sottoregolazione dei geni *Grain Weight 2* (GW2) in riso, mais e frumento è responsabile dell'incremento della dimensione del seme e di conseguenza di un significativo aumento delle rese. Il gene GW2 codifica per una ubiquitina ligasi E3 di tipo RING implicata nella degradazione proteica attraverso la via del proteosoma 26S. La funzione di questo gene in frumento non è stata ancora pienamente compresa.

L'analisi TILLING per i due geni omeologhi *SBEIIa* ha portato complessivamente all'identificazione di 45 mutanti. Per entrambi gli omeoalleli *SBEIIa* è stata identificata una mutazione *knock-out*. La linea doppio *nulli* *SBEIIa-A-B*, ottenuta attraverso la combinazione delle due linee singolo *nulli* *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*, ha mostrato una ridotta espressione dei geni *SBEIIa*, un fenotipo caratterizzato da granuli di amido deformati e un contenuto di amilosio raddoppiato rispetto alla linea controllo. Inoltre, è stata identificata una linea mutante (SVEMS_1433) particolarmente interessante perché ha presentato in entrambi gli omeoalleli *SBEIIa* la stessa mutazione deleteria. Questa linea ha mostrato un fenotipo identico al genotipo doppio *nulli*, con granuli di amido deformati ed un contenuto di amilosio notevolmente aumentato, confermando che le mutazioni identificate hanno un effetto deleterio sulla funzionalità delle proteine *SBEIIa*. Queste linee saranno utilizzate in programmi di *breeding* allo scopo di produrre varietà commerciali di frumento duro caratterizzate da un alto contenuto di amilosio. Al fine di selezionare le mutazioni di interesse all'interno di popolazioni segreganti, è stato messo appunto un saggio di *genotyping*, utile per la *Marker Assisted Selection*, basato sull'utilizzo dell'analisi *High Resolution Melting*.

Per quanto riguarda i geni GW2, sono state identificate in totale 29 nuove varianti alleliche. Per ciascun allele è stata identificata una linea che possiede una mutazione all'interno del dominio conservato RING. In particolare, per l'allele GW2-A è stata identificata una mutazione missenso che porta al cambiamento di una delle cisteine altamente conservate ed implicate nella formazione del motivo a dita di zinco, tipico del dominio RING. Inoltre, per l'allele GW2-B è stata identificata una mutazione in uno dei siti di *splicing*, risultata deleteria per la funzionalità della proteina. La caratterizzazione dei mutanti trovati per entrambi gli omeologhi GW2 permetterà potenzialmente di comprendere la funzione di questo gene in frumento e di creare nuove linee con caratteristiche agronomiche superiori.

Oltre l'approccio TILLING, è stata ricercata variabilità genetica per i loci GW2 nella varietà di frumento tenero a seme grande Lankaodali. L'analisi delle regione del promotore del gene GW2-A ha portato all'identificazione di un polimorfismo di tipo *In/Del* che comprende la regione della TATA box ed il sito di inizio della trascrizione, putativamente responsabile di una minor espressione del gene GW2-A. Tale varietà è stata incrociata con la cultivar di frumento duro Svevo e la varietà di frumento tenero Rebelde. Al fine di discriminare per la presenza o assenza del polimorfismo è stato sviluppato un marcatore basato sulla PCR, utile in programmi di *breeding*.

Per concludere, i risultati ottenuti hanno mostrato che la popolazione TILLING di frumento duro cultivar Svevo rappresenta una valida risorsa per generare nuova variabilità genetica da utilizzare in programmi futuri di miglioramento genetico.

Abstract

In this PhD project, a new TILLING platform of durum wheat has been used for the production of lines characterized by a high amylose content and lines with novel genetic variation in the *GW2* loci, putatively involved in yield increase.

In wheat, the silencing of the *SBEIIa* genes was reported to produce a high amylose phenotype and consequent increase of starch fraction with reduced digestibility, termed “resistant-starch”. The starch digestibility is of great interest for the modulation of the glycemic index of food products and for the control of some important diet-related diseases.

The genetic improvement of grain yield in major cereals has traditionally been one of the most important contributions to an increased global food supply. Grain size is the major component of grain yield in wheat and it is a quantitative trait controlled by both major and minor genes. Different studies suggest the *Grain Weight 2* (*GW2*) is a negative regulator of grain width and weight and it is a useful locus for improvement grain yield in staple crops. The *GW2* gene encodes a RING type E3 ubiquitin ligase involved in the degradation on protein substrate through the ubiquitin-26S proteasome system. The function of this gene in wheat has not yet been fully understood.

The TILLING analysis led to the identification of 45 mutants for the two homeologous *SBEIIa* genes. A knock-out mutation was identified for both *SBEIIa* homeoalleles. The double *null* *SBEIIa-A⁻B⁻* mutant line, obtained by crossing the two single *null* *SBEIIa-A⁻* and *SBEIIa-B⁻* mutant lines, showed a reduced expression of both *SBEIIa* genes, an altered starch granule morphology and a double amylose content compared to the control line. Furthermore, the identified SVEMS_1433 mutant was of particular interest because it presented the same deleterious mutation in both *SBEIIa* homeoalleles. This mutant showed the same phenotype to the double *null* *SBEIIa-A⁻B⁻* line, with aberrant starch granules and a greatly increased amylose content, confirming that the identified mutations have a deleterious effect on the functionality of *SBEIIa* proteins. The most interesting *SBEIIa* mutant lines, identified in the present work, will be used in breeding programs in order to produce commercial lines of durum wheat characterized by a high amylose content. To follow the mutations in segregating populations, a genotyping assay, based on the High Resolution Melting analysis and useful for the Marker Assisted Selection, was developed.

Simultaneously, partial genomic sequences of both *GW2* homeoalleles (*GW2-A* and *GW2-B*) have been isolated for TILLING purposes. Screening analyses resulted in the identification of 39 new allelic variants for *GW2* homeologous genes. For each allele a line carrying a deleterious-predicted mutation in the conserved RING domain was identified. In particular, for *GW2-A* a missense mutation leading to a substitution of the highly conserved cysteine involved in the zinc finger motif formation, typical of the RING domain, has been identified. Furthermore, for the allele *GW2-B*, a knock-out mutation was also identified. The characterization of the *GW2* identified mutants pave the way for understanding the function of this gene in wheat and for developing new lines with an increased yield.

Interestingly, in addition to the TILLING approach, sequencing analyses of the *GW2* gene promoter region of the natural variety Lankadali, characterized by a higher grain size, showed a 114 bp deletion including the TATA box element and the Start Transcription Site (SST), in comparison to small seed genotypes. This variety was crossed with both the durum wheat cultivar Svevo and bread wheat cultivar Rebelde. In order to discriminate the presence or absence of the *In/Del* polymorphism, a PCR-Marker Assisted Selection assay useful in breeding programs, has been developed.

So far, our results showed that the Svevo TILLING population used in this work represents a powerful reverse valid resource to generate novel genetic variability to be used in future breeding programs of durum wheat.

1. Introduzione

1.1. Il frumento oggi

“Aumentare la produzione e la produttività in modo sostenibile in termini economici, sociali e ambientali, tenendo in considerazione la diversità delle condizioni agricole, è una delle sfide più importanti che il mondo deve affrontare oggi ” (<http://www.g20.org/en>).

In alcuni regioni del mondo, la crescita della popolazione, il cambiamento climatico e l'uso non sostenibile delle risorse naturali hanno già avuto un impatto negativo sull'approvvigionamento alimentare. In assenza di un impegno globale per costruire sistemi alimentari adattati a garantire la sicurezza alimentare, questo impatto negativo è destinato ad aumentare ed a condurci ad un deficit alimentare con conseguente denutrizione ed aumento della povertà delle popolazioni più vulnerabile.

Insieme al riso e al mais, il frumento è una delle colture essenziali per la civiltà umana. Con più di 215 milioni di ettari coltivati ogni anno (dati FAOSTAT 2012), il frumento è il cereale più diffuso in tutto il mondo, la più importante fonte di proteine, e fornisce circa il 20% delle calorie totali per il consumo umano (Braun et al. 2010). Con circa 147 milioni di tonnellate (dati FAOSTAT 2012), il commercio annuale mondiale del frumento è superiore a quello di riso e mais. Da ciò, una produzione di frumento stabile e affidabile è di fondamentale importanza per l'approvvigionamento alimentare globale. Le ragioni del suo successo sono molteplici sia dal punto di vista agronomico che qualitativo (Shewry 2009). Il frumento è una coltura che si adatta bene alle basse temperature e può essere impiegata in rotazione con altre colture quali il riso, il cotone, la soia e il mais dando agli agricoltori un'alternativa importante dal punto di vista economico ed alimentare. Inoltre, il frumento presenta un buon profilo nutrizionale ed è una fonte, oltre che di carboidrati, anche di alcuni amminoacidi essenziali, di minerali, di vitamine e di alcune sostanze associate ad effetti benefici per la salute detti *phytochemicals*. La peculiarità maggiore del frumento, tra i cereali, è però dovuta alle proprietà viscoelastiche uniche dei suoi impasti che permettono la produzione di un'ampia varietà di prodotti consumati in tutto il mondo, tra cui pane, pasta, noodles, couscous, biscotti e tanti altri prodotti alimentari. Queste proprietà dipendono dalla struttura e dalle interazioni tipiche tra le proteine di riserva della cariosside che formano la frazione proteica del glutine. Con una popolazione mondiale prevista di 9,3 miliardi nel 2050, la domanda di frumento dovrebbe aumentare del 60% rispetto al 2010. Per soddisfare questa domanda, aumenti medi di rendimento annuali devono salire dal livello attuale dell'1,1% (2001-2010) all'1,7% (2011-2050; Rosegrant e Agcaoli 2010). Pertanto è necessario un grande sforzo da parte della comunità scientifica per aumentare la produzione di frumento e la sua sostenibilità, garantendo contemporaneamente la produzione di prodotti sicuri e di alta qualità.

1.1.1. Produttività e qualità in risposta alle esigenze globali del XXI secolo

Fin dagli inizi dell'agricoltura, circa 10.000 anni fa, i cereali hanno fornito la principale fonte di calorie per la dieta umana. Diversi tipi di cereali sono stati addomesticati dagli agricoltori di tutto il mondo per le loro caratteristiche quali un alto rendimento, un buon valore nutrizionale e facilità di trasporto e di stoccaggio. Tra questi, il frumento ha avuto un ruolo particolarmente importante e a tutt'oggi è la coltura maggiormente diffusa in tutto il mondo con oltre 237 milioni di ettari. Inoltre, il frumento rappresenta una fonte proteica importantissima, seconda dopo il riso per le calorie che fornisce alla dieta alimentare. Da diversi millenni, la selezione da parte dell'uomo di caratteristiche legate alla resa ed alla qualità ha portato a significativi miglioramenti nelle varietà di frumento coltivate rispetto alle loro forme selvatiche. Grazie poi alla rivoluzione verde del 1960, con l'introduzione di caratteristiche quali lo sviluppo accelerato delle colture, il portamento ridotto, l'insensibilità al fotoperiodo e l'aumento della resistenza alle malattie, vi è stato un notevole contributo al miglioramento delle rese. Da tale periodo fino ad oggi, l'incremento medio della produzione di frumento è significativamente diminuito (Tabella 1.1), con ampie variazioni di rendimento tra paesi (<http://www.wheatinitiative.org/>). A causa della crescita della popolazione mondiale, all'aumento dei prezzi dei fertilizzanti e dei pesticidi, all'aumento dell'utilizzo delle colture per la produzione di biofuel, agli effetti negativi delle alte temperature e della siccità dovuta ai cambiamenti climatici ed infine all'urbanizzazione/erosione dei terreni agricoli, la produzione mondiale di frumento negli ultimi 15 anni non è sempre stata in grado di soddisfare la domanda globale (fonte USDA).

Tabella 1.1. Progressi nell'incremento delle rese in frumento (periodi di 10 anni) a partire dal 1960 fino ad oggi (dati FAOSTAT), ed esigenza di rese prevista per il 2050. Tratto da <http://www.wheatinitiative.org/>.

Period	Mean area harvested/yr (Mha)	Mean production/yr (Mt)	Mean production increase/yr	Mean Yield (t/ha)	Mean Yield increase/yr
1961-1970	213	278		1.3	
1971-1980	225	388	3.9%	1.7	3.2%
1981-1990	229	509	3.1%	2.2	2.9%
1991-2000	220	571	1.2%	2.6	1.7%
2001-2010	216	622	0.9%	2.9	1.1%
2050 (target)	220	1045	1.7%	4.75	1.6%

Una soluzione diretta per aumentare la produzione globale di frumento sarebbe quella di aumentare la produttività per ettaro. Tuttavia, il rendimento annuo del frumento sembra essere stagnante in molte regioni del mondo. Nonostante, a livello globale, vi sia la richiesta di varietà di frumento diverse per prodotti ed usi differenti, tutti i paesi condividono il bisogno urgente di aumentare caratteristiche come la resa e una migliore adattabilità a stress biotici ed abiotici, garantendo contemporaneamente la produzione di prodotti sicuri ad alta qualità nutrizionale. Inoltre, la tendenza nei paesi industrializzati è quella di avere alimenti che, al di là delle funzioni nutritive di base, siano in grado di apportare benefici alla salute umana e di prevenire o ridurre il rischio di malattie croniche importanti. Questa categoria di

prodotti alimentari è generalmente identificata con l'espressione di "alimenti funzionali". Il frumento, essendo significativamente presente nella dieta, costituisce un mezzo ideale per un eventuale apporto di sostanze benefiche per la salute umana.

L'uso più efficiente delle risorse genetiche rappresenta uno degli approcci più importanti per migliorare caratteristiche quali la produttività e le caratteristiche qualitative del frumento. Negli ultimi dieci anni, sviluppi nel campo della genomica, genetica molecolare e delle biotecnologie hanno fornito nuovi strumenti per il miglioramento vegetale insieme ad una migliore comprensione della fisiologia e dello sviluppo del frumento. Queste tecnologie possono essere utilizzate per accelerare i tradizionali programmi di *breeding* o introdurre nuova variabilità in frumento attraverso metodi convenzionali e non. Per il frumento sarà, infatti, necessaria una seconda rivoluzione verde per aumentare la produzione mondiale di frumento del 60% entro il 2050 (Rosegrant & Agcaoili 2010). Questo obiettivo potrà essere raggiunto soltanto con l'utilizzo delle nuove tecnologie.

1.2. Filogenesi ed organizzazione del genoma di frumento

Il frumento è un cereale appartenente alla famiglia delle Graminaceae o Poaceae. Tale famiglia comprende la tribù delle *Triticeae*, la sottotribù delle *Triticinae* a cui appartengono diversi generi e specie, tra le quali il frumento (*Triticum* ssp.). Vi sono differenti trattazioni tassonomiche e molti scienziati preferiscono distinguere tra il genere *Triticum* e il genere *Aegilops*. Al genere *Triticum* appartengono diverse specie tra cui: *Triticum monococcum* L. (genoma A^mA^m); *Triticum urartu* (genoma A^uA^u); *Triticum turgidum* L. (genoma AABB); *Triticum timopheevii* (Zhuk) Zhuk. (genoma AAGG); *Triticum aestivum* L. (genoma AABBDD) e *Triticum zhukovskyi* (genoma AAAAGG; Matsuoka 2011). Queste specie sono raggruppate in tre sezioni: Sez. Monococcon (costituito da specie diploidi); Sez. Dicoccoidea (costituito da specie tetraploidi) e Sez. Triticum (composto di specie esaploidi). Di queste specie, *T. urartu* esiste solo nella sua forma selvatica, mentre esistono *T. aestivum* e *T. zhukovskyi* solo come forme coltivate. Le altre specie, *T. monococcum*, *T. turgidum* e *T. timopheevii*, hanno sia una forma selvatica che una forma coltivata. Tutte le specie di *Triticum* sono native della Mezzaluna Fertile del Vicino Oriente, che comprende il Mediterraneo orientale, Turchia sud-orientale, il nord dell'Iraq, l'Iran occidentale e della regione Transcaucasia. Grazie ad una moltitudine di dati archeologici, morfologici genetici e citogenetici, è stato possibile tracciare la storia della dell'evoluzione dei frumenti coltivati. Fenomeni di domesticazione, ibridazione naturale seguita da eventi di allopoloidizzazione sono le forze che hanno portato alla speciazione dei vari frumenti *Triticum*.

La domesticazione è quel fenomeno attraverso il quale l'uomo ha selezionato specifici caratteri a seguito di mutazioni spontanee presenti nelle piante selvatiche (Matsuoka et al. 2011). Nel frumento uno dei caratteri essenziali, responsabile della sindrome di domesticazione, è la perdita della dispersione del seme dovuta alla fragilità della rachide; ciò impedisce al vento di disperdere le cariossidi facilitandone la raccolta. Questa caratteristica è controllata da due alleli recessivi *Brittle rachis-A1* e *Brittle rachis-B1* localizzati rispettivamente nel braccio corto dei cromosomi 3A e 3B (Watanabe et al. 2002). Un altro carattere importante per la domesticazione del frumento è stata la perdita di aderenza delle glume alla

cariosside che ha portato al frumento *free-threshing* (Figura 1.1b). Questa caratteristica è controllata da due importanti loci, *Tg* (tenacius glume) situato nel braccio corto del cromosoma 2B e 2D e *Q* situato nel braccio lungo del cromosoma 5A (Matsuoka 2011).

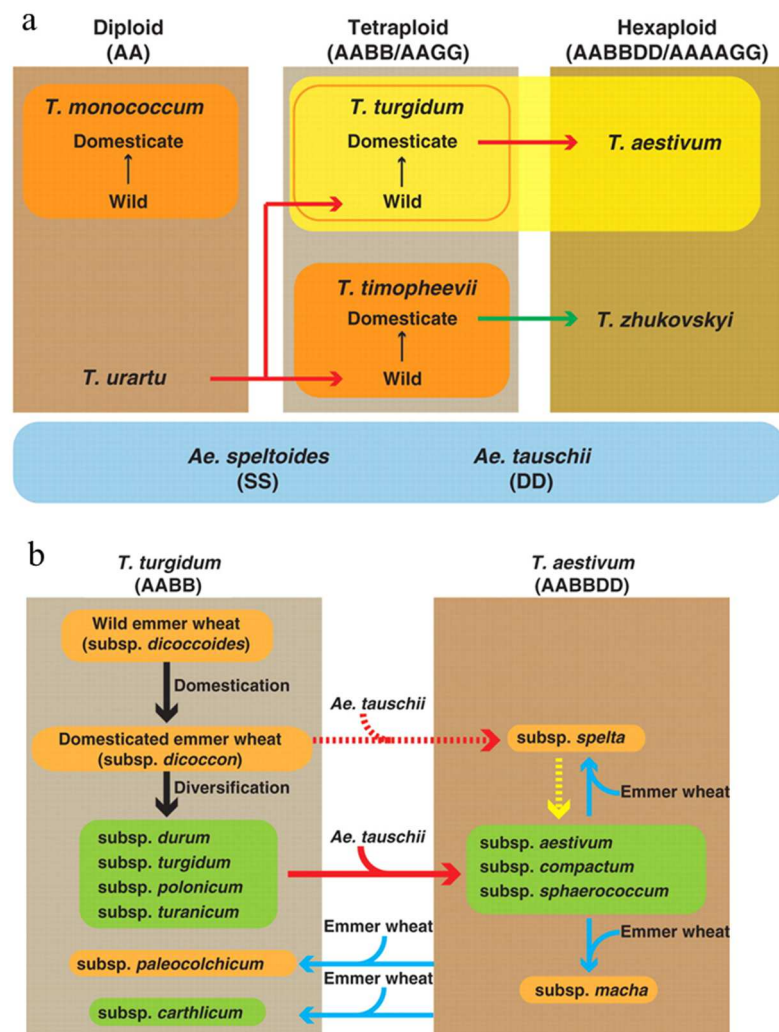


Figura 1.1. (a) Schema di diversificazione dei frumenti del genere *Triticum*. Le frecce in rosso indicano gli eventi di allopoliploidizzazione che hanno coinvolto la specie *Aegilops* mentre le frecce verdi quelli che hanno coinvolto le specie *Triticum*. La freccia verticale nera indica gli eventi di domesticazione. (b) Evoluzione *Triticum turgidum* e *Triticum aestivum*. I box arancioni e verdi indicano rispettivamente i frumenti *non-free-threshing* e *free-threshing*. Le frecce rosse e blu indicano eventi di speciazione per allopoliploidizzazione. Tratto da Matsuoka et al. 2010.

L'allopoliploidizzazione via ibridazione naturale, con le specie del genere *Aegilops* (Figura 1.1a), è stata la maggior forza che ha portato alla diversificazione durante l'evoluzione delle specie *Triticum* (Tsunewaki 2009). La specie diploide *T. monococcum*, con genoma A^mA^m, e la specie *T. urartu* con genoma A^uA^u hanno avuto un'origine monofiletica e si sono differenziate più di un milione di anni fa (Huang et al. 2002). Evidenze basate su studi morfologici, citologici e genetici, suggeriscono che, dopo la divergenza di *T. monococcum* e *T. urartu*, le specie tetraploidi con genoma AABB e AAGG (Figura 1.1a) si siano evolute meno di mezzo milione di anni fa attraverso l'ibridazione tra *T. urartu* e *Aegilops speltoides* Tausch (genoma SS). In questo processo, si ritiene siano avvenuti almeno due eventi di

ibridazione indipendente: uno associato con l'origine di *T. turgidum* (genoma AABB), e l'altro con l'origine di *T. timopheevii* (genoma AAGG) (Sarkar e Stebbins 1956; Shands e Kimber 1973; Chapman et al. 1976; Dvorak 1976; Dvorak et al. 1988, 1993; Ogihara e Tsunewaki 1988, Noda e Ge 1989; Dvorak e Zhang 1990; Huang et al. 2002; Kilian et al. 2007a).

La genesi delle specie tetraploidi ha posto le basi per un'ulteriore diversificazione attraverso la speciazione per allopoliploidia, dove attraverso l'ibridazione naturale, ha seguito il raddoppiamento cromosomico (anfiploidia), alcune centinaia di anni più tardi. Durante lo sviluppo dell'agricoltura, nella mezzaluna fertile, circa 10000 anni fa, *T. turgidum* e *T. timopheevii* sono stati domesticati e comparvero le prime forme coltivate (Feldman 2001; Salamini et al. 2002). Nella stessa area venne domesticato anche il *T. monoccoccum* (Kilian et al. 2007b).

Il *T. aestivum* (genoma AABBDD) si è formato attraverso l'ibridazione di *T. turgidum* con la specie selvatica *Aegilops tauschii* Coss. (genoma DD; Figura 1.1a; Kihara 1944, McFadden e Sears 1944). *T. zhukovskyi* (genoma AAAAGG) è nato attraverso l'ibridazione di *T. timopheevii* con il coltivato *einkorn* *T. monoccoccum* nella regione Transcaucasica. Ad oggi, sia per *T. aestivum* che per *T. zhukovskyi* non sono note forme selvatiche.

Le origini separate per le specie tetraploidi con genoma AABB e AAGG porta alla formazione di due gruppi poliploidi indicati come il gruppo *T. turgidum* (comprensiva di *T. turgidum* e *T. aestivum*) ed il gruppo *T. timopheevii* (comprensiva del *T. timopheevii* e *T. zhukovskyi*) (Matsuoka 2011). Il gruppo del *T. timopheevii* comprende la specie selvatica *ssp. araraticum*, ha distribuzione limitata e le sue cultivar sono endemiche della regione Transcaucasica. Al contrario il gruppo *T. turgidum* è ampiamente diffuso e prodotto in tutto il mondo (Matsuoka 2011).

L'alloploidia ha consentito la confluenza in un'unica pianta di genomi precedentemente adattati a condizioni ambientali differenti; questo processo è alla base della forte capacità di adattamento dei frumenti poliploidi ad ambienti molto differenti (Dubcovsky e Dvorak, 2007).

Il più importante frumento della serie degli allotetraploidi è il frumento duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum* Desf. Figura 1.1b), il cui genoma risulta omologo a quello delle specie ancestrali *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (allotetraploide selvatico) e *T. turgidum* ssp. *dicoccon* (farro medio), specie interessanti soprattutto per reintrodurre nel frumento coltivato alleli utili. Invece per la serie alloesaploide, la sottospecie più importante è quella del frumento tenero (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*) insieme ad altre specie esaploidi quali *T. aestivum* ssp. *spelta* (farro grande) e *T. aestivum* ssp. *sphaerococcum* (Figura 1.1b) (Slageren, 1994). I frumenti coltivati, quelli selvatici e le specie affini delle *Triticeae* sono incompatibili tra loro per cui, anche se con diverso grado di difficoltà, è possibile il trasferimento genico a seguito d'incrocio (Blanco et al. 1990; Monneveux et al. 2000).

1.3. Il frumento duro e le ragioni del suo successo

Il frumento duro viene coltivato in un'area pari a circa 20 milioni di ettari e la sua produzione raggiunge il 5% (circa 30 milioni di tonnellate annue) di quella del frumento tenero (dati FAOSTAT 2009). Ciò nonostante, l'importanza economica di questa coltura è molto superiore a quanto possono indicare questi

dati. La produzione del frumento duro viene, infatti, quasi totalmente impiegata per il consumo umano, ed il suo prezzo di mercato è superiore a quello del frumento tenero (dati ISMEA 2011). L'Unione Europea, seguita dal Canada, Usa ed infine dal nord Africa e Asia Occidentale (WANA, West Asia and North Africa), è tra i maggiori produttori di frumento duro al mondo. In queste regioni, l'importanza alimentare di questa coltura è testimoniata da un elevato consumo pro-capite di pasta e di prodotti tipici trasformati. Nei paesi dell'Unione Europea, la maggior parte della produzione è concentrata soprattutto in Italia ed in particolar modo nell'Italia meridionale, dove riveste un'importanza primaria per la produzione agricola e per l'industria agro-alimentare locale (dati ISMEA 2011).

Rispetto al frumento tenero, il frumento duro è meno resistente alle basse temperature e si adatta meglio ad ambienti caratterizzati da piovosità relativamente basse (tra 250 e 500 mm) e temperature elevate. La maggior parte degli ambienti dove viene coltivato vengono, infatti, definiti semi-aridi, con piovosità inferiori o uguali a 350 mm annui (Bozzini 1988). Nel bacino del Mediterraneo, l'areale di coltivazione più importante, il frumento duro è coltivato principalmente in condizioni non irrigue ed in ambienti molto diversificati ma in genere caratterizzati da una piovosità scarsa e molto variabile dove la produzione è spesso minacciata dalle condizioni di crescita estreme e dove gli stress biotici ed abiotici possono causare perdite in termini di resa e qualità.

La granella del frumento duro è di colore giallo ambrato (esistono anche forme con pericarpo da rosso a purpureo), ha un aspetto vitreo ed ha un endosperma molto più duro rispetto a quello del frumento tenero. Queste caratteristiche determinano l'idoneità del frumento duro alla molitura in semola (Flagella 2006). La semola è la principale materia prima per la produzione di pasta, couscous, burghul, altri prodotti tipici in WANA e per la produzione di pane lievitato e non nei paesi del mediterraneo. In altri paesi, il frumento duro è utilizzato per produrre un'ampia gamma di prodotti quali *chapatis* nel sub-continente indiano, pane lievitato nel Caucaso, *tortillas* e *mote* in America Meridionale e Centrale, ed in molti casi costituisce un'importante fonte alimentare. In America settentrionale, inoltre, il frumento duro è usato nella realizzazione di prodotti estrusi per colazione. La tendenza al livello mondiale è un incremento nei consumi di tali prodotti che sono un gruppo importante di cibi salutistici, bilanciati e nutritivi. In particolar modo, il consumo di pasta si sta sempre più diffondendo dall'Italia in tutto il mondo, poiché è considerata un alimento sano, facile da preparare e conservare per lunghi periodi.

1.4. La cariosside

I costituenti e la struttura stessa della cariosside del frumento duro (e più in generale dei cereali), influenzano le caratteristiche tecnologiche e nutrizionali dei relativi prodotti trasformati. Le tecniche ed i metodi impiegati per lo stoccaggio e la trasformazione condizionano in diversa misura la qualità finale ed il valore nutrizionale dei prodotti. In figura 1.2 è rappresentata la struttura della cariosside di frumento.

La cariosside è un frutto secco indeiscente, in cui i tessuti del pericarpo sono saldati con quelli del seme. Essa è costituita dall'endosperma (87-89%), dall'embrione (2-4%) e dai tegumenti o involucri (8-10%). L'embrione o germe consta di due parti principali, l'asse embrionale e lo scutello ed entra a far parte dei

sottoprodotti della molitura. L'endosperma, da cui deriva la semola, è formato da uno strato aleuronico esterno e da un parenchima interno contenente principalmente amido (65-75%; Stone e Morell 2009) e proteine di riserva. L'endosperma amidaceo contiene, inoltre, piccole percentuali di lipidi, sostanze minerali, polisaccaridi non amidacei e composti fenolici a basso peso molecolare. La crusca, una delle principali frazioni ottenute con la molitura, costituisce il 14-16% del peso della cariosside e comprende pericarpo e testa.

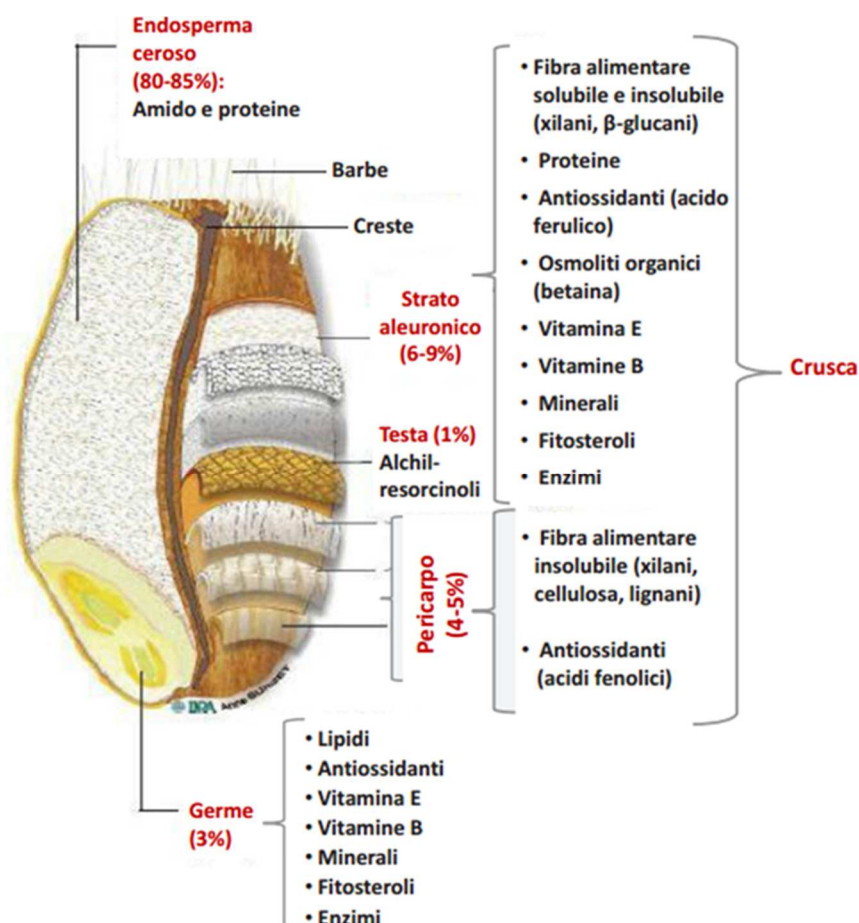


Figura 1.2. Struttura e componenti chimici della cariosside di frumento. Modificata da Surget e Barron (2005).

1.5. Il miglioramento genetico

Il miglioramento genetico delle piante ha un ruolo insostituibile nell'agricoltura moderna. Il miglioramento della qualità e l'incremento delle rese nelle varietà in commercio sono i principali obiettivi delle attività di *breeding* o selezione dei cereali. L'aumento della produttività delle varietà cerealicole rappresenta un obiettivo primario soprattutto in un'ottica di sostenibilità della produzione. I programmi di miglioramento della qualità sono focalizzati quasi esclusivamente sulle caratteristiche funzionali e tecnologiche o sulle proprietà nutrizionali dei cereali (Henry, 2004).

Per miglioramento genetico vegetale si intende il processo che permette di modificare il patrimonio genetico di una pianta al fine di migliorare le caratteristiche di cui l'uomo ha bisogno. Il miglioramento

genetico classico sfrutta la variabilità genetica, presente in natura all'interno di ogni specie o di specie affini, per indirizzarne l'evoluzione nella direzione gradita dall'uomo. Le principali fonti di variabilità sono le mutazioni, la ricombinazione genetica, l'ibridazione e la poliploidia. Tuttavia, l'approccio classico ha il limite di non poter prescindere dall'incrocio sessuale seguito da una fase di selezione per le caratteristiche desiderate. Un altro limite al miglioramento genetico classico è la disponibilità di variabilità genetica. L'enorme pressione selettiva che ha caratterizzato il frumento, dalla sua domesticazione ad oggi, ha causato una sostanziale modificazione ed impoverimento del corredo genetico rispetto a quello posseduto dai suoi progenitori selvatici.

Con lo sviluppo delle biotecnologie i ricercatori ed i miglioratori hanno a disposizione potenti mezzi per migliorare la ricerca in campo agricolo e per superare i limiti del miglioramento genetico tradizionale.

I metodi convenzionali, oggi impiegati per superare la barriera sessuale e creare nuova variabilità genetica, comprendono sia le colture in vitro (dove per il miglioramento si usano, ad esempio, la fusione di protoplasti e la variazione somaclonale, l'embriogenesi somatica) sia la mutagenesi.

I metodi non convenzionali si basano sull'uso del DNA ricombinante. Attraverso la manipolazione genetica è possibile produrre varietà transgeniche o cisgeniche, che possono contenere geni non altrimenti introducibili attraverso incrocio e selezione.

Senza dubbio l'associazione e l'uso coordinato di metodi classici e delle biotecnologie più avanzate costituisce un potente mezzo per il miglioramento genetico di specie di interesse, riducendo, notevolmente, i tempi per la realizzazione di varietà con caratteristiche superiori.

1.5.1. La mutagenesi nel miglioramento genetico e nella genetica inversa

Nel corso degli anni, la mutagenesi ha svolto un ruolo significativo nel miglioramento genetico vegetale. Attraverso questo metodo, è stato possibile realizzare nuova variabilità genetica per caratteri che controllano le caratteristiche di maggiore interesse allo scopo di creare nuove varietà che rispondano alle richieste del XXI secolo (Sikora et al. 2011; Mba 2013). Il programma congiunto della FAO-IAEA ha mostrato che, in tutto il mondo negli ultimi 40 anni, oltre 3200 varietà con una o più caratteristiche utili, sono state ottenute attraverso l'uso della mutagenesi e sono state ufficialmente rilasciate e commercializzate (FAO-IAEA, Mutant Variety Database 2013, <http://mvgs.iaea.org/AboutMutantVarieties.aspx>). In passato, la mutagenesi è stata utilizzata, per identificare i geni responsabili di un fenotipo di interesse, con un approccio di genetica classica. Tuttavia, questo approccio ha dei limiti. Per esempio, è difficile individuare un particolare fenotipo all'interno di una popolazione molto grande, inoltre, l'effetto di alcune mutazioni è mascherato dalla presenza di geni omeologhi o duplicati. In frumento, l'analisi funzionale dei geni e, di conseguenza, l'isolamento di geni responsabili di caratteristiche di interesse agronomico e qualitativo, sono stati per lungo tempo ostacolati dalla mancanza di strumenti di analisi efficienti per le specie poliploidi. Nell'ultimo ventennio, grazie in primo luogo alla disponibilità di un vasto repertorio di sequenze nucleotidiche, sono state sviluppate diverse tecnologie di genetica inversa, tra cui il TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*, McCallum et al. 2000a, 2000b), basate sulla

“inattivazione” del gene di interesse al fine di verificare il fenotipo associato e definire la funzione del gene stesso (Parry et al. 2009; Gilchrist e Haughn 2010).

1.6. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING)

Il TILLING è una tecnica di genetica inversa, che combina la mutagenesi chimica tradizionale con tecniche di screening delle mutazioni puntiformi ad alta processività in una regione genica d'interesse (Till et al. 2007). Tale metodo ha il vantaggio che è una tecnologia applicabile a numerosi organismi, con genomi di varie dimensioni, diploidi o poliploidi, omozigoti o eterozigoti, e risulta uno strumento attraente non solo per studi di genomica funzionale ma anche per applicazioni agronomiche. Il TILLING permette, infatti, un ulteriore miglioramento delle varietà già selezionate, mediante l'introduzione di nuova variabilità, senza ricorrere alle tecniche di *breeding* tradizionali o di trasformazione genetica. In particolar modo, il TILLING rappresenta uno strumento di elevato potenziale per gli studi di genomica funzionale ed il miglioramento delle coltivazioni cerealicole. La natura recalcitrante delle maggiori specie cerealicole ai processi di trasformazione e rigenerazione in vitro, causa notevoli limitazioni agli approcci di mutagenesi inserzionale e silenziamento attraverso tecnologia transgenica. Al contrario, la poliploidia di specie come il frumento comporta un'elevata capacità di tolleranza ai trattamenti di mutagenesi classica, consentendo la produzione di popolazioni ad elevata densità di mutazioni. Inoltre la mutagenesi chimica permette la produzione di numerosi varianti alleliche del gene *target* associate a diversi livelli di alterazione del fenotipo corrispondente; le nuove serie alleliche rappresentano un'opportunità sia per gli studi funzionali che per la produzione di fenotipi con caratteristiche intermedie tra il *wild-type* e il mutante *knock-out*. L'attuale atteggiamento della società e del Legislatore nei confronti delle tecnologie transgeniche, rende il TILLING una strategia di miglioramento genetico di più facile utilizzo e applicazione.

La creazione di una piattaforma TILLING consta di tre step principali (Figura 1.4):

- lo sviluppo di una popolazione mutagenizzata;
- l'estrazione del DNA e la preparazione di *pool*;
- l'analisi delle mutazioni.

1.6.1. Sviluppo della popolazione mutagenizzata

I semi sono mutagenizzati attraverso un trattamento con un agente chimico mutageno, come l'etil-metan-sulfonato (EMS), il sodio azide e l'N-metil-N-nitrosurea (MNU). L'agente mutageno ideale per il TILLING, deve indurre sostituzioni nucleotidiche casuali o piccole inserzioni/delezioni (minori di 30 nucleotidinucleotidi) con un'alta frequenza nel genoma. Per le piante, l'EMS è il mutageno utilizzato maggiormente per produrre popolazioni TILLING (Till et al. 2007). Questo agente chimico produce mutazioni puntiformi attraverso l'alchilazione di un residuo di guanina, provocando maggiormente transizioni G→A e C→T (Greene et al. 2003; Slade et al. 2005). Questo tipo di mutazione ha una probabilità relativamente alta di provocare la formazione di codoni non senso.

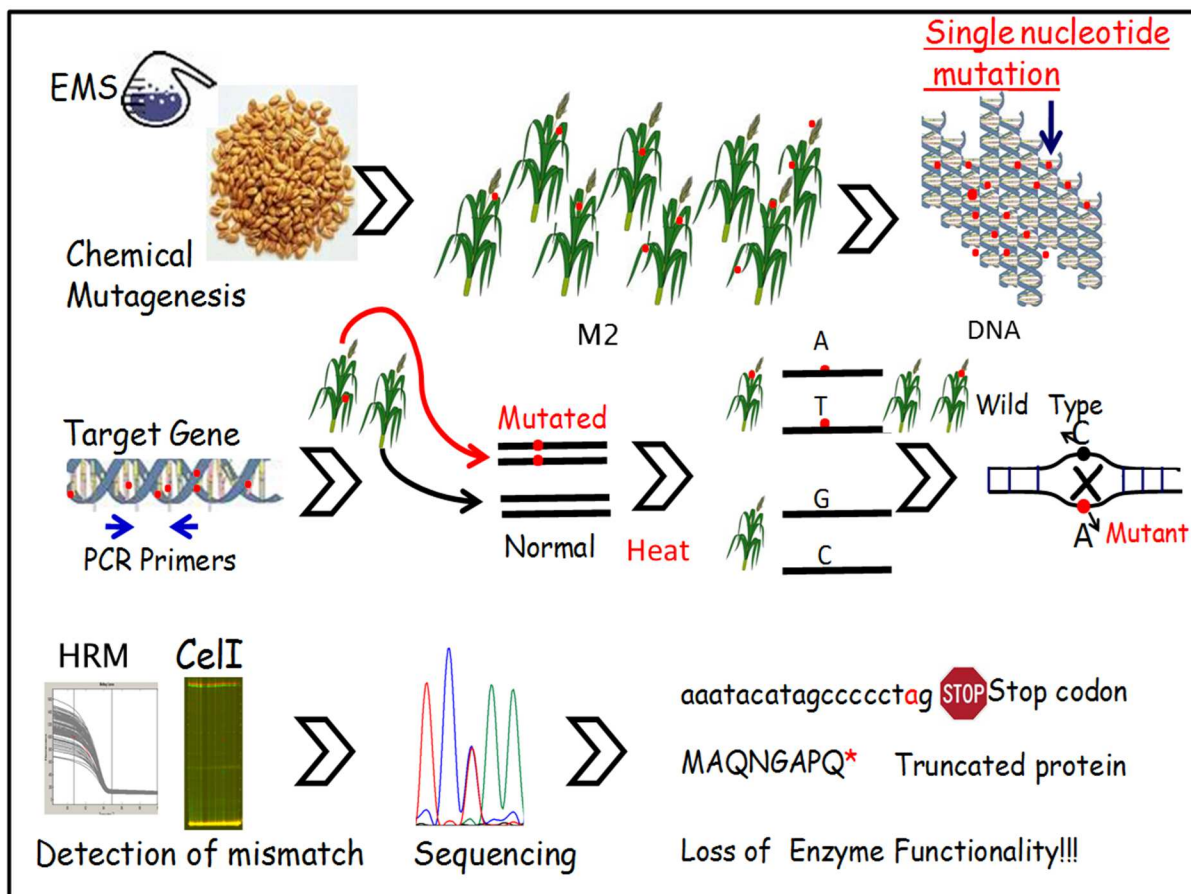


Figura 1.3. Schematizzazione della strategia TILLING.

La strategia generale per la produzione di popolazioni mutanti nei cereali prevede l'esposizione dei semi (M_0) al trattamento mutageno, seguita dall'autoimpollinazione della progenie M_1 che dà vita ai semi M_2 . Il trattamento mutageno dei semi produce piante M_1 chimeriche e la segregazione delle mutazioni avviene nella M_2 . Dalle foglie degli individui M_2 viene isolato il DNA genomico utilizzato per l'analisi delle mutazioni (Figura 1.3). Le piante M_3 vengono caratterizzate al livello fenotipico mentre i semi M_4 costituiscono la collezione dei semi della popolazione mutagenizzata, utilizzati per lo studio funzionale delle mutazioni identificate. La generazione M_3 è ancora segregante e non tutte le piante hanno le mutazioni presenti nella M_2 . Till et al. (2000) hanno utilizzato il trattamento mutageno del polline in mais. La mutagenesi applicata al polline seguita dalla sua coltura in vitro comporterebbe enormi vantaggi rispetto alla questione della fissazione delle mutazioni: sarebbe possibile ottenere mutanti omozigoti in una singola generazione (Baylan et al. 2008).

Il parametro di valutazione più rilevante per determinare la qualità di una popolazione di piante mutagenizzate è la frequenza di mutazioni indotte, presenti nel genoma dell'organismo bersaglio. Trattamenti mutageni più efficienti, in termini di densità di mutazioni indotte, richiedono la produzione di popolazioni di dimensioni inferiori con un evidente vantaggio nella gestione delle piante. L'efficacia del trattamento mutageno dipende dal dosaggio utilizzato e dal grado di ridondanza genica delle specie bersaglio (Parry et al. 2009). Per ciascun agente mutageno è opportuno ottimizzare le dosi utilizzate nel trattamento, bilanciando l'esigenza di ottenere un'elevata densità di mutazioni con la necessità di

preservare la germinabilità e la fertilità delle piante e di produrre popolazioni di dimensioni sostenibili. Popolazioni mutagenizzate sono state prodotte in tutte le maggiori specie cerealicole inclusi riso (Wu et al. 2008; Till et al. 2007; Suzuki et al. 2008), mais (Till et al. 2004), sorgo (Xin et al. 2008; Blomstedt et al. 2012), orzo (Caldwell et al. 2004; Talamè et al. 2008; Gottwald et al. 2009; Lababidi et al. 2009), avena (Chawade et al. 2010), frumento tenero (Slade et al. 2005; Dong et al. 2009a; Feiz 2009; Uauy et al. 2009; Fitzgerald et al. 2010; Sestili et al. 2010a; Chen et al. 2012) e frumento duro (Slade et al. 2005; Uauy et al. 2009; Bovina et al. 2014) (vedi tabella 1.2). Nelle specie diploidi il trattamento mutageno causa elevati livelli di sterilità; per queste specie è necessario produrre popolazioni molto grandi per raggiungere livelli saturanti di mutazioni. Al contrario, specie poliploidi come il frumento hanno un'elevata capacità di tolleranza alle mutazioni in ragione dell'effetto di compensazione svolto dai geni omeologhi (Stadler 1929); in questo caso il numero di piante mutanti necessario ad assicurare la copertura del genoma è minore. La capacità tampone delle specie poliploidi comporta la necessità di identificare alleli mutati per ciascuna copia omeologa del gene bersaglio al fine di verificare il fenotipo associato alla mutazione.

1.6.2. Preparazione dei *pool* di DNA

Nel TILLING, i metodi di identificazione delle mutazioni, si basano sulla presenza, nei prodotti PCR gene specifici, di molecole di DNA *eteroduplex*, caratterizzate dalla presenza di un mancato appaiamento nella doppia elica; il mismatch è il risultato dell'associazione, in seguito ad un ciclo di denaturazione e rinaturazione, tra le molecole di DNA a singolo filamento (ssDNA, *single strand DNA*) del *wild type* e quelle del mutante (Figura. 1.4). Per questa ragione, le amplificazioni PCR devono essere condotte su un *pool* di individui. Il DNA genomico isolato dai singoli individui della popolazione M₂ viene, quindi, miscelato in *pool* di dimensioni che, comunemente, vanno da 2 a 8 piante per singolo campione analizzato. L'aumento delle dimensioni dei *pool* favorisce il *throughput* dell'analisi ma provoca un effetto diluizione delle mutazioni presenti. In frumento l'elevata densità di mutazioni tollerata, in ragione della sua poliploidia, determina una buona efficienza dei *pool* composti da due individui in termini di numero di mutazioni rilevate in un singolo esperimento (Parry et al. 2009).

1.6.3. Sistemi di rilevamento delle mutazioni

La prima tecnica di rivelazione utilizzata nel TILLING è stata la dHPLC (*Denaturing High-Performance liquid Chromatography*), una tecnica cromatografica in grado di distinguere tra molecole *omoduplex* e *eteroduplex*. McCallum et al. (2000a) hanno utilizzato tale tecnica per l'analisi di una popolazione di *Arabidopsis* mutagenizzata con EMS. Il limite maggiore di tale metodica è il basso numero di campioni analizzabili contemporaneamente. Lo stesso gruppo di ricercatori ha messo a punto una tecnica basata sull'utilizzo di enzimi endonucleasici in grado di catalizzare una reazione di taglio specifico al 3' di un mismatch, in una molecola di DNA a doppia elica. L'enzima *CelI* appartiene alla famiglia delle nucleasi S1 che tagliano specificamente DNA a singolo filamento. Colbert et al. (2001)

hanno messo a punto un metodo che utilizza l'enzima *CelI* per identificare polimorfismi a singoli nucleotidi (SNP). In questo metodo i frammenti PCR vengono prodotti utilizzando oligonucleotidi specifici per il gene di interesse marcati con molecole fluorescenti (gli oligonucleotidi *forward* e *reverse* assorbono, rispettivamente, nell'infrarosso a 700 e 800nm). Gli ampliconi *eteroduplex*, derivanti dall'associazione tra filamenti normali e mutati, vengono digeriti dall'enzima *CelI*. I prodotti della digestione (frammento integro e i frammenti derivanti dal taglio) vengono visualizzati su gel di acrilamide (in condizioni denaturanti) attraverso il sistema LI-COR, dotato di un rivelatore di fluorescenza. Il LI-COR 4300DNA *Analyzer* è in grado di analizzare fino a 96 *pool*, 192 campioni di DNA genomico, in una sola corsa. L'utilizzo di diversi fluorofori sui due oligonucleotidi utilizzati nell'amplificazione PCR, permette di rilevare i frammenti prodotti dal taglio enzimatico in canali distinti dell'analizzatore; questa strategia fornisce la possibilità di confermare la presenza della mutazione controllando che la somma dei due frammenti equivalga alle dimensioni dell'amplicone originale. Inoltre, le dimensioni dei frammenti prodotti dal taglio forniscono un'indicazione approssimativa della posizione della mutazione all'interno dell'amplicone. Dopo l'identificazione della mutazione, in un *pool* 2x, si procede al sequenziamento dei due genotipi per determinare quale dei due sia mutante; nel caso di *pool* con dimensione maggiori è necessario un'ulteriore analisi di "re-TILLING" al fine di individuare il genotipo di interesse. Diversi gruppi hanno proposto forme modificate del metodo attraverso l'utilizzo di altri enzimi come *Surveyor/CelII* o *EndoI* per aumentarne l'affidabilità o il *throughput* (Triques et al. 2008; Voskarides e Deltas 2009; Okabe et al. 2013).

Diversi sistemi di analisi, dei frammenti derivanti dal taglio, sono stati sviluppati: dall'elettroforesi capillare (Cross et al. 2008; Suzuki et al. 2008), vantaggiosa in termini di sensibilità e livello di automazione, all'analisi su gel di agarosio, senza l'utilizzo di fluorofori, che rende il TILLING una tecnica di facile accesso (Raghavan et al. 2007).

I sistemi di rivelazione delle mutazioni basati sull'elettroforesi con gel di poliacrilamide non denaturante o gel di agarosio, non necessitano dell'utilizzo di primer marcati con molecole fluorescenti e di strumenti ad alta processività, come il LI-COR 4300DNA *Analyzer* o ABI *genetic analyzer*, che sono generalmente costosi per i singoli laboratori. Questi sistemi sono stati applicati con successo nell'analisi di mutazioni indotte da EMS (Till et al. 2004; Slade et al. 2005; Suzuki et al. 2008, Dong et al. 2009b; Uauy et al. 2009; Chen et al. 2012). La procedura di questi metodi è simile al sistema LI-COR, eccetto che per l'utilizzo di primer gene specifici, marcati con fluorofori. Un vantaggio di questi approcci è la possibilità di analizzare, con un alta sensibilità, frammenti di oltre 2 Kb in poco tempo (1-2 h) mentre per il sistema LI-COR le dimensioni ottimali degli ampliconi sono comprese tra 1,2 Kb e 1,5 Kb e l'analisi necessita di tempi più lunghi (5 h) (Chen et al. 2011; Chen et al. 2012). Inoltre, il sistema di gel di poli-acrilamide non denaturante o di agarosio, semplifica la procedura perché è possibile utilizzare strumenti disponibili in qualsiasi laboratorio di biologia molecolare di base, rendendo il TILLING una tecnica accessibile ed economica per il miglioramento delle specie coltivate o per gli studi di genomica funzionale.

Il sistema di elettroforesi su microchip (MCE[®]-202 MultiNA, Shimadzu) è una nuova strategia per l'analisi di mutazioni puntiformi in una popolazione TILLING (Chen et al. 2014). In generale, i prodotti digeriti da *Cell*, vengono separati tramite elettroforesi capillare. Le linee che presentano SNP producono nuovi frammenti nell'immagine virtuale del gel e mostrano un elettroferogramma simulato con picchi differenti. I sistemi di elettroforesi su microchip esportano una tabella di risultati, con le dimensioni (bp) e le concentrazioni (ng/ul) dei diversi frammenti, aiutando ad identificare i campioni positivi nel *pool*. I vantaggi di questo sistema sono diversi: alta sensibilità, facilità d'uso, *software* per l'analisi automatica dei dati ed elevato *throughput*. Tuttavia, il sistema di elettroforesi su microchip non è ancora largamente applicato nel TILLING; questo sistema necessita di essere ottimizzato a causa del forte rumore di fondo sugli elettroferogrammi simulati, causato da un'eccessiva sensibilità d'analisi o da prodotti aspecifici della digestione.

La drastica riduzione dei costi del sequenziamento su larga scala ha reso possibile l'utilizzo delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS, *Next Generation Sequencing*) nell'analisi TILLING. Le tecnologie NGS (Roche 454, Illumina/Solexa e ABI solid) possono essere utilizzate per identificare le mutazioni indipendentemente dalla scelta dell'agente mutageno, e possono aumentare il *throughput* del sistema riuscendo ad analizzare *pool* costituiti da 40-50 individui (Weil 2009). L'identificazione delle mutazioni negli organismi poliploidi, attraverso l'approccio di sequenziamento, risulta particolarmente efficiente perché non necessita dell'utilizzo di primer genoma specifici (Tadele et al. 2009). Attualmente, nonostante i progressi che sono stati compiuti nel migliorare il *pooling* e nell'utilizzo di pre-amplificazioni PCR dei frammenti di interesse, questa tecnica rimane ancora troppo costosa (Chen et al. 2014). Ad oggi, diversi servizi TILLING su larga scala come il Seattle TILLING Project, il Rice TILLING Project e il Maize TILLING project, hanno valutato l'utilizzo del NGS per il TILLING utilizzando le piattaforme Solexa e ABI SOLID (<http://genome.purdue.edu/maizetilling/>; <http://tilling.fhcrc.org/>). Inoltre la UC Davis TILLINGCore dispone di una piattaforma Illumina GAI e di una piattaforma Hi-seq per le analisi TILLING (http://tilling.ucdavis.edu/index.php/Main_Page). Ogni tecnica per l'identificazione delle mutazioni puntiformi presenta dei costi specifici, dei vantaggi e dei svantaggi.

1.6.3.1. Analisi High Resolution Melting (HRM)

L'analisi HRM (*High Resolution Melting*) è una tecnica ad alta processività sviluppata recentemente per lo screening delle mutazioni (Wittwer et al. 2003; Gady et al. 2009; Parry et al. 2009; Botticella et al. 2011; Bovina et al. 2014).

L'HRM non si basa sull'uso di endonucleasi di restrizione ed offre notevoli vantaggi in termini di costi e soprattutto di tempo rispetto alle tecniche utilizzate nel TILLING tradizionale. È un semplice saggio *closed-tube*, effettuato sugli ampliconi PCR e non implica alcun ulteriore processamento dei frammenti amplificati. La sensibilità e la specificità di tale metodo è migliore della tecnica dHPLC (Chou et al. 2005) e si avvicina a valori del 100% per ampliconi di dimensioni minori di 400 bp (Reed e Wittwer 2004). L'HRM risulta adatto ad analisi *high-throughput* in quanto prevede l'analisi di piastre di PCR

costituite da 96 o 384 posizioni. In questa metodologia, come nel TILLING classico, l'identificazione degli SNP è subordinata alla formazione di una molecola *eteroduplex* tra singoli filamenti di ampliconi *wild-type* (wt) e mutanti. Gli ampliconi oggetto di analisi, vengono prodotti per amplificazione PCR in presenza di concentrazioni saturanti di un fluoroforo che presenta bassa tossicità per la PCR e che si comporta da intercalante del DNA a doppio filamento (dsDNA, *double strand DNA*). Subito dopo, si procede all'analisi del profilo di *melting* (denaturazione) degli ampliconi con l'utilizzo dello strumento HRM, che permette un accurato controllo della temperatura e della fluorescenza. Il fluoroforo non interagisce con ssDNA ma si intercala nel dsDNA ed emette un segnale di fluorescenza in questa condizione. Dopo l'amplificazione PCR, lo strumento provvede al lento riscaldamento dei campioni e contemporaneamente registra la progressiva riduzione del segnale di fluorescenza causato dal rilascio della sonda da parte delle molecole di dsDNA in via di denaturazione (Wittwer et al. 2003). I dati forniti da uno strumento HRM consistono nei profili o curve di *melting* degli ampliconi analizzati che derivano dalla riduzione di fluorescenza vs l'aumento della temperatura. I frammenti PCR mutanti-*eteroduplex* mostrano un profilo di melting alterato rispetto alla sequenza *omoduplex*-wt. L'analisi HRM è risultata molto efficiente per l'identificazione di una larga varietà di SNP: transizioni (C→T, G→A e A→G); trasversioni (C→A, C→G, G→T, G→C, A→C e T→A), inserzioni e delezioni dell'ordine di dieci nucleotidi. Hofinger et al. (2009) hanno dimostrato che la sensibilità del metodo consente di utilizzare *pool* composti da almeno cinque campioni per ampliconi di dimensioni fino a 300 bp. L'applicazione di questa metodologia al TILLING offre particolari vantaggi nel caso di geni *target* caratterizzati da strutture ricche di regioni non codificanti e da un numero elevato di esoni di dimensioni limitate. In questa situazione l'utilizzo della digestione con *Cel1*, di ampliconi dell'ordine di grandezza di 1,5 Kb, implica l'identificazione di un'elevata percentuale di SNP "non funzionali" in quanto presenti nelle regioni introniche del gene. L'HRM si basa sull'analisi di frammenti di dimensioni fino a 500 bp; le amplificazioni PCR sono progettate in modo che l'amplicone copra la regione corrispondente ad un singolo esone con vantaggi in termini di tempo e di efficienza dell'analisi. In specie poliploidi, come il frumento, l'HRM prevede una strategia di Nested-PCR: la prima amplificazione PCR produce frammenti omeologhi-specifici di dimensioni elevate (fino a 2 Kb); nella seconda PCR l'amplicone della 1^a PCR viene utilizzato come stampo, da diverse coppie di oligonucleotidi specifiche per l'amplificazione degli esoni (Parry et al. 2009). Dong et al. (2009a) hanno dimostrato che in frumento tenero, l'analisi HRM, unita all'analisi di sequenza Mutation Surveyor®, è abbastanza sensibile da rilevare un singolo SNP eterozigote in un amplicone PCR contenente i tre frammenti omeologhi del gene di interesse.

L'efficienza dell'HRM dipende dalla risoluzione dello strumento utilizzato e dalla scelta del fluoroforo. Studi di confronto di diverse strumentazioni e fluorofori, riportano che il *throughput* maggiore può essere ottenuto con l'utilizzo del fluoroforo LCGreen Plus in combinazione con lo strumento Idaho Technology LightScanner (Hermann et al. 2006, 2007).

1.6.4. Programmi bioinformatici per il TILLING

L'identificazione di appropriati ampliconi è uno step importante per l'analisi TILLING. La selezione di una regione del gene *target* maggiormente idonea per l'analisi, fornisce un'alta possibilità di identificare mutazioni nonsense ed utili mutazioni missenso. La scelta di questa regione deve tener conto del tipo di gene che si sta studiando, dell'effetto dell'agente mutageno sui codoni, sui siti di *splicing* e della conservazione della sequenza della proteina codificata. Il programma bioinformatico CODDLE (*Codons Optimized to Discover Deleterious Lesions*) è uno strumento di analisi di sequenze disponibile in rete (<http://blocks.fhcrc.org/proweb/input/>) di supporto all'analisi TILLING (Till et al. 2003). Questo programma utilizza: le banche dati pubbliche di sequenze per ottenere un modello esone-introne del gene di interesse, il database Blocks (<http://bloks.fhcrc.org>) per identificare le regioni conservate della proteina codificata e, attraverso l'algoritmo Primer3 (Rozen e Skaletsky 2000), identifica i primer per amplificare il frammento maggiormente adatto all'analisi TILLING. In particolare, dopo aver dato come input la sequenza proteica o la sequenza del cDNA insieme alla sequenza genomica del gene di interesse, nell'interfaccia CODDLE si ottiene come risultato l'allineamento della proteina con le *Blocks family* dal *reverse PSI BLAST search* (Altschul et al. 1997). In questo modo sono identificati i domini della proteina conservati, si può accettare la "finestra" di *default* o personalizzare la ricerca di *blocks* di allineamento attraverso l'utilizzo di link alternativi. Dopo aver identificato l'omologia della proteina, CODDLE procede alla scelta della regione che massimizza la possibilità di trovare mutazioni missenso e nonsense.

Una volta identificate le mutazioni è necessario valutare il loro effetto sulla struttura e funzionalità della proteina. La conservazione della sequenza proteica è usata come base per valutare se una mutazione missenso ha un effetto nella proteina codificata. Il programma PARSESNP (*for Project Aligned Related Sequences and Evaluate SNPs*; <http://blocks.fhcrc.org/proweb/input/>) riporta, per ogni mutazione analizzata, la posizione all'interno della sequenza in forma grafica e numerica (Taylor e Greene 2003) ed informazioni dei siti di restrizione persi o acquisiti attraverso la mutazione, utili per gli esperimenti successivi di *genotyping*. Per ogni mutazione il programma fornisce due valori: il PSSM ed il SIFT.

Per ogni mutazione missenso, l'amminoacido osservato ed il potenziale amminoacido missenso-mutato vengono confrontati alla *Position Specific Scoring Matrix* (PSSM) per il blocco di riferimento in quella posizione. La differenza è calcolata tra il punteggio PSSM dell'amminoacido osservato e il punteggio PSSM della possibile variazione missenso. Mutazioni con un valore di PSSM >10 indicano che il cambiamento amminoacidico è putativamente non tollerato per la funzionalità della proteina.

Il valore SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) predice, con un'accuratezza del 75%, se una sostituzione amminoacidica è deleteria o meno per la funzionalità dell'enzima (Ng e Henikoff 2003). Il programma SIFT considera la posizione alla quale avviene il cambiamento ed il tipo di amminoacido che cambia, allineando la sequenza proteica di interesse con sequenze in banca dati. Per valori di SIFT < 0,05 il cambiamento amminoacidico è predetto non tollerato dalla proteina.

1.6.5. EcoTILLING

L'Eco-TILLING rappresenta un'estensione della strategia di TILLING applicata all'analisi dei polimorfismi SNP presenti nelle popolazioni naturali (Comai et al. 2004). La tecnologia è la stessa utilizzata nel TILLING eccetto che per la strategia di *pooling* del DNA: gli individui da analizzare vengono mescolati in rapporto 1:1 con il campione di riferimento (Chen et al. 2011). L'ecoTILLING fornisce un metodo rapido, economico e preciso per individuare nelle popolazioni naturali, aplotipi diversi nei geni d'interesse. Il vantaggio di questo approccio risiede nel fatto che la caratterizzazione delle serie alleliche e la scoperta di nuovi varianti alleliche prevede il sequenziamento solo degli aplotipi individuati con l'analisi di TILLING. L'EcoTILLING è stato utilizzato in diverse applicazioni tra cui: studi sulla diversità della popolazione in *Arabidopsis*, riso e patata (Comai et al. 2004; Kadaru et al. 2006; Elias et al. 2009); analisi delle variazioni alleliche dei geni *Pina* e *Pinb* per identificare nuovi alleli da utilizzare in programmi di *breeding* per la durezza della cariosside in frumento (Wang et al. 2008a); analisi di associazione per identificare varianti alleliche che controllano la suscettibilità nel melone e la resistenza alla siccità in riso (Nieto et al. 2007; Yu et al. 2012).

1.7 TILLING per il miglioramento genetico nel frumento

Negli ultimi 10 anni i progressi compiuti nel sequenziamento del genoma, la disponibilità delle sequenze dei geni e lo sviluppo di nuove tecniche, hanno notevolmente aumentato l'utilizzo di approcci di genetica inversa per studiare la funzione del gene, per associare un fenotipo ad una sequenza nota o per programmi di miglioramento genetico in specie di interesse. Ad oggi la tecnica TILLING è stata ampiamente usata in frumento duro e tenero e, più recentemente, in specie diploidi come *T. monococcum*, fornendo quindi una risorsa disponibile sia per studi funzionali sia per programmi di miglioramento genetico vegetale (Tabella 1.2). Infine un vantaggio molto importante del TILLING è che non crea organismi geneticamente modificati. Infatti, l'applicazione di tali organismi non è stata ancora accettata, ed è tutt'oggi soggetta a polemiche e critiche da parte della società e dalle istituzioni pubbliche. Inoltre, il transgene presenta dei limiti in termini di stabilità ed efficienza mentre il TILLING crea mutazioni puntiformi permanenti che risultano essere precise ed efficienti per lo studio dei geni di interesse.

I primi ad usare la tecnica TILLING come strumento per migliorare le caratteristiche qualitative del frumento sono stati Slade e colleghi (2005), producendo una linea di frumento tenero *waxy*, combinando le tre mutazioni nulle nei loci *Wx-A1*, *Wx-B1* e *Wx-D1*. I semi della nuova linea triplo mutante mostrarono cariossidi con fenotipo *waxy* e con un basso contenuto di amilosio.

Recentemente il TILLING è stato utilizzato con successo in frumento duro e tenero per modificare caratteri di interesse, come le proprietà dell'amido (Slade et al. 2005; Dong et al. 2009a; Uauy et al. 2009; Sestili et al. 2010a; Botticella et al. 2011; Bovina et al. 2013), la durezza della cariosside (Dong et al. 2009a) e la composizione della lignina (Rawat et al. 2012).

Tabella 1.2. TILLING in frumento.

Specie	Dimensione della popolazione	Frequenza di mutazioni	Geni Bersaglio	Metodi di rivelamento degli SNP	Bibliografia
<i>T. aestivum</i> cv Express	10000	1/24 kb	<i>GBSSI</i>	LI-COR	Slade et al. 2005
<i>T. durum</i> cv Kronos	8000	1/40 kb	<i>GBSSI</i>	LI-COR	Slade et al. 2005
<i>T. aestivum</i> cv QAL2000	869	1/29 kb	<i>GBSSI, Pina, Pinb</i>	Digestione <i>Cel1</i> e gel d'agarosio	Dong et al. 2009a
<i>T. aestivum</i> cv Ventura	1168	1/33 kb	<i>GBSSI</i>	Digestione <i>Cel1</i> e gel d'agarosio	Dong et al. 2009a
<i>T. durum</i> cv Cham1	4500	1/52 kb	<i>RCA-A1</i>	LI-COR	Parry et al. 2009
<i>T. aestivum</i> cv Cadenza	4500	1/40 kb	<i>GAox20; SSIIa; SBEIIa</i>	LI-COR HRM	Phillips et al. unpubl.; Sestili et al. 2010a; Botticella et al. 2011
<i>T. aestivum</i> UC1041+Gpc-B1/Yr36	1536	1/38 kb	<i>SBEIIa</i> ,; <i>WKS</i>	Digestione <i>Cel1</i> e gel d'agarosio	Uauy et al. 2009
<i>T. durum</i> cv Kronos	1368	1/51 kb; 1/68	<i>SBEIIa</i> , <i>WKS</i> ; <i>SBEIIb</i>	Digestione <i>Cel1</i> e gel d'agarosio	Uauy et al. 2009 Hazard et al. 2012
<i>T. aestivum</i> cv Alpowa	630	1/13	<i>Pina</i> ; <i>Pinb</i>	Sequenziamento diretto	Feiz al. 2009
<i>T. aestivum</i> cv Chara	4500	1/84	<i>TaPFT1</i>	Medoto sonda	Fitzgerald et al. 2010
<i>T. monococcum</i>	1532	1/92 kb	<i>PAL, HCT, COMT1, GBSSI</i>	Digestione <i>Cel1</i> e gel d'agarosio	Rawat et al. 2012
<i>T. aestivum</i> cv 'Jinmai 47	2610	1/34; 1/47 kb	<i>Ppd-D1, Rubisco activase A; Rubisco activase B</i>	Digestione <i>Cel1</i> e gel d'agarosio	Chen et al. 2012
<i>T. aestivum</i> cv Jagger	518	1/22 kb	<i>PAL, HCT, COMT1, GBSSI</i>	Digestione <i>Cel1</i> e gel d'agarosio	Gill et al. unpubl.
<i>T. durum</i> cv Svevo	4000	1/47 kb	<i>SBEIIa</i>	HRM	Bovina et al. 2014.

1.8. La qualità del frumento

La qualità del frumento è un concetto complesso che investe molteplici soggetti coinvolti nelle diverse fasi della filiera produttiva (agricoltori, società sementiere, industria molitoria, industria di trasformazione e consumatori; Troccoli et al. 2000). Inoltre, l'enorme varietà di prodotti derivati dal frumento e la loro diffusione in paesi diversi, hanno prodotto come conseguenza la necessità di definire la qualità in relazione allo specifico prodotto e alle preferenze dei consumatori (Flagella 2006). La qualità, quindi, si conferma un concetto dinamico; profondamente influenzato dalle innovazioni tecnologiche e dalle abitudini alimentari. La qualità del frumento duro è determinata dalle caratteristiche genetiche delle varietà e dalle condizioni ambientali ed influenza direttamente la qualità dei prodotti trasformati. L'aumento delle rese, il contenuto proteico, la qualità del glutine, l'indice di giallo della semola, la resa molitoria insieme alla resistenza a stress biotici, sono sempre stati i principali obiettivi del miglioramento genetico del frumento duro. Più recentemente, il miglioramento delle caratteristiche nutrizionali sta diventando sempre più importante a causa della crescente attenzione dei consumatori di tutto il mondo, in una società ormai predominata da malattie correlate ad una cattiva alimentazione.

1.8.1. Qualità merceologica e tecnologica

La qualità tecnologica è strettamente correlata alla qualità merceologica e considera la predisposizione delle materie prime (granella e sfarinati) a subire processi di trasformazione ottimali e standardizzati.

La qualità merceologica è riferita alla granella ed è correlata ai requisiti che riguardano i processi di compravendita. Le variabili che maggiormente concorrono a determinare la qualità merceologica sono influenzate prevalentemente dal contesto climatico e dalle scelte colturali (varietà impiegata, concimazione etc.), quindi dalla potenzialità e stabilità produttiva (Flagella et al. 2006).

Le caratteristiche che determinano l'idoneità del frumento alla molitura in semola e alla successiva trasformazione del prodotto finale sono la dimensione della cariosside, il peso ettolitrico, il grado di umidità, il contenuto in ceneri, la presenza di bianconatura e volpatura, l'indice di giallo e il contenuto proteico.

Per peso elettrolitico si intende il peso in chilogrammi di un ettolitro di frumento (kg/hl) ed è un fattore estremamente significativo per giudicare il valore merceologico e commerciale del prodotto. Un elevato peso ettolitrico è associato ad un'alta resa in semola che nel processo di molitura commerciale si aggira attorno al 65%-70% (Flagella et al. 2006).

La presenza di ceneri nella semola è indice di contaminazione da parte degli strati periferici della cariosside ed in molti Paesi il limite massimo è stabilito per legge. In Italia la legge stabilisce che la semola deve avere un contenuto in ceneri inferiore allo 0,90% su 100 parti di sostanza secca (legge 580/67; D.M. 26/4/02). La legge definisce anche un limite per l'umidità della granella che non deve superare il 14,50%.

Fenomeni come bianconatura e volpatura influenzano negativamente la resa in semola, la quale rappresenta un carattere importante richiesto per un buon livello merceologico del frumento. La

bianconatura delle cariossidi si ha quando l'endosperma non è completamente vitreo ma presenta delle zone a consistenza farinosa ed è causata da squilibri nella nutrizione azotata (Flagella 2006). La tolleranza relativa alla percentuale di bianconatura, entro la quale non si ricorre a detrazioni, è del 20% e una partita di frumento è accettata qualora il valore non superi il 40%. La volpatura, invece, consiste in macchie scure nell'embrione o in altre parti della cariosside ed è dovuta ad attacchi di patogeni quali *Bipolaris* spp. *Cladosporium* spp. e da *Alternaria* spp, o da eventi biochimici che comportano la produzione di acido ferulico in maturazione (Kaan et al.1988).

Un altro importante carattere qualitativo è rappresentato dall'indice di giallo (*YI, yellow Index*) (CIE 1986) della semola che deve avere un colore brillante dovuto ad un elevato contenuto in carotenoidi. In particolare, nel frumento duro, sono presenti principalmente pigmenti gialli come xantofille e carotene (Ficco et al. 2014). Il relativo contenuto di questi composti nella semola conferisce un colore giallo brillante alla pasta gradito ai consumatori. L'indice di giallo del frumento duro e dei prodotti derivati, non è influenzato soltanto dalla biosintesi dei carotenoidi nella cariosside (Hentschel et al. 2002; Panfili et al. 2004) ma anche dalla loro degradazione durante il processo di trasformazione. La degradazione è dovuta principalmente ad enzimi ossidativi che sono responsabili del processo di sbiancamento e scurimento che avviene durante la produzione di pasta (Borrelli et al. 1999; Trono et al. 1999; Dexter e Marchylo 2000; Feillet et al. 2000; Hessler et al.2002). Il contenuto dei carotenoidi è considerato uno dei principali criteri per determinare il valore nutrizionale e commerciale dei prodotti a base di pasta, quindi la prevenzione dell'attività lipossigenasica è un importante obiettivo da perseguire.

Inoltre la semola, che in Italia per il 90 % è destinata alla produzione di pasta alimentare, deve presentare un elevato contenuto in glutine le cui caratteristiche ne influenzano le proprietà reologiche e quindi l'attitudine alla trasformazione. Il glutine è la frazione proteica più abbondante e consiste in una miscela complessa di glutenine e gliadine. Questi due gruppi di proteine differiscono sia nella struttura che nelle proprietà in quanto le glutenine sono responsabili della viscoelasticità del glutine, mentre le gliadine della sua plasticità e quindi dell'estensibilità degli impasti. In particolare, le caratteristiche reologiche del glutine sono strettamente collegate alla quantità delle glutenine e alla presenza di determinate subunità che migliorano l'elasticità e la forza dell'impasto (Pogna et al. 1988). La frazione gluteninica, si divide in *High Molecular Weight* (HMW-GS) e *Low Molecular Weight* (LMW-GS). Quest'ultime sono glutenine a basso peso molecolare e rappresentano i fattori determinanti della qualità delle semole di frumento duro. Proprio nel frumento duro sono state identificate due varianti alleliche delle LMW-GS, la variante LMW-1 e la variante LMW-2 che comprendono più subunità gluteniniche. Le varietà che possiedono le LMW-2 risultano avere caratteristiche qualitative (pastificabilità) superiori rispetto alle varietà che contengono le LMW-1 (Pogna et al. 1988).

1.8.2. Qualità nutrizionale

Il frumento ha un valore nutrizionale estremamente importante in quanto è una delle specie maggiormente coltivata come alimento di base e costituisce la maggior fonte di carboidrati nell'alimentazione umana (Shewry et al. 2009). Il largo consumo di alimenti derivati da farine o semole

di frumento ne determina l'importanza anche come fonte di principi nutritivi rappresentati in minore percentuale nella cariosside quali proteine, fibre, micronutrienti e vitamine. È necessario inoltre sottolineare che la relazione tra la compartimentazione della cariosside e dei suoi costituenti (Figura 1.2) e i processi di trasformazione che essa subisce nell'industria alimentare, influenzano fortemente il profilo nutrizionale dei prodotti derivati. Vitamine, sostanze antiossidanti, minerali e proteine ricche in lisina sono presenti in percentuali apprezzabili nel germe e negli strati esterni della cariosside, frazioni rimosse durante la molitura con un guadagno nella palatabilità e una perdita nel valore nutritivo dei prodotti derivati. Tali considerazioni sono alcune delle ragioni alla base del rinnovato interesse per i cereali integrali o *whole grain*. Il frumento, il riso, ed altri cereali sono alimenti di base per le popolazioni di tutto il mondo e per questo motivo sono considerati veicoli ideali per fornire importanti nutrienti a costi relativamente bassi. Attraverso il miglioramento genetico, sfruttando la variazione naturale o attraverso approcci non tradizionali come la mutagenesi e la trasformazione genetica, è possibile aumentare il valore nutrizionale delle varie specie cerealicole (Shewry et al. 2012).

1.8.2.1. *Proteine*

Shewry e Halford (2002) hanno riportato che l'apporto proteico derivato dai cereali, sia nell'alimentazione umana che animale, è circa tre volte superiore a quello derivato dai legumi, caratterizzati da un contenuto proteico significativamente maggiore. Una caratteristica negativa delle proteine del frumento, e dei cereali più in generale, è rappresentata dalla carenza in alcuni amminoacidi essenziali come la lisina ed il triptofano. La selezione di varietà ricche in glutenine, proteine povere in lisina, ha avuto come conseguenza un ulteriore impoverimento in questo amminoacido essenziale. Una corretta valutazione del valore nutrizionale delle proteine di frumento deve considerare la misura in cui la deficienza in lisina sia compensata attraverso altre fonti (Bailey e Clark 1976). Inoltre, l'apporto di lisina derivante dal frumento è sufficiente per le esigenze di un adulto, al contrario non lo è per i bambini (Dewettinck et al. 2008). Diverse strategie vengono utilizzate per aumentare il contenuto di amminoacidi essenziali nei cereali come la modificazione della sequenza delle proteine, la produzione di proteine sintetiche e l'alterazione delle vie biosintetiche allo scopo di favorire l'accumulo degli amminoacidi desiderati (Sun e Liu 2004).

1.8.2.2. *Lipidi*

I cereali sono poveri in lipidi. La cariosside di frumento è costituita da lipidi per una percentuale dell'1, 5-2%. Il frumento è ricco in alcuni acidi grassi essenziali per la dieta quali acido linoleico e linolenico. I lipidi polari, derivati dalla parete cellulare, essenzialmente glicolipidi e fosfolipidi, possono contribuire a ridurre l'assorbimento del colesterolo ed in generale migliorare l'ambiente del tratto digestivo inferiore (Sugawara e Miyazawa 2001). L'importanza dei lipidi nei prodotti derivati da frumento dipende dal tipo di processamento adottato in fase molitoria (*wholegrain* vs farina). Recentemente la tecnologia alimentare è orientata alla messa punta di nuove tecniche di processamento, sia nella fase molitoria che

di impasto, adatte all'integrazione di frazioni della cariosside, quali il germe e l'aleurone, ricche in costituenti minori quali i lipidi e alcuni micronutrienti.

1.8.2.3. *Vitamine, minerali e phytochemicals*

A livello nutrizionale, le frazioni di crusca e germe derivate dalla molitura convenzionale, forniscono la maggioranza dei composti biologicamente attivi della granella. L'elevato valore nutrizionale e salutistico è dovuto un elevato contenuto in vitamine del gruppo B (tiamina, niacina, riboflavina ed acido pantotenico), a minerali (selenio, calcio, magnesio, potassio, fosforo, sodio e ferro), a composti antiossidanti (composti fenolici, tocoli e carotenoidi) e ad altri componenti (amminoacidi essenziali e fibre alimentari). La maggior parte di queste frazioni vengono rimosse durante la molitura con un guadagno nella palatabilità ed una perdita nel valore nutritivo dei prodotti derivati. Tali considerazioni sono alcune delle ragioni alla base del rinnovato interesse per i cereali integrali.

Nel programma europeo HEALTHGRAIN è stata analizzata la variazione genetica di questi componenti benefici per la salute in diverse varietà di frumento (Shewry e et al. 2012). I diversi composti sono influenzati dalla componente ambientale ma mostrano anche una componente ereditaria (Figura 1.4). Questo permette, attraverso il miglioramento genetico, di aumentare il valore nutrizionale del frumento (Shewry et al. 2012). Il frumento è inoltre una discreta fonte di biotina (10-100µg/100g) e di acido folico (30-90µg/100g). Essendo povero in lipidi esso tende ad essere povero in vitamine liposolubili quali, A, D, e K ma contiene valori apprezzabili di vitamina E (25 µg/g) (Dewettinck et al. 2008). Studi di laboratorio hanno dimostrato che i cereali integrali per colazione hanno un contenuto di antiossidanti simile a quello di frutta e verdura (Miller et al. 2000). Pur essendo presenti in piccole quantità, sostanze bioattive quali i flavonoidi suscitano notevole interesse da parte dei soggetti coinvolti nella produzione di alimenti a base di frumento. I cereali sono inoltre considerati una discreta fonte di fitoestrogeni, in particolare i lignani, che svolgono un ruolo di prevenzione di alcuni tipi di cancro negli adulti.

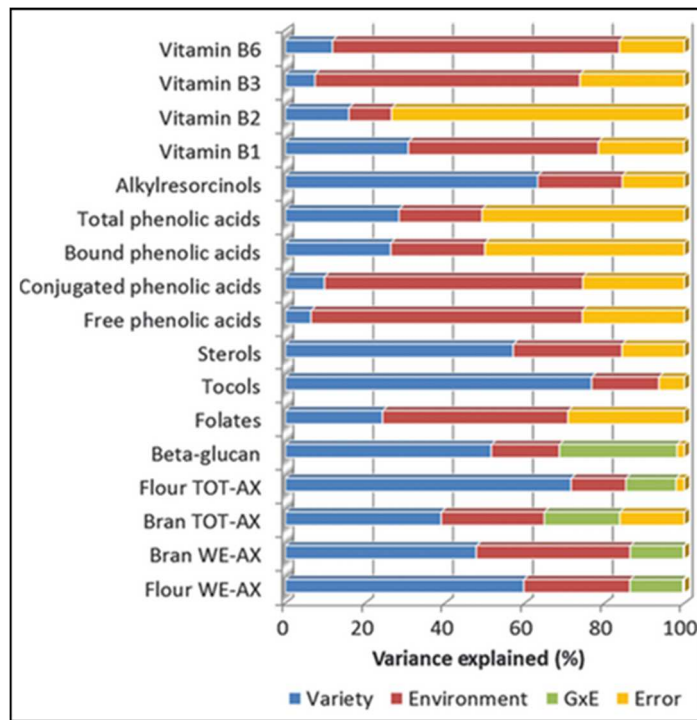


Figura 1.4. Influenza della varietà e della componente ambientale sul contenuto di fibre e *phytochemicals*. Blu, varietà; rosso, componente ambientale; verde, interazione genotipo x ambiente; giallo, errore. Tratto da Shewry e Ward (2012).

1.8.2.4. I carboidrati nella cariosside

I carboidrati rappresentano la maggior componente della granella di frumento e possono essere classificati in base alla loro dimensione molecolare e al grado di polimerizzazione, con ogni gruppo suddiviso secondo il numero e la composizione di unità monosaccaridi. La classificazione include zuccheri (monosaccaridi e disaccaridi), oligosaccaridi, amido (amilopectina ed amilosio) e polisaccaridi non amidacei (NSP, *non-starch polysaccharides*). I carboidrati possono anche essere suddivisi in base al tipo di processamento che subiscono nell'apparato digerente umano (Dewettick et al. 2008). L'amido (non resistente) e gli zuccheri solubili vengono digeriti e assorbiti dall'uomo. Al contrario le fibre alimentari, che comprendono i NSP e gli oligosaccaridi, presentano dei legami nella struttura dei polisaccaridi e dei monosaccaridi diversi dal glucosio, che li rendono completamente resistenti alla digestione (Southgate 1991). Gli NSP, inoltre, vengono classicamente suddivise in solubili e non solubili.

L'amido, invece, in base alle caratteristiche nutrizionali è stato definito come "glicemico" o "resistente". Gli amidi "glicemici" sono quelli che vengono idrolizzati a unità di glucosio nel tratto digestivo e possono essere *Rapidly Digestible Starch* (RDS) o *Slowly Digestible Starch* (SDS). Gli amidi RDS vengono rapidamente idrolizzati a glucosio nell'intestino tenue in circa 20 minuti e si trovano in cibi appena cotti, come pane o patate, dove la rottura dei granuli rende l'amido facilmente accessibile agli enzimi digestivi. La categoria SDS comprende amidi la cui digestione dura tra i 20 e 110 min ed è completa; essi si trovano nei cereali sotto forma di granuli o come amido retrogradato (Sharma et al. 2008).

1.8.2.4.1. *Le fibre alimentari*

Le fibre alimentari hanno notevoli effetti per la salute, compresa la riduzione del rischio di malattie cardiovascolari, migliorano la glicemia e la sensibilità al glucosio, aiutano il controllo del peso, migliorano la salute intestinale e riducono il rischio di alcune forme di cancro (Figura 2.2, Anderson et al. 2009; Howarth et al. 2001; Slavin 2004). Nelle diete a base di cereali, come il frumento, questi benefici sono associati con il consumo di prodotti integrali, in cui sono conservati gli strati di crusca ricca di fibre. La farina integrale contiene il 10-15% di fibra rispetto al 3% della farina bianca. I principali carboidrati che compongono la fibra alimentare nei cereali sono polisaccaridi non amidacei (NSP) delle pareti cellulari, principalmente arabinosilani (AX) e 1-3,1-4- β -D-glucano (β -glucani), amido resistente (RS), oligosaccaridi, alcuni poliooli ed amidi modificati. Le fibre alimentari non vengono digerite ed assorbite nell'intestino tenue ma arrivano intatte al colon dove vengono utilizzate come substrato per la fermentazione batterica (Figura 1.5). Uno degli effetti benefici delle fibre è la capacità di ridurre la risposta glicemica degli alimenti in cui sono presenti. Infatti, cibi ricchi di fibra rilasciano lentamente il glucosio nel sangue, prevenendo dei disturbi come l'obesità ed il diabete (Figura 1.5; Nugent 2005).

Le fibre alimentari, sono classicamente distinte in solubili e non solubili, classificazione importante per alcuni interessanti effetti fisiologici. Il frumento è ricco in fibre insolubili alle quali è stato attribuito un ruolo maggiore nella prevenzione e cura della stipsi e patologie correlate. Diversi studi hanno dimostrato che tale effetto fisiologico è dose-dipendente ed è dovuto esclusivamente alla “presenza fisica” delle fibre che determina un aumento della massa fecale e ne velocizza il transito intestinale (Aldoori et al. 1998). I NSP solubili e di tipo viscoso, presenti sia nelle materie prime o incorporati come ingredienti, sono in grado di ridurre il glucosio e la risposta insulinica post-prandiale. Questo effetto è dovuto all'aumento di viscosità, che inibisce la miscelazione e la diffusione nel tratto intestinale e ritarda lo svuotamento gastrico. È stato dimostrato che una riduzione di viscosità delle fibre, ottenuta attraverso l'idrolisi acida, porta ad una perdita della loro efficacia clinica (Riccardi et al. 2004). Le fibre alimentari presenti nei cereali influenzano l'assorbimento intestinale di altri macronutrienti, come ad esempio i lipidi, anche se non vi sono evidenze significative sull'effetto negli esseri umani. I β -glucani dei cereali mostrano un effetto di riduzione del colesterolo sui lipidi plasmatici simile a quello di altri tipi di fibre solubili (Poli et al. 2008). Anche se, gli effetti benefici per la salute nelle diete a base di cereali potrebbero essere migliorati aumentando la percentuale di prodotti integrali, questa strategia è difficile da raggiungere per diversi motivi, tra cui la bassa accettabilità per i consumatori, l'aumento dei costi e gli effetti negativi sulla qualità della lavorazione.

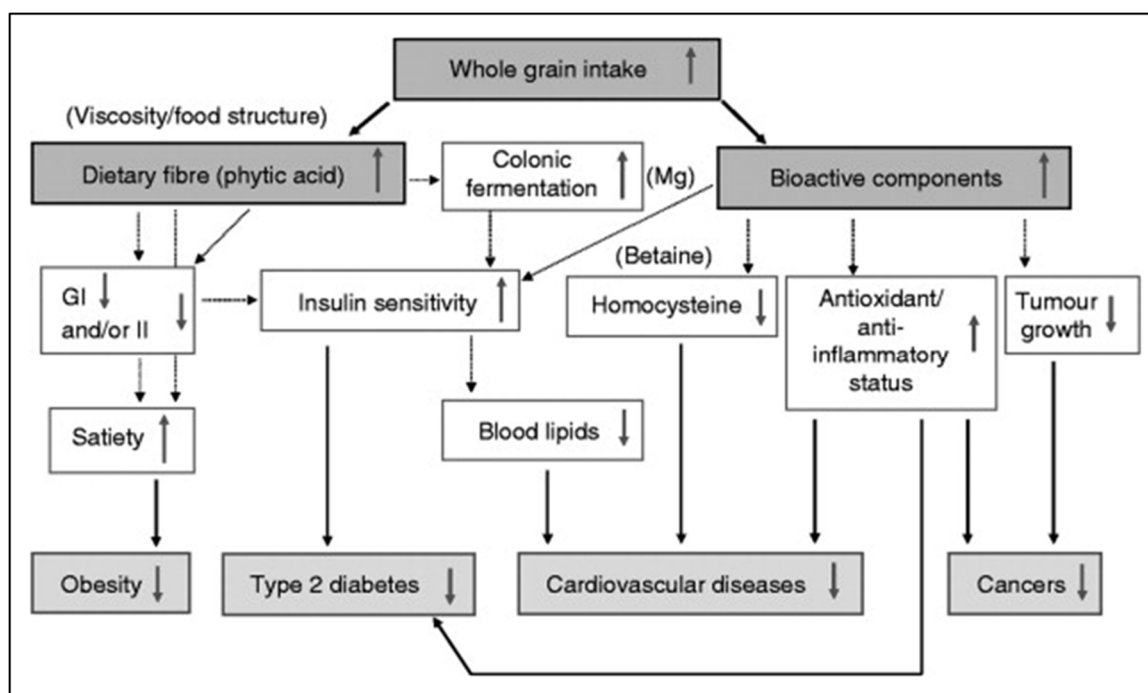


Figura 1.5. Meccanismi attraverso i quali i cereali integrali proteggono contro le principali malattie croniche. GI: Indice glicemico; II: Indice insulinemico. Tratto da Björck et al. (2012).

Una strategia alternativa è quella di selezionare varietà di frumento con alti livelli di fibra alimentare nella farina, in particolare della frazione solubile la cui quantità può variare anche di due volte (Ward et al. 2008). La recente identificazione dei geni che codificano per la sintesi di β -glucani nel frumento e nell'orzo (Doblin et al. 2009; Nemeth et al. 2010), offre la possibilità di aumentare la loro sintesi attraverso la creazione di piante transgeniche o mutagenizzate.

1.9. L'amido

L'amido è un carboidrato insolubile composto da due polimeri di glucosio, l'amilopectina e l'amilosio. Nelle piante superiori, l'amido è sintetizzato nei plastidi di cellule di organi fotosintetici e non, e rappresenta la principale fonte di energia stoccata negli organismi vegetali. Nelle foglie, una frazione di carbonio assimilata attraverso la fotosintesi, è conservata come amido nei cloroplasti invece di essere convertita in glucosio per la traslocazione verso i tessuti di crescita. Questo amido, chiamato transitorio, viene degradato durante la notte per fornire energia alle foglie e continuare la sintesi di saccarosio per l'esportazione nel resto della pianta. Negli organi non fotosintetici (ad esempio radici, tuberi e semi), il glucosio può essere convertito in amido come energia di riserva in plastidi specializzati chiamati amiloplasti. Questo amido di riserva viene mobilizzato per sostenere, per esempio, le fasi di sviluppo come la crescita della piantina dopo la germinazione del seme (Fincher 1989).

I semi dei cereali, i tuberi e semi di fagiolo e pisello sono costituiti per la maggior parte da amido. Dei 2,5 miliardi di tonnellate di piante coltivate contenenti amido, raccolte annualmente (dati FAOSTAT 2009), l'amido viene utilizzato direttamente come alimento, come mangime per animali o viene utilizzato come materia prima rinnovabile dall'industria non alimentare. In particolare, l'amido è una

materia prima importante per i biocarburanti di prima generazione a causa della relativa facilità con cui può essere convertito in zuccheri fermentabili (Smith 2008).

1.9.1. Composizione chimica e struttura fisica dell'amido

Dal punto di vista chimico l'amido è un carboidrato costituito da popolazioni di polimeri di D-glucosio, classificate in due categorie distinte, l'amilosio e l'amilopectina, in base al grado di polimerizzazione (DP) e alla frequenza delle ramificazioni. In generale tutte le molecole di amido presentano esclusivamente molecole di D-glucosio unite da legami glucosidici α -1,4 e punti di ramificazione, introdotti sulla struttura lineare, attraverso legami α -1,6. Il termine amilosio è utilizzato per identificare molecole caratterizzate da un basso grado di polimerizzazione (DP) (< 3000) e con una frequenza di ramificazioni inferiore all'1%. L'amilopectina comprende molecole con DP > 5000 e un'elevata frequenza di punti di ramificazione (3-4%) (Kossmann e Lloyd 2000; Rahman et al. 2000; Ball e Morell 2003; James et al. 2003; Tetlow et al. 2004). Questo tipo di classificazione, seppur consolidata, non considera l'esistenza di molecole con caratteristiche intermedie, il che ha portato a coniare nuove definizioni quali *intermediate starch* o *apparent amylose*. Diversi studi hanno indagato sulla variabilità delle percentuali relative delle due classi di molecole in frumento, includendo nelle analisi, specie coltivate, selvatiche e progenitrici, e hanno concluso che l'amilosio rappresenta tra il 18 e il 35% dell'amido totale mentre l'amilopectina rappresenta il 65%-82% (Zeng et al. 1997; Mohammadkhani et al. 1998; Stoddard e Sarker 2000). Il rapporto quantitativo amilosio-amilopectina è un fattore determinante delle proprietà chimico-fisiche dell'amido. Le dimensioni e il numero di ramificazioni delle molecole polimeriche rappresentano, in ultima analisi, i fattori primari che determinano le caratteristiche funzionali dell'amido.

Nell'amilopectina catene di glucosio di dimensioni minori sono raggruppate in strutture definite *clusters*; i singoli *cluster* sono interconnessi attraverso uno scheletro principale costituito da catene glucaniche di dimensioni maggiori. Nella nomenclatura classica (Peat et al. 1952) si distinguono catene di tipo "A", non sostituite, e catene di tipo "B" sostituite. La macromolecola contiene anche una singola catena di tipo "C" caratterizzata da un gruppo riducente libero (Figura 2.3a). Le catene di tipo B sono ulteriormente suddivise in catene di tipo "Ba" e catene di tipo "Bb", rispettivamente caratterizzate dalla presenza di almeno una sostituzione di una catena "A" e dalla sostituzione di sole catene "B" (Hizukuri e Maehara 1990). Le catene di tipo B sono inoltre classificate in base alla posizione assunta rispetto al *cluster*. All'interno di ciascuna singola catena si distinguono segmenti definiti "catene esterne" o "catene interne" a seconda della posizione rispetto al punto di ramificazione più lontano dall'estremità riducente. Tutte le catene di tipo "A" sono catene esterne, le catene "B" comprendono catene esterne ed interne; l'insieme dei residui glucosidici da cui si sviluppano i punti di ramificazione costituiscono la *total internal chain* o *core chain* (Bertoft 1991; Yun e Matheson 1993).

1.9.2. I granuli di amido

I granuli di amido sono stati definiti come un “materiale gerarchico” nel quale la struttura di un livello di organizzazione determina la struttura del livello organizzativo successivo (Myers et al. 2000). I *clusters* (Figura 1.6a) rappresentano il livello inferiore di questa organizzazione e sono costituiti dalle catene esterne dell’amilopectina associate in strutture a doppia elica. Tali strutture sono semicristalline e costituiscono l’unità ripetuta di 9 nm la cui presenza è stata riscontrata in amidi di diversi taxa (Witt et al. 2012). I *clusters* comprendono, inoltre, regioni di amilosio alternate alle catene esterne dell’amilopectina. Gruppi di 4-10 *clusters* sono organizzati a formare strutture di ordine superiore, chiamate “lamellae”, con spessore fino a 100 nm. La struttura di livello superiore è costituita, invece, da un assemblaggio a spirale dei *clusters* e responsabile di una stratificazione ordinata delle lamellae, definita “blockets” caratterizzata da uno spessore fino a 500 nm (Zeeman et al. 2010). Gli strati più esterni dei granuli sono costituiti da anelli concentrici caratterizzati da spessore da 100 nm fino a 1 µm (Figura 1.6b). È stata riportata la presenza di canali radiali interni ai granuli ed è stato ipotizzato che tali regioni possano essere essenziali in una serie di interazioni alla base di importanti processi enzimatici, fisici e chimici che coinvolgono l’amido (Gallant et al. 1997; Huber e BeMiller 2000). Le specie presenti nella tribù delle *Triticeae*, frumento, orzo e segale, presentano una distribuzione bimodale di tali strutture distinte in granuli di tipo A e granuli di tipo B (Figura 1.6c). In frumento i primi hanno forma ellissoidale e diametro da 15 a 30 µm, i secondi hanno forma sferica e diametro fino a 10 µm. Le due tipologie di granuli sono sintetizzate con tempistiche differenti durante il periodo di maturazione della cariosside. La sintesi dei granuli di tipo A ha inizio quattro giorni dopo la fioritura (DPF, *Days Post Flowering*) e continua fino a venti giorni post antesi. La sintesi dei granuli di tipo B ha inizio a dieci giorni ed è interessata da un incremento significativo venti giorni dopo l’antesi (Ao e Jane 2007). Queste differenze sono considerate un fattore determinante per le dimensioni dei granuli e per l’organizzazione strutturale di amilosio e amilopectina (Tester et al. 1997). Le dimensioni, la forma e la distribuzione dei granuli hanno valori caratteristici per ciascuna specie vegetale. In frumento i granuli di tipo A rappresentano solo il 2-4% del numero di granuli presenti nell’endosperma maturo, comprendendo circa il 75% in peso dell’amido totale. Diversi studi hanno dimostrato l’influenza della distribuzione dei granuli sulla funzionalità e le proprietà di pasting dell’amido (Chiotelli e Le Meste 2002; Liu et al. 2007; Park et al. 2004; Sahlstrom et al. 2003; Ao e Jane 2007; Zeng et al. 2014). La distribuzione dei granuli in frumento è controllata da fattori genetici e ambientali (Stoddard 2003).

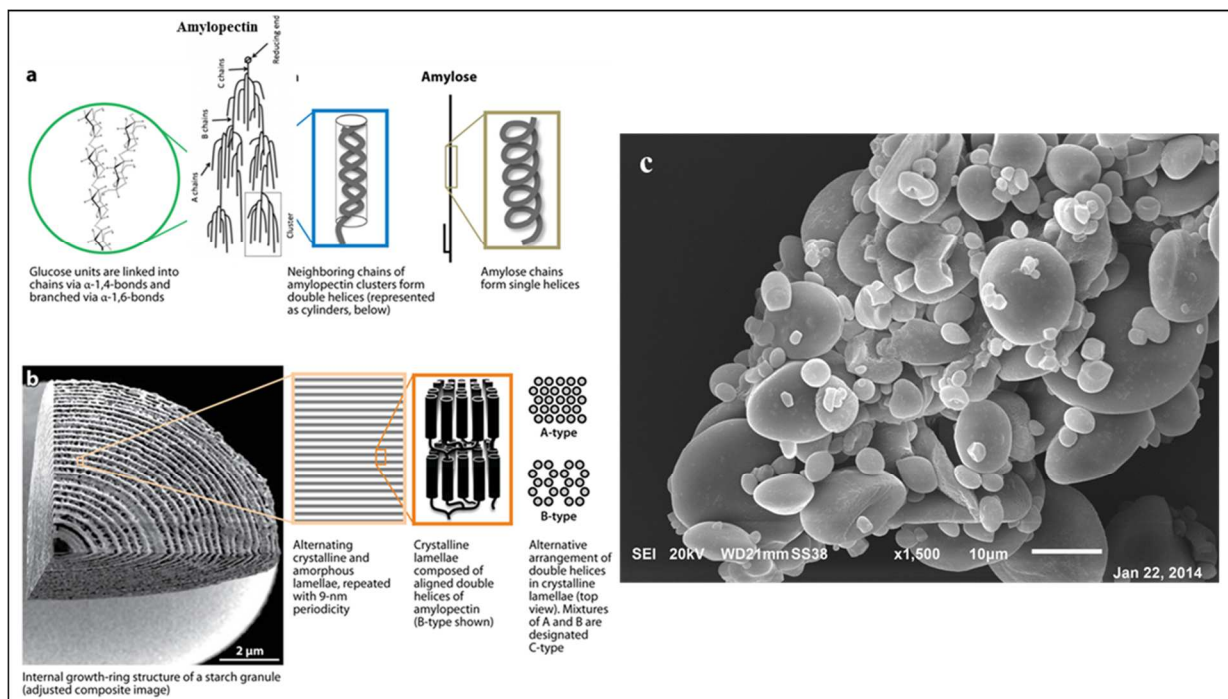


Figura 1.6. Composizione e struttura dei granuli di amido. **(a)** Rappresentazione schematica della struttura dell'amilopectina e dell'amilosio, modificata da Zeeman et al. (2010). **(b)** Relazione tra i granuli di amido e la struttura dell'amilopectina, Zeeman et al. (2010). **(c)** Immagine al microscopio elettronico a scansione dei granuli di tipo A e di tipo B di frumento.

1.10. L'importanza dell'amido nell'industria alimentare e non

Per lungo tempo il ruolo dell'amido nella qualità dei prodotti derivati da frumento è stato oscurato dalla peculiarità delle caratteristiche della frazione proteica dell'endosperma, il glutine. Nell'ultimo ventennio fattori quali, l'acquisizione di nuove conoscenze sull'influenza dell'amido sulla qualità, il riconoscimento dell'importanza della digeribilità dell'amido in termini nutrizionali e la disponibilità di nuovi strumenti genetici per generare e analizzare amidi "nuovi", hanno determinato una netta accelerazione dell'attività di studio e miglioramento della frazione maggiore, in termini quantitativi, di farine e semole. La conoscenza della via biosintetica e della composizione chimico-fisica dell'amido è alla base dello sviluppo di svariati amidi con caratteristiche e funzionalità innovative e inedite. Gli sforzi maggiori sono stati compiuti nella manipolazione del rapporto amilosio-amilopectina (1:3 negli amidi normali) con la produzione di amidi caratterizzati da percentuali di amilosio compresi in un intervallo da 0 fino al 70% dell'amido totale. Gli approcci utilizzati sono di vario tipo: dalla genetica diretta e inversa, con la ricerca di mutanti naturali o indotti, alle nuove biotecnologie con la produzione di piante trasformate.

1.11. Biosintesi dell'amido

La biosintesi dell'amido è una complessa via metabolica e comporta l'azione combinata di almeno quattro classi di enzimi: ADP-glucosio pirofosforilasi (AGPasi), amido sintasi (SS), enzimi di ramificazione (SBE) ed enzimi di de-ramificazione (DBE) (Figura 1.7). Le SS possono essere ulteriormente suddivise nelle SS solubili e nelle amido sintasi legate ai granuli (GBSS). L'amilosio e

l'amilopectina vengono sintetizzati attraverso due *pathway* distinti che condividono lo stesso substrato, l'ADP-glucosio, che viene prodotto mediante una reazione catalizzata dall'AGPasi tra glucosio 1-fosfato ed ATP. In seguito, il glucosio viene trasferito dall'ADPG all'estremità non riducente di una catena glucosidica mediante un legame α -1,4 causando il rilascio di ATP. Questa reazione è catalizzata da diverse classi di amido sintasi (SS) responsabili della sintesi dell'amilosio e dell'amilopectina. Il polimero di amido esteso è, poi, ramificato mediante la formazione di legami α -1,6 dall'azione degli enzimi di ramificazione (SBE) e ci sono forti evidenze per il coinvolgimento degli enzimi di deramificazione nel formare la struttura finale dell'amilopectina (Rahman et al. 2000). Una sola amido sintasi, l'enzima GBSS, è responsabile della sintesi dell'amilosio. Le tre classi di enzimi SS, SBE e DBE partecipano alla sintesi della complessa struttura dell'amilopectina.

1.11.1. Sintesi dell'ADP-glucosio

L'ADP-glucosio è il precursore per la sintesi di tutti i polimeri glucanici dell'amido. L'adenosina 5' difosfoglucosio pirofosforilasi (AGPasi) catalizza la reazione di sintesi dell'ADP-glucosio a partire da glucosio-1-fosfato (G1P) e ATP. Le AGPasi delle piante superiori hanno una struttura tetrameric, caratterizzata da due subunità catalitiche maggiori (AGP-L) e due minori (AGP-S) codificate dai geni *Shrunken-2* e *Brittle-2* (Okita 1992, Okita et al. 1990). In mais (Denyer 1996), riso (Sikka 2001), orzo (Thorbjørnsen 1996) e frumento (Burton et al. 2002) sono presenti sia un'isoforma plastidiale che una citosolica. Nell'endosperma dei cereali l'isoforma citosolica rappresenta l'isoforma maggiore (Burton et al. 2002).

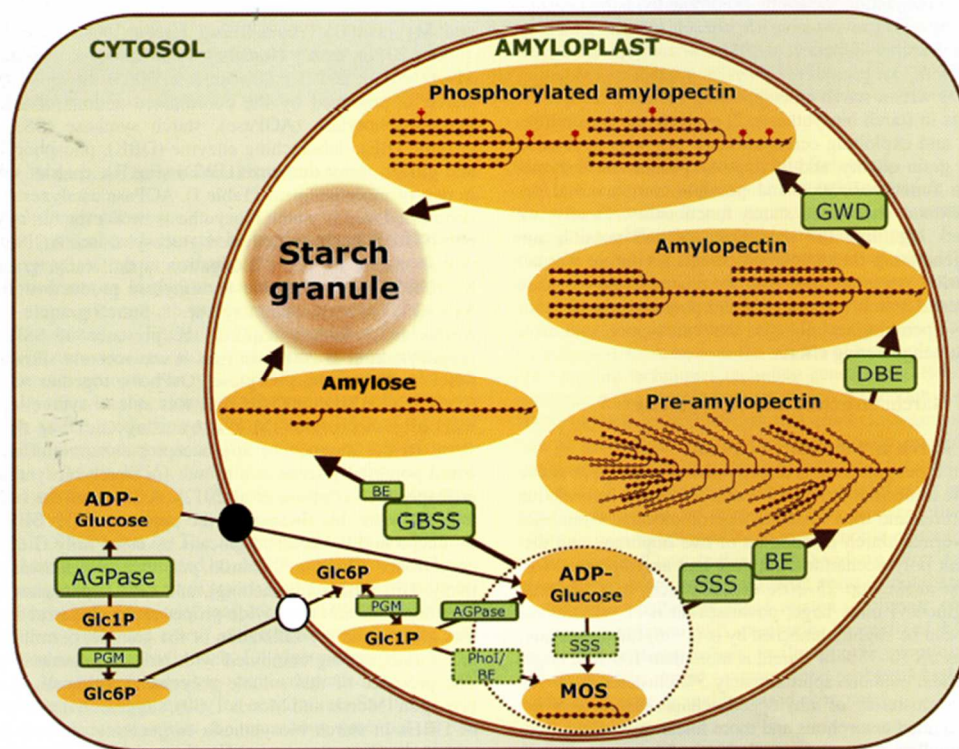


Figura 1.7. Schema generale della biosintesi dell'amido nell'endosperma dei cereali. Tratto da Blennow et al. (2013).

Le due isoforme sono codificate da gruppi di geni differenti; ciò è stato confermato attraverso l'analisi di un mutante di orzo privo delle subunità minori della AGPasi citosolica ma che conserva le subunità minori dell'isoforma plastidiale (Johnson et al. 2003). La disponibilità di mutanti caratterizzati dalla mancanza delle subunità citoplasmatiche in mais (Tsai e Nelson 1966) e in orzo (Johnson et al. 2003) ha suggerito che il flusso primario della sintesi dell'amido avviene a carico dell'AGPasi citoplasmatica. Tali mutanti, *bt2* e *sh2* in mais e *RisØ 16* in orzo, presentano infatti un basso contenuto di amido in accordo con l'ipotesi che attribuisce un ruolo primario all'isoforma citoplasmatica. Le AGPasi sono soggette a diversi meccanismi di regolazione a livello genico, attraverso la duplicazione dei geni e la modulazione dell'espressione, e a livello proteico attraverso regolazione allosterica, modificazioni post tradizionali e compartimentazione.

1.11.2. Sintesi dell'amilosio

L'enzima GBSS è stato identificato come l'amido sintasi deputata alla sintesi dell'amilosio nei plastidi. Questo enzima è localizzato principalmente all'interno dei granuli di amido e, in misura minore, adeso alla loro superficie. In tutti gli organismi vegetali, la mancanza di questo enzima è stata associata ad un fenotipo caratterizzato da livelli di amilosio drasticamente ridotti. Nei cereali, l'aggettivo *waxy* è utilizzato per descrivere l'aspetto ceroso delle cariossidi prive di amilosio. Sia nelle piante monocotiledoni che dicotiledoni esistono due classi di GBSS, una espressa nell'endosperma (GBSSI) e un'altra negli altri tessuti della pianta (GBSSII) (Nakamura et al. 1998; Edwards et al. 2002). Nel frumento esaploide esistono tre isoenzimi GBSSI, caratterizzati da diversa mobilità elettroforetica su gel SDS, codificati da 3 geni *Wx-A1*, *Wx-D1*, *Wx-B1* localizzati rispettivamente sui bracci corti dei cromosomi 7A e 7D e sul braccio lungo del cromosoma 4A (risultato di una traslocazione dal braccio corto del cromosoma 7B) (Chao 1989; Miura 1994; Yamamori 1994). Nel frumento duro tetraploide sono presenti solo le due proteine *waxy* *Wx-A1* e *Wx-B1* che in SDS-PAGE presentano una mobilità elettroforetica identica a quelle corrispondenti presenti in frumento tenero. L'inattivazione di uno o di due di questi geni omeologhi risulta nella produzione di linee parziali *waxy* (Graybosch 1998) le quali possono essere incrociate per ottenere un genotipo parziale o completamente *waxy* sia in frumento tenero che in frumento duro (Graybosch 1998; Lafiandra et al. 2010). Le linee completamente *waxy* sono caratterizzate da un amido con un bassissimo contenuto di amilosio (0-2%) e con caratteristiche funzionali profondamente diverse dai genotipi wt che determinano la possibilità di nuovi usi e applicazioni degli amidi di frumento. Miura et al. (1994) determinarono i differenti effetti delle tre isoforme delle proteine *waxy* sul contenuto di amilosio e mostrarono che il maggiore effetto veniva dato dall'allele *Wx-B1*. La sovra-espressione di questo allele in frumento duro non causa, però, incrementi nel contenuto di amilosio (Sestili et al. 2012). Polimorfismi ai loci *waxy*, in frumento duro e tenero e i loro effetti nel contenuto di amilosio, furono studiati da Yamamori et al. (2009) che identificarono alleli associati con un ridotto o maggiore contenuto di amilosio. Diversi tentativi sono stati fatti per correlare i polimorfismi nei geni *waxy* al contenuto di amilosio. La varietà *indica* di riso possiede l'allele *waxy*

Wxa e presenta, rispetto alla varietà *japonica* che possiede l'allele *Wxb*, un contenuto di amilosio nell'endosperma maggiore. Il diverso contenuto di amilosio è dovuto alla capacità delle varietà con *Wxa* di produrre più enzima GBSS (Sano 1984; Umemoto et al. 2002).

Studi biochimici hanno dimostrato che l'enzima GBSS è “processivo” (si lega al substrato e aggiunge nuovi residui alla stessa catena) piuttosto che “distributivo” (distribuisce nuovi residui su differenti catene) nelle catene crescenti di amilosio (Denyer et al. 1999a). Si è ipotizzato che l'enzima GBSS agisca negli spazi interstiziali del granulo, inserendo l'amilosio direttamente nella matrice della regione amorfa tra le zone cristalline dell'amilopectina. L'attività di questa proteina è stimolata dalla presenza di piccole catene di malto-oligosaccaridi che agiscono come molecole di innesco per l'allungamento (Denyer et al. 1999a). È stato anche riportato che l'amilopectina potrebbe stimolare l'attività delle GBSS, suggerendo l'importanza della matrice dei granuli sulla funzionalità dell'enzima (Denyer et al. 1999b). Oltre al loro ruolo nella sintesi dell'amilosio, ci sono numerose evidenze che indicano che le isoforme GBSS contribuiscono alla sintesi dell'amilopectina attraverso l'allungamento delle catene esterne più lunghe (Yao e Jane 2002; Tetlow 2011). La presenza di rari punti di ramificazione nell'amilosio indica che probabilmente, uno degli enzimi di ramificazione presente nei granuli, possa catalizzare questa reazione. Altre amido sintasi, come le SSI e SSII, potrebbero giocare un ruolo nella sintesi dell'amilosio.

1.11.3. Sintesi dell'amilopectina

La sintesi dell'amilopectina richiede almeno diverse forme di amido sintasi (SSI, SSII, SSIII, SSIV), due tipi di enzimi di ramificazione (SBEI, SBEII) ed almeno un enzima di deramificazione (isoamilasi). Attraverso diversi approcci sono stati prodotti genotipi mutanti per ciascuna classe di SS. Il quadro generale che emerge dagli studi di tali mutanti evidenzia che ciascun enzima è responsabile della sintesi di polimeri glucanici di dimensioni specifiche all'interno della struttura dell'amilopectina. Inoltre, lo studio di amidi *waxy* ha generato l'ipotesi di un coinvolgimento delle isoforme GBSS nella sintesi delle catene lunghe dell'amilopectina che legano diversi *clusters* tra loro (Yoo e Jane 2002a; Yoo e Jane 2002b). La soppressione del gene *SSI* provoca piccoli cambiamenti nel contenuto di amido, ma profondi cambiamenti nella struttura dell'amilopectina, con diminuzione delle catene corte. Sulla base di recenti lavori (Delvalle et al. 2005; Fujita et al. 2006; McMaugh et al. 2014) si può ipotizzare che le amido sintasi SSI hanno un ruolo nella sintesi delle catene A e B1 dell'amilopectina e siano implicate nella formazione di catene corte. La mancanza degli enzimi di classe II ha effetti maggiori sia sul contenuto di amido che sulla sua struttura, provocando una diminuzione delle catene di lunghezza intermedia nell'amilopectina. La soppressione delle amido sintasi SSIII porta ad una diminuzione marginale nel contenuto di amido ed una diminuzione nella proporzione di catene lunghe nell'amilopectina, e per questa ragione è stato proposto un ruolo nella sintesi delle catene lunghe. In organismi poliploidi, come il frumento, la situazione è più complessa per la presenza di differenti isoforme per lo stesso enzima su ogni genoma.

1.11.3.1. *Le amido sintasi di classe I (SSI)*

In frumento tenero la proteina SGP-3 è codificata da tre geni SSI localizzati sul braccio corto del cromosoma 7. Un singolo locus omeologo è presente in ciascun genoma (Li et al. 1999). In frumento l'espressione del gene SSI inizia a 3 DPF, raggiunge il picco a 10 DPF e declina a bassi livelli a partire da 20 DPF (Li et al. 1999). Il gene SSI è stato identificato in numerosi organismi vegetali. L'identificazione e lo studio di mutanti difettivi per l'enzima SSI in *Arabidopsis* (Delvalle et al. 2005) e in riso (Fujita et al. 2006) ha rivelato che l'enzima è principalmente coinvolto nella sintesi delle catene corte dell'amilopectina (DP 8-12). Questa funzione è stata recentemente confermata in frumento da McMaugh et al. (2014). In questo studio, attraverso RNAi, si sono ottenute linee transgeniche silenziate per il gene SSI che mostrano un'amilopectina con una maggiore frequenza di catene molto corte (DP 6-7), una percentuale inferiore di catene corte (DP 8-12) e più catene intermedie (DP 13-20) rispetto alle linee di controllo. Inoltre, le linee silenziate mostrano un contenuto di amilosio leggermente più alto, una morfologia dei granuli diversa e una minor percentuale di granuli di tipo B. Il cambiamento della struttura fine dell'amido nelle linee SSI silenziate, altera la temperatura di gelatinizzazione, aumenta la capacità di rigonfiamento e la viscosità dell'amido.

1.11.3.2. *Le amido sintasi di classe II (SSII)*

In riso sono stati individuati tre geni codificanti le amido sintasi di classe II (Jiang et al. 2004; Hirose e Terao 2004) caratterizzati da espressione spazio temporale differenziale. In mais sono state identificate due proteine SSII: l'SSIIa espressa prevalentemente nell'endosperma e l'SSIIb espressa in foglia (Harn et al. 1998; Imparl-Radosevich 1999). In frumento le tre proteine associate ai granuli di amido, descritte come SGP-1 (Yamamori e Endo 1996), appartengono alla classe SSII; le sequenze geniche dei tre isoenzimi hanno un'elevata omologia con l'SSIIa di mais (Li et al. 1999). Nella fase iniziale dello sviluppo dell'endosperma, le proteine SSIIa di frumento sono localizzate sia nella frazione solubile che legate ai granuli mentre nella cariosside matura si trovano principalmente all'interno dei granuli (Li et al. 1999). In frumento le tre proteine SGP-1, (SGP-A1, SGP-B1 e SGP-D1) sono codificate da tre geni distinti, localizzati sui bracci corti dei cromosomi 7A, 7B e 7D (Li et al. 1999). L'isoforma SSIIa gioca un ruolo importante nella sintesi dell'amido nell'endosperma dei cereali. Nel mutante *rug-5* di pisello la mancanza dell'enzima *SSIIa* è stata associata ad una diminuzione nel contenuto di amido, un incremento nel contenuto di amilosio e all'alterazione della morfologia dei granuli e della struttura dell'amilopectina (Craig et al. 1998). In frumento sono state identificati e caratterizzati genotipi privi di ciascuna delle tre proteine SGP-1 (Yamamori et al. 2000). Il mutante triplo nullo, ottenuto mediante l'incrocio dei tre mutanti singoli nulli, mostra caratteristiche simili al mutante *rug-5* di pisello (Yamamori et al. 2000). Yamamori et al. (2000) e Lafiandra et al. (2010) hanno descritto genotipi di frumento *SSII nulli* caratterizzati da significativi incrementi di amilosio e nuove proprietà viscoelastiche, rispettivamente in frumento tenero e duro. In riso sono stati individuati i siti catalitici e di legame dell'enzima SSII (Umemoto et al. 2004; Umemoto e Aoki 2005). Due SNP (*Single Nucleotide*

Polymorphism) presenti nella regione C-terminale del gene *SSIIa* provocano la perdita sia dell'attività catalitica che della capacità di legare i granuli. In orzo il mutante *nullo SSIIa, sex6*, ha caratteristiche simili al mutante *rug5* di pisello con un incremento nel contenuto di amilosio (superiore al 70%) e basse rese di amido (Morell et al. 2003). In mais il mutante *sugary-2*, che presenta una lesione nel gene *SSIIa*, mostra un alto contenuto di amilosio, temperatura di gelatinizzazione ridotta, morfologia dei granuli e distribuzione della lunghezza delle catene di amilopectina alterate (Zhang et al. 2004).

1.11.3.3. Le amido sintasi di classe III (SSIII)

Il mutante *dull* di mais (Gao et al. 1998), caratterizzato dall'assenza dell'attività dell'enzima SSIII, ha fornito indicazioni importanti sul ruolo dell'SSIII nella biosintesi dell'amido. Il mutante *dull* presenta un leggero abbassamento del contenuto di amido, lieve incremento del contenuto di amilosio e dei punti di ramificazione e, soprattutto, la comparsa di una nuova classe di polimeri glucanici con caratteristiche intermedie tra amilosio e amilopectina, definita *intermediate starch*.

Studi precedenti su piante transgeniche di patata, in cui il gene *SSIII* è stato silenziato da solo o in combinazione con *SSII*, hanno evidenziato che la sottoregolazione di entrambi gli enzimi altera la struttura dei granuli e la lunghezza delle catene di amilopectina, diminuendo la porzione di catene lunghe. Li et al. (2012) hanno dimostrato che l'enzima di deramificazione *ISA2* e SSIII lavorano in modo coordinato per reprimere l'accumulo di fitoglicogeno. Inoltre, mutazioni in questo gene in mais, riso ed orzo, hanno dimostrato un possibile ruolo nell'aumento dell'amilosio (Li et al. 2011).

In frumento sono stati isolati e caratterizzati i geni codificanti per le tre isoforme SSIII e localizzati sul cromosoma 1 (Li et al. 2000).

1.11.3.4. Le amido sintasi di classe IV (SSIV)

Roldàn et al. (2007) hanno analizzato due mutanti di *Arabidopsis* caratterizzati dall'assenza dell'enzima SSIV. I risultati di tale studio non hanno evidenziato cambiamenti significativi nella struttura dell'amilopectina. Il rapporto amilosio/amilopectina e il contenuto di amido totale non sono risultati alterati. Inoltre non sono stati osservati effetti pleiotropici sull'espressioni delle altre classi SS. Questi dati hanno suggerito un ruolo alternativo all'allungamento delle catene glucaniche dell'amilopectina per la classe SSIV. La riduzione nel numero dei granuli, associata all'accresciuta dimensione degli stessi, riscontrata nel mutante *Atss4*, ha portato ad avanzare l'ipotesi che, in *Arabidopsis*, l'enzima SSIV possa essere responsabile del controllo della sintesi del corretto numero di granuli nel cloroplasto. SSIV potrebbe essere coinvolto nel *priming* o innesco della sintesi della struttura semicristallina. In frumento è stato isolato e caratterizzato il gene codificante per l'enzima SSIV localizzato sul braccio lungo dei cromosomi omologhi del gruppo 1 (Leterier et al. 2008). La presenza dei geni codificanti per le classi di enzimi SSIV e SSIII sul cromosoma 1, a differenza del SSII e GBSSI localizzati sul cromosoma 7, ha suggerito che i due gruppi di SS potrebbero aver seguito un percorso evolutivo differente. Tale ipotesi

è stata avvalorata dallo studio delle sequenze amminoacidiche e, in particolare, delle regioni conservate, dei due gruppi di SS. In ruolo di questi enzimi in frumento non è ancora chiaro (Tetlow 2011).

1.11.3.5. Gli enzimi di ramificazione di classe I (SBEI)

Gli enzimi di ramificazione dell'amido (SBE, *Starch Branching Enzymes*) sono trans-glicosilasi che catalizzano la formazione dei punti di ramificazione attraverso la formazione di legami α -1,6. Il meccanismo di azione di tali enzimi consiste di due fasi: la scissione di un legame α -1,4 in un polimero glucanico lineare; il trasferimento del frammento glucanico e la formazione di un legame glicosidico con il gruppo ossidrilico di un C6 di una nuova catena di glucosio. In base alla sequenza amminoacidica N-terminale ed alle proprietà immunologiche, gli enzimi di ramificazione SBE sono stati divisi in due classi, SBEI e SBEII (Burton et al. 1995). Nelle monocotiledoni la classe *SBEII* include due geni, chiamati rispettivamente *SBEIIa* e *SBEIIb*. In frumento i loci omologhi dei geni *SBEI* sono localizzati all'estremità distale dei cromosomi 7A, 7B e 7D. In frumento le proteine codificate dai geni *SBEI* possono essere separate mediante elettroforesi non-denaturante e c'è una considerevole eterogeneità tra i frumenti nella mobilità elettroforetica (Morell et al. 1997; Regina et al. 2004). In *Chinese Spring*, varietà di frumento di riferimento, sono presenti due prodotti del genoma D ed una proteina per ciascuno dei genomi A e B (Morell et al. 1997). I trascritti dei geni *SBEI* sono soggetti a meccanismi di *splicing* alternativo del mRNA (Båga et al. 1999). È stato ipotizzato che i due prodotti del genoma D possano essere il risultato di un meccanismo di *splicing* alternativo. Peng et al. (2000) hanno descritto gli enzimi di ramificazione di tipo SBEIc caratterizzati da un alto peso molecolare e preferenzialmente legati ai granuli di tipo A, chiamati SGP-140 e -145 (Peng et al. 2000; Båga et al. 2000). I mutanti *SBEI* sono stati isolati in numerose specie, incluse mais (Blauth et al. 2002), riso (Satoh et al. 2003) e patata (Jobling et al. 1999). A questi mutanti non è stato però associato alcun fenotipo particolare dell'amido di riserva; solo in un mutante di riso sono stati riportati cambiamenti nella distribuzione delle catene di amilopectina (Satoh et al. 2003). In frumento è stata generata, attraverso l'incrocio con gli alleli nulli dei tre genomi, una linea con un ridotto livello di SBEI (inferiore all'1%); anche in questo caso non è stato riscontrato nessun cambiamento nella struttura o nella funzionalità dell'amido della linea triplo *nulli* SBEI (Regina et al. 2004). I dati disponibili ad oggi suggeriscono che gli enzimi SBEI hanno un ruolo nella regolamentazione degli altri enzimi SBEs (Tetlow 2011) e gli effetti di una loro sotto-regolazione possono essere osservati solo in piante caratterizzate dalla mancanza di almeno una delle due isoforme SBEII (Yao et al. 2004).

1.11.3.6. Gli enzimi di ramificazione di classe II (SBEIIa e SBEIIb)

Il ruolo dei geni *SBEIIa* e *SBEIIb* è stato ampiamente studiato nei cereali grazie all'individuazione di mutanti naturali e attraverso la produzione di piante mutagenizzate e transgeniche. In mais il mutante *ae* (*amylose extender*), caratterizzato da una lesione nel gene *SBEIIb*, presenta un fenotipo con un elevato contenuto di amilosio (>50%) (Stinard et al. 1993); una mutazione deleteria a carico del gene

SBEIIa produce un fenotipo con contenuto elevato di amilosio in foglia ma non nell'endosperma (Blauth et al. 2001). In riso l'elevato contenuto di amilosio (30-35%) riscontrato in alcuni mutanti è stato associato a mutazioni presenti negli omoeologhi dei geni *SBEIIb* (Mizuno et al. 1993; Nishi et al. 2001). In frumento i geni *SBEIIa* e *SBEIIb* sono localizzati sul braccio corto dei cromosomi omoeologhi del gruppo 2 (Nair et al. 1997; Rahman et al. 2001; Regina et al. 2005). Un'analisi dei geni ortologi *SBEIIa* nel frumento esaploide ha rilevato che il genoma B è il più divergente rispetto al genoma A e D. (Botticella et al. 2012). In frumento il profilo di espressione dei due geni *SBEIIa* e *SBEIIb* è risultato differente rispetto agli altri cereali. In mais (Gao et al. 1997) e riso (Yamanouchi e Nakamura 1992) il gene *SBEIIb* è l'isoforma predominante nell'endosperma, al contrario in frumento il gene *SBEIIa* è espresso a livelli 3-4 volte superiori rispetto al *SBEIIb*. Regina et al. (2006) hanno osservato che in tutte le piante transgeniche, ottenute con la tecnologia dell'RNAi, il silenziamento del gene *SBEIIa* provoca, anche, la perdita di espressione del gene *SBEIIb*. Le analisi dei messaggeri hanno mostrato che l'mRNA dei geni *SBEIIa* era fortemente ridotto, mentre l'espressione del gene *SBEIIb* non variava, indicando che la soppressione dell'attività di *SBEIIb* possa essere dovuto ad un meccanismo di regolazione post-trascrizionale (Regina et al. 2006). I geni *SBEIIa* e *SBEIIb* hanno quindi funzioni sovrapposte nella biosintesi dell'amido e differiscono per l'espressione differenziale nelle diverse specie di cereali. Questa tesi è stata confermata dal Sestili et al. (2010b) che hanno riscontrato la presenza del trascritto del gene *SBEIIb* in linee di frumento duro trasformate con un costrutto RNAi per il silenziamento del gene *SBEIIa*. L'analisi proteomica di queste linee confrontate con il rispettivo wt ha mostrato 28 spot differenzialmente espressi di cui la maggior parte implicati direttamente nella sintesi dell'amido. Le proteine SBEI risultano sovra-accumulate e cambiamenti relativi all'accumulo sono stati trovati anche per le proteine SSII, GBSS e le fosforilasi (Sestili et al. 2012). In orzo, il silenziamento di tutti i geni che codifica per le isoforme SBE ha dimostrato che anche i geni *SBEI* insieme ai geni *SBEIIa* e *SBEIIb* giocano un ruolo importante nella sintesi dell'amilopectina (Carciofi et al. 2012). Tetlow et al. (2008) hanno dimostrato la formazione di complessi proteina-proteina tra le isoforme SSI, SSII e SBEII implicati nella sintesi dell'amilopectina. Hanno proposto un modello basato sulla formazione di un complesso proteico dipendente dalla fosforilazione, dove le chinasi proteiche e le fosforilasi hanno un ruolo importante, o per la formazione del complesso o per l'attivazione e la disattivazione enzimatica, regolando l'attività degli enzimi coinvolti nella sintesi dell'amilopectina. L'assenza di una proteina del complesso potrebbe produrre un effetto a cascata su altre proteine, modulando il loro accumulo nel granulo.

1.11.3.7. Gli enzimi di deramificazione

Nelle piante esistono due famiglie di DBE, le isoamilasi e le pullulanasi. Entrambi idrolizzano i legami α -1,6 ma differiscono nella specificità per il substrato. Il tipo isoamilasi idrolizza il legame α -1,6 dell'amilopectina denaturata, del glicogeno e dei derivati amilolitici (destrine), mentre il tipo pullulanasi attacca le ramificazioni del polimero costituito da unità ripetute di maltotriosi (unite mediante legami α -

1,6) e delle destrine. La scoperta del coinvolgimento delle isoamilasi nella sintesi dell'amido è avvenuta grazie all'identificazione del mutante *sugary-1* di mais, ottenuto mediante un approccio di *Transposon Tagging* (James et al. 1995). Nel mutante *sugary-1* la sintesi dell'amilopectina è sostanzialmente sostituita da un polimero non cristallino altamente ramificato, noto come fitoglicogeno. L'importanza del ruolo delle isoamilasi nella sintesi di amido è stata in seguito confermata in un'ampia varietà di specie, tra cui *Chlamydomonas* (Mouille et al. 1996), riso (Kubo et al. 1999; Fujita et al. 2003), *Arabidopsis* (Zeeman et al. 1998) ed orzo (Burton et al. 2002a). La disponibilità dell'intera sequenza del genoma di *Arabidopsis* ha permesso l'identificazione di tre geni di tipo isoamilasi ed uno di tipo pullulanasi, *AtISA1*, *AtISA2*, *AtISA3* e *AtPU1* (Delatte et al. 2005; Wattebled et al. 2005). La mancanza delle proteine *AtISA1* o *AtISA2* o di entrambi è stata associata ad un fenotipo con basso contenuto di amido e accumuli elevati di fitoglicogeno (Delatte et al. 2005). Il silenziamento di isoamilasi in patata, ottenuto con la tecnica dell'RNA antisense, ha fornito dati utili alla comprensione del ruolo di questi enzimi. L'effetto principale riscontrato è stato l'accumulo di grandi quantità di granuli piccoli negli amiloplasti rispetto ai tuberi normali: è stato, quindi, ipotizzato che l'isoamilasi è necessaria per convertire la "preamilopectina" in un polimero in grado di cristallizzare sul granulo di amido nascente (Bustos et al. 2004). Particolarmente interessante, in quanto membro delle *Triticeae* (come il frumento), è il lavoro in orzo (Burton et al. 2002) in cui sono stati individuati mutanti naturali *sugary-1* (*su-1*) caratterizzati dalla contemporanea presenza dell'amido cristallino e del fitoglicogeno, già identificato in mais e patata; inoltre, è stato verificato un incremento nel numero dei granuli irregolari nella forma e con dimensioni intermedie rispetto ai granuli A/B tipici delle *Triticeae*. L'ipotesi di Burton è che l'assenza dell'isoamilasi determini una maggiore concentrazione di glucani in grado di cristallizzare e quindi di formare i granuli. La presenza delle isoamilasi limiterebbe il numero di eventi di nucleazione e quindi, in un secondo momento, inibirebbe la sintesi di fitoglicogeno. L'introduzione nel mutante di riso *sugary-1* di un gene che codifica per un'isoamilasi di frumento ha generato il ripristino della sintesi dell'amido: i livelli di fitoglicogeno residui sono risultati inversamente proporzionali al livello di espressione della proteina eterologa introdotta; l'amido delle linee transgeniche, osservato al microscopio elettronico a scansione (SEM), mostra un incremento dei granuli piccoli con forma irregolare e granuli grandi con contorno meno distinguibile rispetto al mutante *sugary-1* (Kubo et al. 2005; Bustos et al. 2004). In frumento i geni che codificano per isoamilasi sono stati isolati e caratterizzati (Genschel et al. 2002; Rahman et al. 2003), ma non sono stati identificati mutanti in questi geni. È stata dimostrata l'espressione nell'endosperma di una seconda categoria di enzimi di deramificazione: le pullulanasi o destrinasi limite (LD). Stahl et al. (2004) hanno dimostrato che, in orzo, un aumento dell'attività di LD, ottenuta attraverso il silenziamento genico dell'inibitore specifico LDI, ha provocato profondi cambiamenti nella distribuzione dei granuli. L'osservazione che il periodo di espressione dei geni LD e LDI coincide con il periodo di formazione dei granuli B, supporta l'ipotesi del coinvolgimento di questa classe di enzimi nella seconda ondata di formazione dei granuli. Le attuali conoscenze disponibili sul ruolo degli enzimi di deramificazione nella sintesi dell'amido li rendono

interessanti nella prospettiva di modificare le dimensioni dei granuli di amido o il rapporto tra granuli A/B nelle *Triticeae*

1.11.3.8. Il ruolo di altri geni nella sintesi dell'amido

Dall'osservazione di altri sistemi numerose altre classi di geni sembrano essere coinvolte nella sintesi dell'amido. Per esempio, in *Chlamydomonas reinhardtii* l'eliminazione dell'espressione del D-enzima (*disproportionating-enzyme*) causa una forte riduzione della sintesi di amido (Colleoni et al. 1999a, b); mentre l'alterazione dell'attività di questo enzima nelle foglie di *Arabidopsis* non ha nessun impatto sulla sintesi dell'amido (Critchley et al. 2001). In frumento il ruolo di questi enzimi deve essere ancora essere ben definito (Bresolin et al. 2005). Un altro enzima con potenziale ruolo nella sintesi e degradazione dell'amido è un'amido fosforilasi. In frumento sono state identificate almeno 3 fosforilasi probabilmente implicate nella sintesi dell'amido, due forme citosoliche ed una plastidiale (Schupp e Ziegler 2004). Le forme citosoliche sono espresse durante la germinazione del seme, ciò ha lasciato ipotizzare un loro ruolo nella degradazione dell'amido. L'altra forma è espressa nell'endosperma ma non è stato ancora definito se ha un ruolo nella sintesi o nella degradazione dell'amido. Le proteine appartenenti alla famiglia GWD (*Glucan Water Dikinase*), meglio conosciute come R1, hanno, un ruolo nella fosforilazione dell'amido in patata sia in foglia che nel tubero e sembrano far parte del sistema di degradazione dell'amido (Ritte et al. 2002; Mikkelsen et al. 2004). Il silenziamento di questi geni, in frumento, porta ad una diminuzione del contenuto di amido fosforilato ed un aumento nella dimensione dei semi (Ral et al. 2012).

1.11.4. Produzione ed interesse negli amidi a basso contenuto di amilosio

A causa della loro diversa composizione chimica, le farine *waxy* o parzialmente *waxy*, caratterizzate da bassi contenuti di amilosio, hanno caratteristiche funzionali utili che ne hanno incoraggiato lo sviluppo commerciale. Lafiandra et al. (2010) hanno mostrato che le farine *waxy* hanno una maggiore resistenza alla retrogradazione se paragonati alle farine normali. L'elevata capacità di assorbimento di acqua e l'incapacità di retrogradare delle farine *waxy*, rappresentano caratteristiche utili per migliorare la conservabilità di alcune tipologie di prodotti. La retrogradazione dell'amido è considerata la principale causa dell'invecchiamento o rafforzamento del pane (Hung-Iten 1999). Morita et al. (2002) hanno analizzato l'effetto dell'incorporazione di farine *waxy* sulle caratteristiche qualitative e di conservabilità del pane. Gli autori hanno riportato che la sostituzione del 40% di farine *waxy* risulta in un pane con un maggiore volume e una migliore conservabilità (*staling* ritardato). Inoltre, la crosta ha una migliore capacità di ritenzione dell'acqua, risulta più soffice, viscosa e glutinosa. Linee di frumento *waxy* parziali sono risultate adatte alla produzione di "noodles" (spaghetti orientali prodotti col frumento tenero) di qualità superiore (Yamamori et al. 1992; Miura et al. 1994). La stabilità degli amidi *waxy*, dovuta allo scarso grado di retrogradazione, sta recentemente suscitando interesse per la possibilità di aumentare la conservabilità dei prodotti surgelati. La mancanza di amilosio determina infatti un minore grado di

sineresi nei prodotti surgelati (Reddy e Seib 2000). Vignaux et al. (2005) hanno utilizzato la semola dei genotipi *waxy* totali e parziali di frumento duro per studiare l'effetto degli alleli *waxy* sulla qualità della pasta. Gli spaghetti ottenuti dalla semola *waxy* risultano essere più collosi rispetto alla pasta prodotta dai frumenti duri tradizionali, caratteristica che non coincide con le esigenze dei consumatori che preferiscono la pasta cosiddetta "al dente" (Vignaux et al. 2005; Gianibelli et al. 2005). Le proprietà pastificatorie delle semole *waxy* parziali risultano essere simili a quelle dei frumenti duri normali, indicando che la presenza di un singolo allele *waxy* è sufficiente per produrre frumento con proprietà ottimali per la produzione di pasta.

La granella *waxy* può essere utilizzata anche nell'industria mangimistica, essendo l'amido costituito quasi esclusivamente di amilopectina, componente altamente digeribile. Numerose sono le possibilità di applicazione dei frumenti *waxy* per scopi non alimentari. Ad esempio un'applicazione è nell'industria degli adesivi, in particolare per la produzione delle etichette delle bottiglie, che devono resistere ad una elevata umidità (viene in questo caso sfruttata la capacità di assorbire l'acqua da parte dell'amilopectina). Un ulteriore uso possibile è nell'industria cartaria; la carta proveniente da amidi ricchi di amilopectina risulta essere maggiormente resistente e con una migliore qualità di stampa. Infine, in frumento, il rapporto amilosio/amilopectina è uno dei parametri che influiscono sull'idrolisi dell'amido e i processi di fermentazione. L'amido *waxy* risulta più adatto per la produzione di etanolo (Gago et al. 2014).

1.11.5. Produzione ed interesse negli amidi ad alto contenuto di amilosio

Amidi di frumento ad alto contenuto di amilosio sono stati principalmente prodotti intervenendo su due classi di enzimi coinvolti nella sintesi dell'amilopectina: gli enzimi di ramificazione SBE e le amido sintasi di tipo SS. L'assenza degli enzimi SSIIa o SGP-1 è stata associata, oltre che ad un aumento del contenuto di amilosio, ad ulteriori modifiche dell'amido quali, aumento della percentuale di catene corte dell'amilopectina, deformazione dei granuli di tipo A e un drastico decremento della resa di amido nella cariosside (Yamamori et al. 2000; Lafiandra et al. 2010). L'analisi delle proprietà di *pasting* dei genotipi SGP-1 *nulli* ha evidenziato, sia in frumento duro che in frumento tenero, la correlazione negativa tra la viscosità e il contenuto di amilosio (Yamamori et al. 2006). Il silenziamento dei geni *SBEIIa*, sia in frumento duro che in frumento tenero, ha portato ad un drastico aumento della percentuale di amilosio con valori fino al 70% dell'amido totale (Regina et al. 2006; Sestili et al. 2010b). La resa dell'amido nelle linee silenziate non è risultata sensibilmente alterata rispetto al genotipo wt. Tale differenza rispetto alle linee SGP-1 *nulli*, è dovuta al diverso ruolo svolto dalle due classi di enzimi nella sintesi dell'amilopectina. Lo studio delle caratteristiche di *pasting* della linea silenziale di frumento duro ha confermato la correlazione negativa esistente tra il contenuto di amilosio e i valori di viscosità degli sfarinati (Sestili et al. 2010b). Regina et al. (2006) hanno dimostrato l'effetto salutistico del genotipo *high amylose* associato all'incremento della percentuale di amido resistente (RS) dovuto all'inaccessibilità delle strutture inter-e intra-catena formate dalle molecole di amilosio. L'interesse per le applicazioni dell'amido ad alto contenuto di amilosio in campo alimentare, ha due motivazioni

principali: 1) gli effetti fisiologici associati all'amido resistente e 2) le proprietà chimico-fisiche uniche che rendono possibile la produzione di prodotti di elevata qualità non ottenibili con le tradizionali fibre insolubili (Yue e Waring 1998). L'incorporazione di amidi *high amylose* in pane, prodotti da forno e pasta migliora la consistenza (texture) del prodotto e fornisce importanti benefici alla salute senza compromettere o alterare le caratteristiche la palatabilità dei prodotti. La produzione di pane o prodotti da forno fortificati con fibre insolubili peggiora la qualità in termini di gusto, colore e volume. L'elevata capacità di assorbimento di acqua delle fibre causa problemi come la collosità degli impasti con impatti negativi sul processamento e la qualità finale del prodotto. La sostituzione delle crusca di frumento con amido resistente di origine commerciale ha avuto un impatto positivo sulla qualità del pane. L'aggiunta di amido ad alto contenuto di amilosio al 40% non altera la capacità di assorbimento di acqua della farina e di conseguenza non altera le caratteristiche reologiche del pane (Lafiandra et al. 2014). Inoltre il colore bianco e le dimensioni fini dei granuli di amido danno una crosta più brillante e una migliore palatabilità rispetto al pane prodotto con l'aggiunta di fibre tradizionali. Studi di incorporazione di *high amylose* in prodotti da forno quali ad esempio dolci, muffin e biscotti hanno mostrato un netto miglioramento della consistenza soprattutto in termini di sofficietà (Lafiandra et al. 2014). Chanvrier et al. (2007) hanno analizzato le caratteristiche funzionali degli amido Sgp-1 *nulli* di frumento tenero in prodotti estrusi. Il pane prodotto per il 50% da farina del genotipo Sgp-1 triplo *nulli* ha mostrato un notevole aumento dell'amido resistente e caratteristiche qualitative accettabili. Soh et al. (2006) hanno analizzato l'effetto di elevate percentuali di amilosio sulla qualità della pasta. Amidi con percentuali di amilosio dal 27 al 74%, prodotti attraverso esperimenti di ricostituzione con amidi di mais *high amylose*, sono stati utilizzati nella produzione di spaghetti. È stata riscontrata una tendenza al miglioramento del nervo della pasta all'aumentare del contenuto di amilosio. Aravind et al. (2013) hanno riportato una leggera perdita nel colore giallo in pasta prodotta con amidi ad alto contenuto di amilosio ma nessun effetto sulle proprietà sensoriali e sulla tessitura. Questi lavori evidenziano notevoli potenzialità per l'utilizzo di amidi *high amylose* nella produzione di pasta con caratteristiche qualitative superiori; tuttavia le informazioni sull'impatto tecnologico dei frumenti con amidi *high amylose* sono ad oggi limitate ed imprecise a causa dei modelli sperimentali utilizzati. La possibilità di utilizzare farine e semole *high amylose* rappresenta una nuova opportunità per il superamento di tali limiti e l'ottenimento di nuove conoscenze sul loro impatto tecnologico. In ragione della sua struttura "resistente", dovuta essenzialmente al network compatto proprio del gel di amilosio, l'amido ad alto contenuto di amilosio può essere utilizzato per preservare e migliorare la croccantezza dei prodotti sottoposti, in superficie, ad elevate temperature durante il processamento (Sajilata et al. 2006). Test condotti per rivelare la funzionalità dell'amido resistente nella produzione di *waffles* hanno mostrato una maggiore croccantezza rispetto al controllo e ad altre fibre tradizionalmente utilizzate nella formula del prodotto (Sajilata et al. 2006). Un aumento della croccantezza è stato rilevato anche nei cracker e nei toast francesi prodotti con l'aggiunta di amido resistente.

1.12. L'amido resistente

L'amido è il costituente maggiore nella cariosside di frumento e rappresenta la maggiore fonte di energia nell'alimentazione umana ed animale. Una proprietà funzionale dell'amido di particolare interesse per la nutrizione, è la sua suscettibilità alla digestione (Copeland et al. 2009). Esso viene digerito nell'intestino tenue e ridotto a zuccheri semplici. La suscettibilità dell'amido all'attacco enzimatico delle α -amilasi dipende dalla sua struttura chimico-fisica che presenta numerose varianti. Esiste una categoria di amidi che non viene digerita nell'intestino tenue e raggiunge l'intestino crasso, come parte della frazione della fibra alimentare, dove viene fermentata dalla microflora batterica intestinale. Questo "amido resistente" (RS: *Resistant Starch*) è stato definito come "l'amido e i prodotti della sua digestione che non vengono assorbiti nell'intestino tenue di individui sani" (Englyst e Cummings 1985; Asp 1992). Sono state definite cinque classi di amido resistente, in base alle caratteristiche strutturali dell'amido stesso e della matrice alimentare che lo contiene (Thompson 2000, Sharma et al. 2008; Hasjim et al. 2010; Birt et al. 2013):

- *L'amido resistente di classe 1 (RS1)* è inaccessibile all'attacco enzimatico a causa del tessuto, organo o matrice alimentare che lo contengono;
- *L'amido resistente di classe 2* contiene due sottoclassi: RS2a corrisponde all'amido nel suo stato granulare non processato ed RS2b corrisponde ad amidi caratterizzati da un alto contenuto di amilosio che sono in grado di mantenere una percentuale significativa di granuli intatti durante il processamento;
- *L'amido resistente di classe 3 (RS3)* si riferisce ad una frazione di amido che si forma durante la cottura del prodotto alimentare attraverso il processo di gelatinizzazione dei granuli di amido e riassociazione delle molecole di amilosio rilasciate (retrogradazione). La frazione di amido retrogradato cresce al crescere del contenuto di amilosio;
- *L'amido resistente di classe 4 (RS4)* è l'amido chimicamente modificato attraverso reazioni di sostituzione;
- *L'amido resistente di classe 5 (RS5)* è l'amido in cui si formano complessi tra le catene dell'amilosio e le ramificazioni dell'amilopectina con i lipidi.

La resistenza dell'amido alla digestione è influenzata da molte proprietà del granulo come ad esempio: le dimensioni, la forma, l'organizzazione cristallina, i lipidi, le proteine ed il contenuto di fosfati ed amilosio (Lafiandra et al. 2014.). Inoltre, anche la trasformazione alimentare può influire sulla digeribilità dell'amido (Alsaffar 2011). L'amilosio può contribuire all'aumento della frazione dell'amido resistente attraverso due meccanismi differenti: contribuendo all'integrità dei granuli di amido nel prodotto alimentare processato e attraverso la retrogradazione derivante dalla gelatinizzazione e dispersione dell'amido nell'alimento (Morell et al. 2004). L'RS ha effetti fisiologici benefici (Nugent 2005) associati ai prodotti rilasciati durante la fermentazione nell'intestino crasso, in modo particolare alla produzione di SCFAs. Questi metaboliti sono importanti per l'intestino e contribuiscono al suo fabbisogno energetico (Topping 2007). Gli effetti benefici della fermentazione dell'RS2 di mais, ad alto

contenuto di amilosio, sono stati recentemente dimostrati su uno studio di risposta trascrizionale su cellule di topo (Keenan et al. 2012). La fermentazione dell'RS altera l'espressione di geni coinvolti nella crescita cellulare, la proliferazione e la differenziazione delle cellule dell'intestino, nonché l'espressione di geni coinvolti nell'apoptosi. L'aumento dell'espressione genica, inoltre, sembra migliorare la struttura e la funzione del tratto gastro-intestinale (GI: *gastro-intestinal*). Gli SCFA svolgono un ruolo importante nella abbassamento del pH nel tratto GI, che contribuisce al controllo della proliferazione di batteri patogeni ed evita la formazione di composti citotossici nocivi.

Un miglioramento della regolazione del glucosio nel sangue è stato associato con il consumo di cereali ricchi di RS (Akerberg et al. 1998; Granfeldt et al. 1995; Li et al. 2011; Hallström et al. 2011). L'RS è simile a NSP in quanto può ritardare lo svuotamento gastrico, ridurre il tasso di assorbimento del glucosio e può essere fermentato dai batteri del colon, producendo SCFAs (Slavin e Green 2007; Pereira e Ludwig 2001; Bodinham et al. 2010).

Il metabolismo dell'RS nell'intestino crasso è associato con la produzione di alti livelli di butirrato rispetto ad altri tipi di fibre (Topping e Clifton 2001; Topping et al. 2008). L'RS può aiutare a controllare il peso corporeo poiché è in grado di prolungare il senso di sazietà, a causa della sua bassa densità energetica e dalla sua capacità di essere fermentato dai batteri del colon producendo gli SCFA (Slavin e Green 2007, Pereira e Ludwig 2001; Bodinham et al. 2010). Il consumo di amido resistente nella dieta rappresenta anche un modo naturale per aumentare gli ormoni intestinali, quali il *glucagon-like peptide* (GLP-1) e il peptide YY (PYY) che sono efficaci nel ridurre l'apporto energetico (Keenan et al. 2006). I segnali degli ormoni PYY e il GLP-1, associati con l'uso di RS nella dieta, possono alterare l'equilibrio energetico a lungo termine interagendo con percorsi neuronali nel cervello e hanno anche altri benefici come il miglioramento della salute intestinale (Slavin 2013).

La dimostrazione che la quantità di RS2 e la capacità a formare RS3 sono influenzate dal contenuto di amilosio (Morell et al. 2004; Rahman et al. 2007) ha suscitato un maggior interesse ad aumentare la quantità di l'amido resistente attraverso la manipolazione dei geni coinvolti nella via biosintetica dell'amido, utilizzando approcci di *breeding* classici e non.

1.12.1. Composizione dell'amido influenzata da mutazioni naturali o indotte

Negli ultimi anni, la manipolazione del rapporto amilosio/amilopectina nei cereali è stato il principale *target* per la produzione di amido con nuove proprietà funzionali e con maggiori benefici per la salute. Sono state ampiamente studiate sia mutazioni naturali che indotte, con lo scopo di aumentare la ristretta variazione genetica per le caratteristiche dell'amido, nelle specie coltivate. Gli studi effettuati su mais, riso, orzo e frumento hanno indicato che la mancanza dell'attività degli enzimi SSII o SBE (SBEIIa e SBEIIb) è più efficace per aumentare il contenuto di amilosio nella cariosside. Diversi mutanti che influenzano la quantità e la composizione dell'amido di mais sono stati identificati fin dalla metà del novecento (Creech et al. 1963; Creech 1965). La scoperta dell'allele *ae* (*amylose extender*) da parte di Vineyard and Bear (1952), che aumenta il contenuto di amilosio in mais, senza influire in modo significativo sulla quantità di amido totale, ha aperto la strada per un'intensa attività di miglioramento,

sia nel settore pubblico che privato, con l'ottenimento di varietà ibride di mais con effetti desiderabili sulle qualità agronomiche ed un alto contenuto di amilosio, chiamate *Amylomaize* (Ferguson 2001).

Varietà commerciali di mais ad alto contenuto di amilosio pari al 50, 60 e 70% vengono rispettivamente classificate come *amylomaize* V, VI e VII (Jiang et al. 2010). L'attività di miglioramento genetico ha prodotto linee di mais con un contenuto di amilosio fino a 85-90% (Campbell et al. 2007 e Li et al. 2008). In orzo il primo mutante ad alto contenuto di amilosio (45%) è stato identificato da Merritt (1967) ed il gene che controlla questa caratteristica è stato nominato *amo 1* da Eslick e Ullrich (1977). Il trattamento mutageno con sodio azide dei semi della varietà Himalaya 292 di orzo, ha permesso l'identificazione di mutanti *loss of function* per il gene *SSIIa* con un contenuto di amilosio che va dal 65% al 70% (Morell et al. 2003).

Mutageni chimici e fisici sono stati utilizzati anche in nella varietà di riso *japonica* per introdurre nuova variabilità allelica nei geni implicati nella via biosintetica dell'amido (Yang et al. 2006). Yano et al. (1995) identificarono 5 linee mutagenizzate con un contenuto di amilosio tra il 29,4% ed il 32,4% in confronto al 17,4% delle normali varietà.

Il trattamento con N-metil-N-nitrosurea dei semi della varietà *japonica* Ilpumbyeo, ha portato alla produzione della nuova varietà Goami 2, con un contenuto di amilosio del 34% rispetto alla varietà di partenza che aveva 18,63% (Kang et al. 2003). Butardo et al. (2012) ipotizzarono che il contenuto di amilosio più elevato di Goami 2 potesse essere dovuto ad una mutazione responsabile per la cattura e l'accumulo della proteina SBEIIb all'interno dei granuli di amido in quantità molto maggiore rispetto a Ilpumbyeo. Questo potrebbe impedire all'enzima SBEIIb di svolgere il suo ruolo nella biosintesi dell'amido perchè la sua attività principale si verifica sulla superficie dei granuli.

Analisi SDS-PAGE delle proteine legati ai granuli di amido di una collezione di linee di frumento tenero, provenienti da diversi paesi, ha permesso a Yamamori e Endo (1996) di identificare mutanti privi di ognuna delle tre possibili proteine omeologhe SSIIa. I tre diversi mutanti singoli *nulli* sono stati incrociati per la produzione di linee di frumento tenero mancanti di tutte e tre le proteine amido sintasi da Yamamori et al. (2000). Il contenuto di amido di queste linee era circa il 20% più basso confrontato con il normale frumento, mentre il contenuto di amilosio era del 37,4%. Attraverso l'utilizzo dei mutanti SGP-A1 e SGP-B1 identificati da Yamamori e Endo (1996), Lafiandra et al. (2010) hanno prodotto delle linee parziali e *nulli* nella cultivar italiana Svevo di frumento duro. La linea *nulli* completa SSIIa mostra un contenuto di amilosio del 43,6% in confronto al 23% di Svevo. Più recentemente Hogg et al. (2013) hanno prodotto una linea di frumento SGP-1 *nulli* combinando un mutante naturale e uno indotto con EMS. Tale linea ha mostrato un forte aumento nel contenuto di amilosio (44,3%) rispetto al wt (28,7%). Lo sviluppo della tecnologia TILLING ha permesso la generazione e l'identificazione di nuova variabilità allelica nei geni coinvolti nella biosintesi dell'amido da diversi gruppi di ricerca. Slade et al. (2005) hanno analizzato i geni *waxy* in due popolazioni mutagenizzate, una di frumento duro e l'altra di frumento tenero, mentre Sestili et al. (2010a) hanno identificato mutanti *nulli* per i geni SSIIa e *waxy* in frumento tenero.

Diverse applicazioni TILLING si sono concentrate sull'analisi dei geni *SBEIIa* e *SBEIIb* per modificare la composizione dell'amido sia in frumento tenero che in frumento duro (Uauy et al. 2009; Hazard et al. 2012; Slade et al. 2012; Bovina et al. 2014). In questi lavori, i genotipi singoli mutanti non hanno mostrato un aumento significativo del contenuto di amilosio e di amido resistente mentre nei genotipi doppio nulli è stato osservato un incremento di amilosio superiore a circa il 150% rispetto alle linee di controllo.

Kadaru et al. (2006) ha utilizzato l'EcoTILLING per identificare varianti alleliche nei geni *SSIa* e *waxy* in 57 accessioni *inbred* di riso.

Anche l'RNAi, offre un valido approccio per manipolare la composizione dell'amido in frumento, con la capacità di silenziare simultaneamente tutti gli omeoalleli dei geni target (Regina et al. 2006; Sestili et al. 2010b).

1.13. Le rese in frumento

A causa del rapido aumento dei prezzi alimentari e della domanda di biocarburanti, dell'impatto dei cambiamenti climatici e della necessità di soddisfare le esigenze alimentari per la crescita della popolazione, vi è l'urgente necessità di migliorare la produzione agricola dei cereali (Godfray et al. 2010).

Il frumento fornisce circa il 20% delle calorie consumate dalla popolazione mondiale ed una percentuale simile di proteine (Braun et al. 2010). Considerando ciò, un sostanziale incremento della sua capacità produttiva e l'adozione di pratiche agronomiche migliori sarebbero necessarie per assicurare il fabbisogno alimentare ed un uso sostenibile delle risorse nel prossimo futuro. Attualmente, nonostante la necessità di ottenere un incremento di produttività dell'1,7% annuo fino al 2050 (Rosegrant e Agcaoili 2010), la produttività a livello globale cresce solamente dell'1,1% (Dixon 2009). I cambiamenti climatici, la diminuzione delle risorse naturali e la competizione per i terreni rischiano di ridurre ulteriormente la produttività (Datta e de Jong 2002; Easterling 2007; Lobell et al. 2008; Battisti e Naylor 2009; Rosegrant e Agcaoili 2010). Un possibile approccio per aumentare la produzione potrebbe essere l'aumento della superficie coltivata, questo però non è auspicabile per la sostenibilità a lungo termine dell'ecosistema globale. Una soluzione più diretta a tale problema potrebbe essere quella di aumentare la produttività attraverso l'adozione di cultivar ad elevata resa.

Un indice della produttività del frumento è la resa in granella, un carattere quantitativo sotto controllo multigenico caratterizzato da una bassa ereditabilità e modulato dall'interazione genotipo-ambiente. Anche se la resa si concretizza nell'ultima fase di sviluppo, essa risulta influenzata da diversi processi biologici che si verificano durante l'intero ciclo vitale della pianta. Sono molti i geni che influenzano il tasso di resa in granella, inclusi i geni che controllano la capacità fotosintetica e quelli che conferiscono resistenza a condizioni di stress biotico e abiotico.

1.14. Produttività potenziale del frumento

Il potenziale di resa (YP, *Yield Potential*) è definito come la produttività che ha un genotipo allevato in un determinato ambiente agronomico dove gli stress biotici vengono controllati e vi è un adeguato apporto sia idrico che di sostanze nutritive (Acevedo e Fereres 1993). Da un punto di vista fisiologico, l'YP può essere espresso come il prodotto della luce intercettata (LI, *Light Intercepted*), per l'efficienza nell'uso della radiazione (RUE, *Radiation Use Efficiency*), per l'indice di raccolta (HI, *Harvest Index*; Figura 1.8). Per RUE si intende l'efficienza delle piante nel convertire energia radiante in materiale secco; mentre per HI, la quantità di biomassa allocata nella granella (Reynolds et al. 2009a).

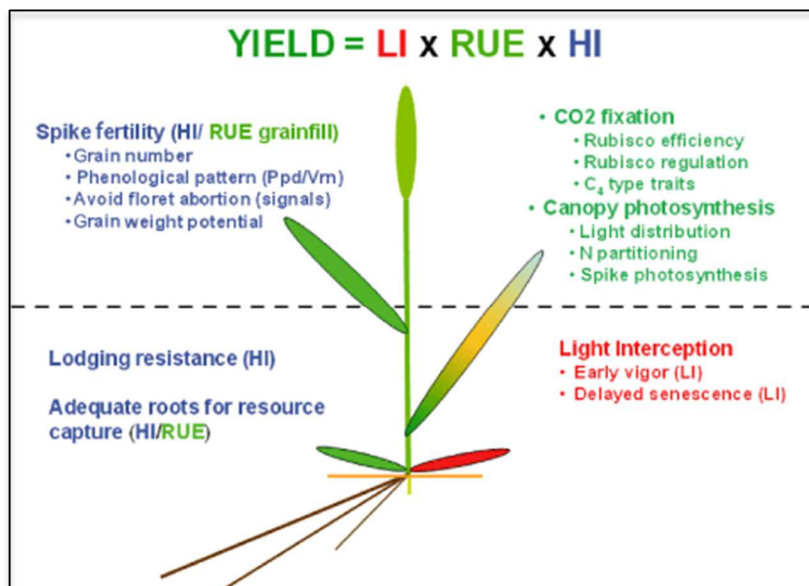


Figura 1.8. Modello concettuale delle caratteristiche che contribuiscono al potenziale di resa. Tratto da Reynolds et al. (2012).

Nel corso del XX secolo, il miglioramento genetico del frumento ha cercato maggiormente di aumentare l'HI; non solo attraverso l'introduzione dei geni *Rht* (Gale e Youssefian 1985; Calderini et al. 1995), ma anche grazie alla continua selezione di caratteri associati alle rese nel periodo successivo alla Rivoluzione Verde (Calderini et al. 1995; Sayre et al. 1997). Le caratteristiche relative all'LI, come ad esempio il portamento ed il ritardo della senescenza, presentando una significativa variazione nei *pool* genici convenzionali ed un'alta predisposizione alla selezione fenotipica, non rappresentano “il collo di bottiglia” per il miglioramento dell'YP. Mentre, considerazioni teoriche indicano che l'YP del frumento potrebbe essere aumentato fino al 50% attraverso il miglioramento genetico della RUE (Reynolds et al. 2009a).

In generale, un aumento in biomassa della parte aerea del frumento è stato raggiunto negli ultimi anni soprattutto attraverso l'utilizzo di germoplasma esotico (Singh et al. 1998; Reynolds et al. 1999; Donmez et al. 2001; Shearman et al. 2005). Tale aumento ha comportato un notevole miglioramento dell'equilibrio tra i tessuti fotosinteticamente attivi e non, favorendo l'aumento della RUE (Reynolds et al. 2009a).

Con l'avanzare del sequenziamento del genoma di frumento (<http://www.wheatgenome.org>) e con lo sviluppo di tecniche ad alta processività per l'analisi di polimorfismi sarà possibile ottenere una migliore comprensione genetica delle caratteristiche che determinano o controllano l'YP. La caratterizzazione dei geni legati all'aumento delle rese sarà funzionale ad un loro utilizzo in programmi di miglioramento genetico.

1.15. Incremento della capacità fotosintetica e della sua efficienza (RUE)

Diverse ricerche indicano che un sostanziale incremento dell'YP potrebbe derivare dal miglioramento nella capacità fotosintetica e/o della sua efficienza (Reynolds et al. 2012). In riso, per esempio, è stato aumentato il numero potenziale di semi, ma soltanto il 40% delle infiorescenze risultavano fertili e

venivano riempite (Sheehy et al. 2007). Questi fenomeni indicano che, la limitazione di sostanze nutritive da destinare alla fase riproduttiva, dovuta ad insufficiente approvvigionamento di fotosintetati, è uno degli aspetti chiave che regola la produttività. In frumento, essendoci un maggiore equilibrio tra organi fotosintetici e non, notevoli incrementi nell'YP sono stati associati ad un aumento della fotosintesi (Fischer et al. 1998). Inoltre la ricerca di base, implicata a studiare i processi legati alla fotosintesi, ha confermato che sostanziali miglioramenti sono teoricamente ancora possibili (Parry et al. 2007; Zhu et al. 2010).

Un approccio perseguibile per aumentare la RUE in frumento potrebbe essere quello di migliorare il primo step di fissazione della CO₂ nella fotosintesi catalizzato dall'enzima Rubisco e la seguente rigenerazione del suo co-substrato, il ribulosio-1,5-bifosfato (RuBP). La Rubisco è la proteina più abbondante nelle piante C₃ e possiede una bassa attività catalitica. Quindi una strategia per migliorare l'efficienza fotosintetica sarebbe quella di aumentare la capacità catalitica dell'enzima (Reynolds et al. 2009b). Inoltre, la Rubisco catalizza l'ossigenazione della RuBP avviando la fotorespirazione con un rilascio di CO₂, NH₃ e perdita di energia. Poiché sia l'O₂ che la CO₂ competono per la reazione con il RuBP, le quantità relative di carbossilazione ed ossigenazione dipendono dalla concentrazione di O₂ e CO₂ presente nell'ambiente. A temperature più elevate, l'attività ossigenasica della Rubisco (fotorespirazione) diventa più significativa sfavorendo la carbossilazione del RuBP (Long et al. 2006). La doppia specificità della Rubisco ha un serio impatto sull'efficienza dell'uso dell'acqua; infatti, la chiusura stomatica porta a un minor rapporto di CO₂/O₂ rendendo l'assimilazione di carbonio meno efficiente. Inoltre, uno scambio gassoso attraverso gli stomi completamente aperti farebbe aggravare la perdita di acqua (Parry et al. 2005). Al contrario, i meccanismi di concentrazione del carbonio adottati dalle piante C₄, hanno ampiamente superato questo problema. Una strategia quindi alternativa, potrebbe essere quella di introdurre nelle piante C₃ forme di Rubisco con una maggiore specificità per la CO₂. Da studi sulle proprietà cinetiche della Rubisco, si è visto che alcune piante hanno evoluto forme di enzima in grado di discriminare più fortemente contro l'O₂. Tra le piante C₃ il fattore di specificità varia tra 80 e 110. (Delgado et al. 1995; Et di Galme al. 2005). Queste differenze dimostrano che la variazione naturale potrebbe essere sfruttata per migliorare sia la specificità per la CO₂ che il tasso catalitico della Rubisco con conseguente aumento della capacità e/o dell'efficienza fotosintetica (Parry et al. 1987, 2007). Per esempio, modelli teorici indicano che la sostituzione della Rubisco nativa di frumento con quella della specie *Limonium gibertii* potrebbe essere in grado di portare ad un incremento netto del 60% nella fotosintesi con un conseguente aumento del YP. Sebbene molti progressi, siano stati fatti nello sviluppo di strumenti per l'introduzione di geni nel genoma nucleare delle cultivar d'élite di frumento (Pastori et al. 2001; Shewry e Jones 2005), la trasformazione del genoma dei plastidi è ancora difficile da effettuare e limitata alle specie modello (Malinga 2004). Ad oggi, le complessità nell'assemblare la subunità grande e la subunità piccola della Rubisco in un oleoenzima funzionale *in vivo* (richiedendo alti livelli di espressione, interazione con chaperonine, modifiche post-traduzionali e l'interazione con la *Rubisco activase*) rimangono le maggiori sfide.

Le piante C₄, come ad esempio il mais, hanno sviluppato un meccanismo più efficiente per organizzare la CO₂ attraverso la presenza di due tipi di cellule funzionalmente e morfologicamente diverse, le cellule del mesofillo e quelle della guaina del fascio (anatomia Kranz). Le piante C₄ mantengono alta la concentrazione della CO₂ nelle cellule della guaina del fascio ed in questo modo l'attività ossigenasica della Rubisco viene repressa. Un approccio alternativo per superare le limitazioni della Rubisco nelle piante C₃ è di aumentare la concentrazione di CO₂ nel sito catalitico. Un aumento notevole delle rese sarebbe possibile attraverso l'introduzione del meccanismo di concentrazione del carbonio delle piante C₄ nelle piante C₃. La complessità dell'anatomia Kranz ed del ciclo delle piante C₄ ha dissuaso i ricercatori nel tentare di introdurre tale sistema nelle piante C₃. Tuttavia, data la disponibilità di un ampio germoplasma sia in riso che in frumento, potrebbe essere possibile identificare e selezionare le caratteristiche dell'anatomia Kranz in alcuni genotipi. Infatti, l'*International Rice Research Institute* (IRRI) sta attualmente studiando le diverse risorse genetiche disponibili con lo scopo di individuare piante con caratteristiche fotosintetiche il più simile possibile a quelle delle specie C₄ (Hibberd et al. 2008). Recentemente, la scoperta di pompe CO₂, che operano all'interno di una singola cellula di alcune specie, come ad esempio in *Hydrilla verticillata*, ha incoraggiato una serie di approcci biotecnologici con lo scopo di introdurle nelle piante C₃ come nel riso e nel frumento (Leegood 2002; Taniguchi et al. 2008). Alcune analisi teoriche sostengono che questo sistema sarebbe di grande beneficio sotto siccità o in altre condizioni che portano alla chiusura degli stomi con conseguente abbassamento della concentrazione di CO₂ intracellulare (Von Caemmerer 2003). Come per l'introduzione dell'intero sistema fotosintetico delle piante C₄ in quelle C₃, questo è molto difficile da perseguire poiché richiederebbe l'espressione coordinata di molti transgeni (Reynolds et al. 2009b).

La fotorespirazione ha un importante costo energetico, perché la riassimilazione dell'NH₃, prodotta durante la deaminazione della glicina, consuma tre molecole di ATP e tre di NADPH per ogni molecola di glucosio. Sono in fase di studio diversi approcci biotecnologici che hanno come scopo l'introduzione di enzimi batterici coinvolti nella via metabolica della fotorespirazione che non implicano il rilascio di NH₃ (Parry et al. 2003; Bari 2004). Attraverso questo meccanismo sarebbe possibile risparmiare energia da poter essere utilizzata in condizione di scarsa intensità luminosa.

Sotto un moderato stress da calore, l'attività fotosintetica diminuisce e viene inibita la Rubisco attivasi (Salvucci et al. 2001). La stabilità termica della Rubisco attivasi presenta variabilità tra le diverse specie e potrebbe essere studiata per migliorare le colture a maggior interesse agronomico come il frumento con lo scopo di limitare la sua inibizione soprattutto nelle regioni mediterranee soggette a condizioni climatiche estreme.

In vivo sono stati identificati diversi inibitori della Rubisco, come ad esempio il carbossiarabinitolo 1 fosfato (CA1P) (Gutteridge et al. 1986; Keys et al. 1995). Essi sono responsabili della sua bassa attività e vengono accumulati sotto condizioni di stress in quanto conferiscono una protezione dai danni ossidativi o proteolitici (Medrano et al. 1997). Attraverso la manipolazione dei processi biosintetici e delle vie di degradazione di questi inibitori potrebbe essere possibile modulare l'attività e la stabilità della Rubisco (Andralojc et al. 1996, 2002; Parry et al. 2008).

Un ultimo approccio, per aumentare il tasso fotosintetico totale, è quello di diminuirne la sottoregolazione che entra in gioco per proteggere l'apparato fotosintetico da un eccesso di radiazioni. Inoltre, quando la fase oscura diventa un ostacolo alla trasduzione di energia, è necessario considerare non solo le proprietà intrinseche del sistema, ma anche altri fattori indiretti quali ad esempio la capacità di assimilare i fotosintetati, la resistenza degli stomi e del mesofilo, la disponibilità di acqua e la temperatura (Flexas et al. 2004). Il ciclo delle xantofille permette di rispondere alle radiazioni in eccesso attraverso la dissipazione termica dell'energia nei tilacoidi. Il miglioramento genetico del tasso di rigenerazione delle xantofille è associata in riso ad un aumento della RUE in condizioni climatiche a intermittenza di cielo coperto e sole (Zhu et al. 2004). Per il miglioramento del tasso fotosintetico, oltre la capacità di rigenerazione del RuBP, altri possibili target potrebbero essere gli enzimi del ciclo di Calvin e principalmente la sedoeptulosio 1,7-bisfosfatasi (Lefebvre et al. 2005) o altri componenti della catena di trasporto degli elettroni e della cattura della luce (Long et al. 2006). In conclusione, molti approcci diversi potrebbero essere utilizzati per aumentare la capacità fotosintetica nel frumento. Tuttavia, lo scopo ultimo sarà quello di garantire che la maggior parte di biomassa prodotta sia poi convertita in granella favorendo un significativo aumento dell'HI. La partizione degli assimilati e i complessi meccanismi fisiologico-genetici che regolano la fertilità della spiga, accoppiati ad un sotto utilizzo della capacità fotosintetica nelle cultivar moderne, rafforzano la necessità di una migliore comprensione dei processi che determinano il numero e la grandezza delle cariossidi.

1.16. Incremento dell'indice di raccolta (HI)

Tra gli anni '70 e '90, durante la Rivoluzione Verde, le rese in frumento furono notevolmente incrementate attraverso l'introduzione dei geni *Rht-D1* e *Rht-B1*, responsabili dell'abbassamento della taglia (Foulkes et al. 2011). A partire dai primi anni '90, i progressi di miglioramento genetico sono stati inferiori rispetto al potenziale ipotetico HI del frumento (Sayre et al. 1997; Reynolds et al. 1999; Shearman et al. 2005). L'aumento delle rese nelle cultivar moderne potrà, quindi, essere raggiunto attraverso l'aumento della resa in granella. Questa caratteristica è influenzata dalla capacità fotosintetica, dalla competizione tra i diversi organi per gli assimilati e dalla loro interazione con fattori ambientali, quali fotoperiodo e temperatura. Un'adeguata ripartizione dei fotosintetati, tra gli organi della pianta, è fondamentale per garantire che spighe più pesanti siano sorrette da steli e radici abbastanza forti da evitare cedimenti strutturali (Berry et al. 2007). In frumento, l'allettamento è un fenomeno che può ridurre la resa dell'80% così come può ridurre la qualità della granella (Easson et al. 1993; Berry et al. 2007).

La resa in granella può essere suddivisa in componenti numeriche, quali il numero di piante per metro quadro, il numero di spighe per pianta, il numero di cariossidi per spighetta, il numero di semi per metro quadro ed il peso delle cariossidi (Slafer 2003). Per un'analisi semplificata, le due principali componenti della resa in granella, che vengono comunemente considerati, sono il numero di semi per metro quadro (GN, *Grain Number*) ed il peso dei mille semi (TGW, *Thousand Grain Weight*). Assieme ad altri caratteri agronomici importanti, come la resistenza a stress biotici, tutte le componenti della resa in

granella hanno un controllo multifattoriale, presentando una bassa ereditabilità ed una forte influenza ambientale. L'analisi dei caratteri quantitativi (QTLs, *Quantitative Trait Loci*) è stata utilizzata per studiare le componenti genetiche delle rese nei cereali. Il sequenziamento del genoma di riso (International Rice Genome Sequencing Project 2005) ha permesso di eseguire un'analisi genetica dettagliata ed isolare importanti QTL implicati nell'aumento delle rese. Anche il sequenziamento dei genomi di sorgo (*Sorghum bicolor*) (Paterson et al. 2009) e mais (*Zea mays*) (Schnable et al. 2009) è stato completato; mentre, sono ben avviati i lavori del *Barley Sequencing Consortium* (Schulte et al. 2009) e del *Wheat Genome Sequencing Consortium* (Ling et al. 2013) per il sequenziamento rispettivamente dei genomi di orzo e frumento. Attualmente, lo studio in riso dei QTL legati alle rese rappresenta un modello di riferimento importante per il frumento e per gli altri cereali.

1.16.1.1. Numero delle cariossidi

Il numero delle cariossidi è una delle componenti più importanti della resa in granella. Un suo aumento determina un potenziale incremento delle rese nelle colture. Il momento preciso, in cui si determina il potenziale numero di semi per spiga, corrisponde alla fase di allungamento dei culmi. Tale fase è direttamente correlata alla ripartizione degli assimilati, che avviene circa 20-30 giorni prima dell'antesi, momento in cui si ha lo sviluppo della spiga (Fischer 2009). La scarsa disponibilità di assimilati nella fase che precede l'antesi porta solo i culmi più sviluppati a sopravvivere. È stato dimostrato che il 70-90% dell'azoto totale viene assimilato prima dell'antesi. Una sua diminuzione in queste fasi potrebbe ridurre sia lo sviluppo vegetativo che la formazione di spighe fertili (Miralles e Slafer 1999). Per permettere una maggiore ripartizione degli assimilati, per lo sviluppo della spiga nella fase di pre-antesi, si potrebbe intervenire cercando di ottenere un maggior accumulo di fotosintetati, allungando il periodo temporale di questa fase. L'estensione di tale fase è stata manipolata attraverso i geni che controllano il fotoperiodo, come il gene *Ppd* (Foulkes et al. 2004). Per un miglioramento della produttività in frumento, sono noti in letteratura anche altri geni che controllano la data di fioritura e rispondono alla vernalizzazione (*Vrn*, *Vernalization response*), e geni che regolano la fioritura indipendentemente dai meccanismi di vernalizzazione e fotoperiodo (*Eps*, *Earliness* per sé; Yang et al. 2003; Dubcovsky et al. 2007).

Un altro fattore importante per modificare il GN è la manipolazione dell'architettura dell'infiorescenza durante le fasi cruciali di differenziazione del meristema. Un ottimo esempio è dato dall'allele recessivo *branched head* (*bh*), mappato sul braccio corto del cromosoma 2A (Klindworth et al. 1997), che mostra un fenotipo con un numero di spighe maggiori (Shitsukawa et al. 2009).

La capacità di accestimento è un altro importante fattore che contribuisce alla resa complessiva in frumento, poiché determina il numero di spighe per pianta. Il numero di culmi prodotti e la velocità con cui si sviluppano sono sotto controllo sia genetico che ambientale. In frumento il gene *tiller inhibition* (*tin*) mostra una ridotta capacità di accestimento, culmi più forti e spighe più grandi (Spielmeyer et al. 2004).

In riso, sono stati isolati diversi QTL che regolano il GN, tra i quali il più importante è *Grain number 1a* (*Gn1a*; Ashikari et al. 2005). *Gn1a* codifica per l'enzima citochinina ossidasi/deidrogenasi (OsCKX2), che degrada il fitormone citochinina. Una ridotta espressione di *Gn1a* causa l'accumulo delle citochinine nel meristema fiorale ed incrementa il numero degli organi riproduttivi portando ad un incremento del numero dei semi. La linea isogenica (NIL, *Near-Isogenic Line*) recante *Gn1a* mostra il 45% di semi in più per pannocchia e il 34% di semi in più per pianta rispetto alla linea wt (Ashikari et al. 2005).

Un altro QTL è rappresentato dall'allele mutato del gene *DEP1* (*DENSE AND ERECT PANICLE1*), responsabile per la produzione di una proteina *phosphatidylethanolamine-binding protein like domain* tronca. Le piante che portano la mutazione mostrano un incremento del GN ma presentano un minor TGW. Nonostante ciò, i mutanti hanno un aumento di produttività di circa il 40%, dovuto a fenotipi pleiotropici, quali: pannocchie dense ed erette (Huan et al. 2009).

Sempre in riso, *WFP* (*WEALTHY FARMER'S PANICLE*) e *IPA1* (*IDEAL PLANT ARCHITECTURE*), identificati indipendentemente, rappresentano lo stesso QTL che codifica per il fattore di trascrizione SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (OsSPL14; Jiao et al. 2010; Miura et al. 2010). Sia *WFP* che *IPA1* aumentano il numero dei semi aumentando il numero delle ramificazioni principali della pannocchia. Il livello di trascritto del gene *OsSPL14*, contenente la sequenza di riconoscimento per il microRNA *OsmiR156*, è elevato durante lo stadio vegetativo e diminuisce fino a scomparire all'inizio della fase riproduttiva. Attraverso questo meccanismo di regolazione fine, ad opera del microRNA *OsmiR156*, l'espressione di *OsSPL14* è limitata alle prime fasi dello stadio riproduttivo nelle piante WT. L'allele mutato *OsSPL14^{WFP}* mostra un'espressione nove volte maggiore rispetto al WT nella fase riproduttiva, probabilmente dovuta ad un effetto epigenetico nella regione del promotore e ciò comporta la formazione di un maggior numero di ramificazioni nella pannocchia (Miura et al. 2010). *IPA1* presenta invece un singolo polimorfismo (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) nella sequenza target del microRNA *OsmiR156* (Jiao et al. 2010). Tale mutazione in *OsSPL14* conferisce una resistenza al microRNA portando all'espressione ectopica del gene nella fase vegetativa e ad un'espressione maggiore in quella riproduttiva. Le piante *OsSPL14^{IPA1}* mostrano un aumento di ramificazioni principali nella pannocchia come quelle *OsSPL14^{WFP}*, tuttavia presentano anche un ridotto numero di culmi, probabilmente a causa dall'espressione ectopica del gene durante la fase vegetativa. Oltre a mostrare un aumento del numero dei semi, dovuto all'aumento dei ramificazioni principali, le piante recanti l'allele *OsSPL14^{IPA1}* mostrano anche un aumento dei fasci vascolari e delle cellule dello sclerenchima (Jiao et al. 2010). Queste osservazioni suggeriscono che la regolazione dell'architettura vegetale conferita da *OsSPL14* ha il potenziale di aumentare le rese in riso. In una popolazione BC₂F₂, il numero di semi della linea omozigote per l'allele *OsSPL14^{WFP}* è superiore del 41% rispetto a quello della linea omozigote per l'allele WT. Quando *OsSPL14^{WFP}* viene combinato con *Gn1a*, le piante arrivano a produrre il 52% di semi in più rispetto a quelle WT (Miura et al. 2010).

1.16.1.2. Dimensione delle cariossidi

La grandezza delle cariossidi è un'altra delle componenti più importanti su cui si può intervenire per aumentare le rese in frumento. Anche questa, come il numero delle cariossidi, è una caratteristica controllata da QTL ed è anch'essa influenzata notevolmente dall'ambiente. Cariossidi più grandi favoriscono la germinazione, la crescita iniziale e migliorano la qualità molitoria, aumentando direttamente la resa finale in farina.

La dimensione dei semi è una caratteristica che è stata selezionata durante la domesticazione (Fuller 2007; Brown et al. 2009) ed è tutt'ora uno dei maggiori target dei programmi di miglioramento genetico sia del frumento tenero che del frumento duro (Gegas 2010). La resa in granella è solitamente rappresentata nelle pratiche di miglioramento genetico dal TGW, determinato principalmente dalla grandezza del seme (GW, *Grain Weight*), dalla lunghezza (GL, *Grain Length*), dallo spessore (GT, *Grain Thickness*) e dal tasso di riempimento della cariosside (Campbell et al. 2008; Dholakia et al 2003). Tutti e quattro gli aspetti sono correlati positivamente con il TGW e l'aumentare di una delle tre componenti della dimensione della cariosside può migliorare la resa nei programmi di miglioramento genetico.

Studi recenti hanno portato all'identificazione di geni che regolano le dimensioni ed il tasso di riempimento della granella in riso. *GS3* è stato il primo importante QTL in questa categoria e contribuisce sia alla lunghezza che al peso dei grani (Fan et al. 2006). Mao et al. (2010) hanno caratterizzato quattro alleli per questo QTL. L'allele *GS3-1* porta alla produzione di semi con una lunghezza media e codifica per una proteina di 231 amminoacidi. Tale proteina presenta quattro domini: all'N-terminale un dominio *organ size regulation* (OSR), un dominio transmembrana, un dominio della famiglia *cysteine-rich*, chiamato *tumor necrosis factor receptor/nerve growth factor receptor* (TNFR/NGFR) ed un dominio al C-terminale definito *von Willebrand* fattore di tipo C (VWFC). L'allele *GS3-2* conferisce anche esso una lunghezza media della cariosside e presenta un'inserzione di tre paia di basi nella regione codificante. L'allele *GS3-3* mostra un seme allungato e presenta una sostituzione da C ad A, 165 paia di basi a valle del sito di inizio della traduzione, che causa una interruzione prematura della proteina e alla perdita di tutti e quattro i domini. Mentre, l'allele *GS3-4* causa la formazione di cariossidi più corte e presenta una delezione di una base, 357 paia di basi a valle del sito di inizio della traduzione, responsabile della perdita dei domini TNFR/NGFR e VWFC. Da queste osservazioni e attraverso approcci transgenici è stato possibile comprendere che questi domini svolgono differenti funzioni nella regolazione della grandezza della cariosside. Il dominio OSR è necessario e sufficiente per far svolgere alla proteina una funzione di regolatore negativo della grandezza della cariosside. I domini TNFR/NGFR e VWFC hanno un effetto inibitorio nei confronti del dominio OSR; mentre, la perdita di funzione in questi due domini porta alla produzione di cariossidi molto piccole.

Un altro QTL, relativo all'aumento delle dimensioni dei semi in riso, è *qSW5/GW5* (Shomura et al. 2008; Weng et al. 2008). Esperimenti di RNAi hanno mostrato una diminuzione del peso dei semi del 13%, dovuta ad una diminuzione del numero delle cellule nella glumetta esterna. Questi dati

suggeriscono che *qSW5/GW5* potrebbe essere coinvolto nella proliferazione delle cellule del glumetta (Miura et al. 2011).

GRAIN INCOMPLETE FILLING 1 (GIF1) è un gene invece che regola il tasso di riempimento delle cariossidi ed è stato mappato sul cromosoma 4 di riso. Questo gene codifica per una invertasi della parete cellulare, necessaria per la ripartizione del carbonio durante le fasi iniziali del riempimento dei semi (Wang et al. 2008b). Cariossidi di piante *gif1 (loss-of-function)* accumulano livelli di glucosio, fruttosio e saccarosio significativamente più bassi rispetto al WT. Questo minor accumulo di zucchero nel mutante *gif1* porta ad una notevole diminuzione del peso dei semi. Dati sperimentali suggeriscono che un'elevata espressione tessuto specifica del gene *GIF1* potrebbe fornire un mezzo per aumentare il tasso di riempimento della granella (Wang et al. 2008b).

Recentemente è stato visto che la sovra-espressione nell'intera pianta di un membro in riso della famiglia genica TIFY, *TIFY11b*, porta ad un incremento delle dimensioni e del peso della cariosside. Ciò avviene attraverso un incremento dell'accumulo dei carboidrati nel culmo e nella guaina fogliare prima della spigatura, mobilizzando poi i carboidrati di riserva nella cariosside in fase di maturazione (Hakata et al. 2012).

Il gene *OsSPL16*, isolato dal QTL *GW8* di riso, codifica per una proteina che regola positivamente la proliferazione cellulare. Una sovra-espressione di questo gene favorisce la divisione cellulare ed il tasso di riempimento della cariosside andando ad influire poi sulla larghezza del seme e sulla resa. Invece, una mutazione non senso nel riso Basmati porta alla formazione di una cariosside più sottile ed una migliore qualità legata alla granella. Wang et al. (2012) hanno dimostrato come una strategia di *marker-assisted selection* (MAS), per gli alleli superiori dei geni *GS3* e *OsSPL16*, può essere usata efficacemente per migliorare la qualità e la resa in riso.

Zhang et al. (2012) hanno clonato e caratterizzato funzionalmente un importante QTL per la lunghezza delle cariossidi in riso, *qGL3*, che codifica per una putativa proteina fosfatasi con dominio ripetuto di tipo Kelch (*OsPPKL1*). L'allele "raro" *qgl3*, codifica per una proteina con una sostituzione amminoacidica nel motivo conservato AVLDT del secondo dominio Kelch, e piante recanti tale allele mostrano un seme di lunghezza superiore. Nel genoma di riso sono presenti altri due geni omologhi, *OsPPKL2* e *OsPPKL3*. Studi di trasformazione genica hanno dimostrato che *OsPPKL1* e *OsPPKL3* regolano negativamente la lunghezza delle seme mentre *OsPPKL2* funziona come regolatore positivo. Prove agronomiche in campo hanno dimostrato che l'allele *qgl3* aumenta effettivamente la resa in riso conferendo alle piante la capacità di produrre delle cariossidi più lunghe (Zhang et al. 2012).

In riso, Song et al. (2007) hanno clonato e caratterizzato un altro importante QTL (*GW2*) che controlla negativamente la larghezza ed il peso dei semi. *GW2* codifica per una ubiquitina ligasi E3 di tipo RING e nel sottocapitolo 3.4 sarà approfondita la sua descrizione.

Nel frumento sono stati identificati diversi QTL per la resa in granella (Kato et al. 2000; McCartney et al. 2005; Röder et al. 2008) tuttavia, nessun gene è stato isolato ed ampiamente caratterizzato. Peng et al. (2003), attraverso la mappatura dei QTL e la mappatura genica di associazione, hanno dimostrato che il cromosoma 1B controlla le rese in frumento ed è associato alla lunghezza della spiga, al numero

delle spighe, al numero delle cariossidi per spiga, alla resa in granella, al numero dei culmi e all'altezza della pianta. Nella regione prossima al centromero del cromosoma 6AS, un importante e stabile QTL per le rese è stato identificato in linee doppio aploidi (DH) e inbred ricombinanti (RIL) di frumento (Snape et al. 2007; Sun et al. 2009). Precedentemente, Wang et al. (2007), attraverso analisi di associazione, hanno identificato associasionetra i marcatori *Xcfe273* e *Xgpc7592* con le componenti delle rese, come la fertilità dei culmi ed il numero delle cariossidi per spiga. In seguito anche Mir et al. (2011) hanno identificato sul cromosoma 6AS un QTL importante per le dimensioni del seme (*QGW.ccsu-6A.2*), definito dall'intervallo dei marker *Xbarc3* e *Xbarc146b*. Tale QTL è stato mappato nella stessa regione di *TaGW2*, ortologo in frumento del gene *GW2* di riso (Su et al. 2011).

1.17. Il gene *Grain Weight 2* (GW2)

In riso, *Grain Weight 2* (*GW2*) rappresenta uno dei QTL principali che regola la larghezza ed il peso della cariosside (Song et al. 2007). Il locus del gene responsabile per tale QTL è stato mappato sul cromosoma 2, in una regione genomica di 8.2 Kb. All'interno di tale regione è stata trovata una sola *Open Reading Frame* (ORF), il gene *OsGW2*. Questo gene è composto da otto esoni e sette introni (Figura 1.9a) e la sua sequenza codifica per una proteina di 425 amminoacidi (47 kDa). Una diminuzione dell'espressione di *OsGW2*, ottenuta tramite un approccio RNAi, porta all'aumento (14%) della larghezza del seme; mentre, le linee che sovra-esprimono il gene mostrano una significativa diminuzione (17%) della larghezza del chicco di riso. Una mutazione naturale in questo gene è stata ritrovata nelle varietà WY3 ed Oochikara. La delezione di una adenina, in posizione 316 della sequenza codificante (esone 4; Figura 1.9a), porta alla formazione di un codone di stop prematuro e alla traduzione di una proteina tronca di 115 aminoacidi (13 kDa). Le varietà WY3 e Oochikara presentano dei semi più grandi rispetto alla varietà FAZ1 che possiede l'allele WT di *GW2* (Figura 1.9b). Per determinare la funzione di *GW2* nello sviluppo del chicco di riso, gli autori hanno creato una NIL (*GW2*) contenente una regione di 1,4 cM con il locus *GW2* della varietà WY3, nel *background* genetico della varietà FAZ1. La linea NIL (*GW2*) mostra un aumento del TGW del 49,8% ed un aumento della larghezza, dello spessore e della lunghezza del seme rispettivamente del 26,2%, 10,5% ed 6,6% rispetto alla varietà FAZ1 (Figura 1.9d). La resa in granella ed il numero di spighe per pianta sono aumentate rispettivamente del 19,7% e del 27%, mentre il numero di semi per pannocchia è diminuito del 29,9% nella linea NIL (*GW2*). L'altezza della pianta e la larghezza della foglia bandiera non differiscono significativamente tra le due linee. Le glumette sono significativamente più grandi nella NIL (*GW2*) rispetto alla varietà FAZ1 (Figura 1.9c). Sezioni trasversali delle glumette mostrano che, nella NIL (*GW2*), lo strato esterno del parenchima è più lungo del 29,6%, rispetto alla varietà FAZ1, grazie ad un numero di cellule maggiore (Figura 1.9e). Inoltre, la sezione trasversale di semi maturi mostra che le cellule dell'endosperma sono più grandi del 39,5% nella linea NIL (*GW2*) e non vi è nessuna differenza nel numero di cellule rispetto alla varietà WT (Figura 1.9f). Il tasso di riempimento della cariosside nella linea NIL (*GW2*) risulta maggiore rispetto alla varietà FAZ1 già dopo 17 giorni dall'antesi ed il peso fresco del seme è superiore del 47,8%. Come descritto, il gene *GW2* regola le dimensioni della cariosside e non influisce sulle

caratteristiche qualitative della stessa. Infatti, non è stata trovata alcuna differenza per quanto riguarda il contenuto di amilosio tra la linea NIL (GW2) e FAZ1 (Song et al. 2007).

Il gene *GW2* è costitutivamente espresso in diversi organi della pianta e non sono state trovate differenze nel livello di espressione tra la linee NIL (GW2) e FAZ1. *GW2* codifica per un enzima con attività ubiquitina ligasi E3 di tipo RING, implicata nella degradazione delle proteine attraverso il proteosoma 26S, ed ha una localizzazione subcellulare citoplasmatica.

In sintesi, una perdita di funzione del gene *GW2* in riso, provoca l'aumento della dimensione del rivestimento esterno alla cariosside, indirettamente accelera il tasso di riempimento del seme ed aumenta le dimensioni delle cellule dell'endosperma, consentendo quindi la produzione di cariossidi più grandi e più pesanti. Inoltre, Song et al. (2007) descrivono *GW2* come un regolatore negativo della divisione cellulare a livello del rivestimento esterno del chicco di riso. Questo enzima riconosce specificamente la proteina bersaglio e la induce alla degradazione tramite il proteosoma 26S (Figura 1.9g). La proteina target di *GW2* è ancora sconosciuta e studi in vitro hanno mostrato che la proteina tronca dell'allele WY3, presente nella NIL (GW2), possedeva ancora l'attività E3 (Figura 1.9h). La perdita di funzione della proteina *GW2* potrebbe essere causata dalla perdita del dominio di legame con la proteina bersaglio nella regione C-terminale (Figura 1.9h).

Recentemente in riso, al fine di determinare le relazioni tra i quattro geni coinvolti nella resa in granella (*GS3*, *qSW5/GW5*, *GIF1* e *GW2*), è stata condotta un'analisi trascrizionale nelle pannocchie di piante transgeniche che sotto-esprimono questi geni (Yan et al. 2011). Nelle linee *GW2* RNAi, il livello di trascritto del gene *GS3* è ridotto di 3 volte, mentre quello di *GIF1* risulta essere 2,5 volte più elevato. La sotto-regolazione del gene *GW2* inoltre non ha alcun effetto sui livelli trascrizionali di *qSW5/GW5*. Similmente, nessuna differenza significativa nell'espressione di *GW2* è stata trovata nelle piante che sotto-esprimono *GS3*, *GIF1* e *qSW5/GW5*. In conclusione, *GW2* regola positivamente l'espressione di *GS3* e negativamente quella di *GIF1*. (Yan et al. 2011).

Questi nuovi risultati forniscono delucidazioni sui meccanismi molecolari che regolano le dimensioni dei semi in riso e possono essere utili per programmi di miglioramento genetico.

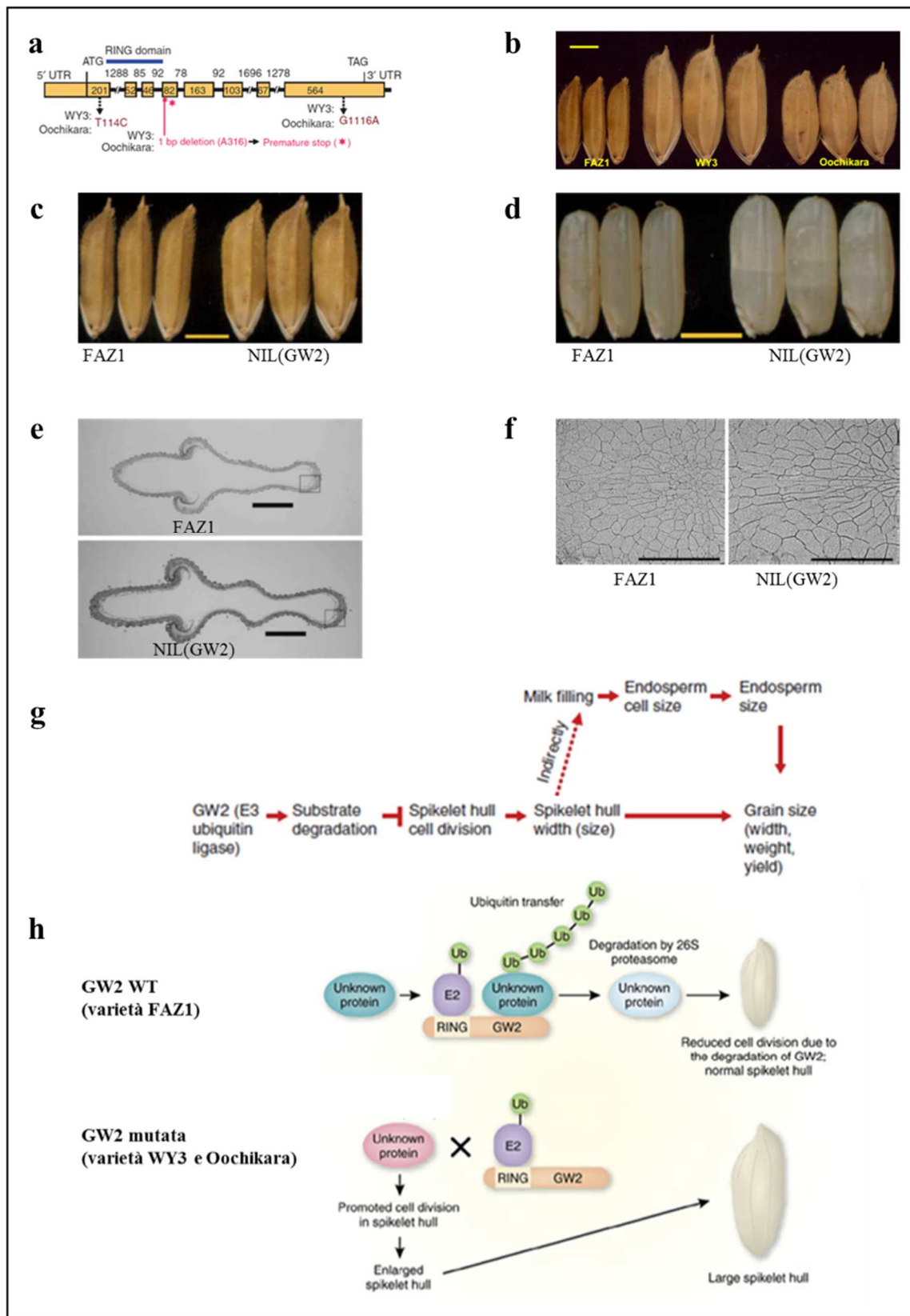


Figura 1.9. (a) Struttura del gene GW2 e siti delle mutazioni nelle varietà WY3 e Oochikara (Song et al. 2007). (b) Fenotipo della cariosside nelle varietà di riso FAZ1, WY3 e Oochikara. Scala della barra 3 mm (Song et al. 2007). (c e d) Fenotipo rispettivamente delle glumette e delle cariossidi nelle varietà FAZ1 e NIL (GW2) (Song et al. 2007). Scala della barra 3 mm (Song et al. 2007). (e) Sezione trasversale delle glumette. Scala della barra 500 μ m (Song et al. 2007). (f) Cellule dell'endosperma di semi maturi nelle varietà FAZ1 e NIL (GW2). Scala della barra 500 μ m (Song et al. 2007). (g) Modello proposto per il ruolo della proteina GW2 WT nella regolazione della larghezza e nel peso della cariosside (Song et al. 2007). (h) Modello schematico del ruolo della proteina GW2 mutata e dell'effetto della perdita di funzione proposto da Matsuoka e Ashikari (2007).

1.17.1. Geni omologhi a GW2 in mais

In mais, due geni omologhi a GW2 di riso sono stati identificati sui cromosomi 4 e 5: *ZmGW2-CHR4* e *ZmGW2-CHR5* (Li et al. 2010). Questi due geni sono composti da otto esoni e mostrano il 94% di identità di sequenza nucleotidica tra loro e il 93% se confrontati con GW2 di riso. Tra i due geni, *ZmGW2-CHR4* è più simile a *OsGW2*, mentre *ZmGW2-CHR5* è più simile al gene omologo in sorgo (Li et al. 2010). Il gene *ZmGW2-CHR4* è associato ad un QTL che regola il peso di 100 semi (HKW, *One-Hundred Kernel Weight*) ed analisi di associazione hanno mostrato che uno SNP nel promotore cosegrega con l'aumento della larghezza del seme e con un più elevato HKW. E' stato inoltre visto che SNPs o polimorfismi di inserzione/delezione (*In/Del*, *Insertion/Deletion*), in altre regioni dei geni *ZmGW2-CHR4* e *ZmGW2-CHR5*, sono significativamente associati ad almeno uno dei quattro caratteri correlati all'aumento delle rese (GL, GT, GW e HKW). Al contrario, il livello di espressione di *ZmGW2-CHR4* è negativamente correlato con questi caratteri. In mais, questi risultati suggeriscono come alleli differenti del locus GW2 passano giocare un ruolo importante nella regolazione della dimensione e del peso della cariosside (Li et al. 2010).

1.17.2. GW2 in frumento

L'identificazione e la caratterizzazione in riso del gene *OsGW2* ha fornito l'opportunità di isolare il gene omologo in frumento. Usando un approccio di genomica comparativa, sono stati isolati gli ortologhi a *OsGW2* nei tre genomi omeologhi di frumento e sono stati localizzati rispettivamente sul braccio corto dei cromosomi 6A, 6B e 6D. In particolare, il gene che risiede sul cromosoma 6A è stato mappato nella regione centromerica a 0,6 cM dal marker *cfb80.2* (Figura 1.10a; Su et al. 2011). A livello nucleotidico, le sequenze codificanti dei tre geni GW2 omeologhi di frumento presentano tra loro il 98% di identità e mostrano l'87% di omologia con *OsGW2* (Su et al. 2011). La regione codificante è costituita da 8 esoni, ha una dimensione di 1275 bp e codifica per una proteina di 424 residui amminoacidici (circa 47,2 kDa). Il dominio RING, di 43 amminoacidi, è posizionato nella regione N-terminale ed è ha una sequenza amminoacidica altamente conservata rispetto alla proteina ortologa in riso. L'analisi della sequenza codificante i tre geni omeologhi di *TaGW2*, in varietà di frumento tenero che differivano per la dimensione del seme, non ha mostrato nessun polimorfismo simile alla delezione identificata in riso (Su et al. 2011). Nella regione del promotore del gene *TaGW2-A*, Su et al. (2011) hanno identificato due SNPs, in perfetto *linkage disequilibrium*, che formano 2 aplotipi (Figura 1.10b): Hap-6A-A (-593A e 739G) e Hap-6A-G (-593G e 769A). Analisi di associazione, in moderne varietà cinesi di frumento tenero, hanno mostrato che *TaGW2-A* Hap-6A-A è un allele superiore per la grandezza del seme. L'effetto di *TaGW2-A* sul peso del seme è dovuto maggiormente ad un aumento della larghezza ed, in minima parte, all'aumento della lunghezza e dello spessore. L'analisi trascrizionale dei tre geni omeologhi *TaGW2*, mostra che il livello d'espressione è negativamente correlato con la larghezza del seme (Su et al. 2011). Questo dato suggerisce che in riso e frumento il gene GW2 attua lo stesso meccanismo molecolare nel regolare la dimensione del seme.

Più recentemente, Yang et al. (2012) hanno identificato un inserzione di una base sull'esone otto di *TaGW2-A* (T in posizione 977) nella varietà a seme grande di frumento tenero Lankaodali. Questa inserzione genera un codone di stop prematuro, portando alla formazione di una proteina tronca (Figura 1.10c; 328 amminoacidi, 37,1 kDa). L'analisi di associazione, nella popolazione segregante F₂, derivante tra l'incrocio tra la varietà Lankaodali (seme grande) e Chinese Spring (seme piccolo), ha mostrato che le linee, con l'allele omozigote mutante, hanno una cariosside più larga del 5,8% ed un TGW maggiore del 10,03% (Yang et al. 2012). Questo polimorfismo è stato trovato anche in altre due varietà asiatiche a seme grande: Sichuandali e Wanmai 38 (Figura 1.10d). In conclusione, gli autori suggeriscono che *TaGW2-A* influenza negativamente le dimensioni ed il peso finale della cariosside in maniera analoga a *OsGW2* in riso.

Studi di caratterizzazione funzionale hanno dimostrato che *TaGW2-A* è una proteina con attività E3 ubiquitina ligasi simile a *OsGW2*, localizzata nel nucleoplasma, nel nucleolo e nel citoplasma (Bednarek et al. 2012). Il motivo ricco in leucina NES (LxxLxL), situato nella regione N-terminale, è necessario per il trasporto di *TaGW2-A* fuori dal nucleo e la ritenzione nel nucleolo (Bednarek et al. 2012). Analisi di espressione dei singoli omeologhi di *TaGW2* hanno mostrato che *TaGW2-A* e *TaGW2-D* sono principalmente espressi nel seme durante l'inizio della divisione cellulare e durante la fase finale di riempimento della cariosside, mentre *TaGW2-B* è espresso solo durante la fase finale di riempimento della cariosside (Figura 1.10f; Bednarek et al. 2012). Diversamente dai risultati di Yang et al. (2012) e Su et al. (2011), studi di silenziamento mediante RNAi delle tre copie omeologhe di *TaGW2*, mostrano una riduzione significativa della dimensione della cariosside rispetto al controllo (Figura 1.10 e). Inoltre, il silenziamento di *TaGW2* porta ad una riduzione delle cellule dell'endosperma senza mostrare fenotipi pleiotropici per quanto riguarda il numero dei semi, il numero delle spighe per pianta e la data di antesi (Bednarek et al. 2012). Questi risultati indicano che in frumento, i geni omeologhi *TaGW2* regolano positivamente la grandezza della cariosside, andando ad aumentare il numero di cellule dell'endosperma con una funzione che diverge dall'ortologo in riso *OsGW2*. Gli autori spiegano questa differenza con tre ipotesi. La prima spiegazione è che i lavori precedenti hanno identificato un aumento della dimensione della cariosside dovuto solo a polimorfismi identificati nell'allele A di *TaGW2*, mentre l'esperimento di RNAi silenzia contemporaneamente le tre copie del gene. La seconda ipotesi è che gli studi precedenti hanno identificato l'associazione genetica tra i marker nel genoma A di *TaGW2* e le componenti implicate nell'aumento della resa. *TaGW2-A* è localizzato nella regione pericentromerica dove è presente in importante QTL implicato nell'aumento delle rese (Snape et al. 2007). L'associazione genetica osservata può essere spiegata con il *linkage disequilibrium* tra questi marker ed un gene non ancora identificato, implicato nell'aumento delle rese. Una terza possibilità, è data dagli effetti causati dall'utilizzo di un RNAi *hairpin* molto lungo, per il silenziamento dei geni *TaGW2*, che può aver silenziato altri geni che hanno un effetto positivo sulla grandezza della cariosside (Bednarek et al. 2012). Ulteriori studi sulla caratterizzazione funzionale dei geni *TaGW2* sono necessari per capire il loro ruolo nella regolazione della dimensione della cariosside. L'identificazione di mutanti *knock-out* genoma

specifici in una popolazione TILLING potrà delucidare il ruolo di ogni omeologo nell'aumento delle rese.

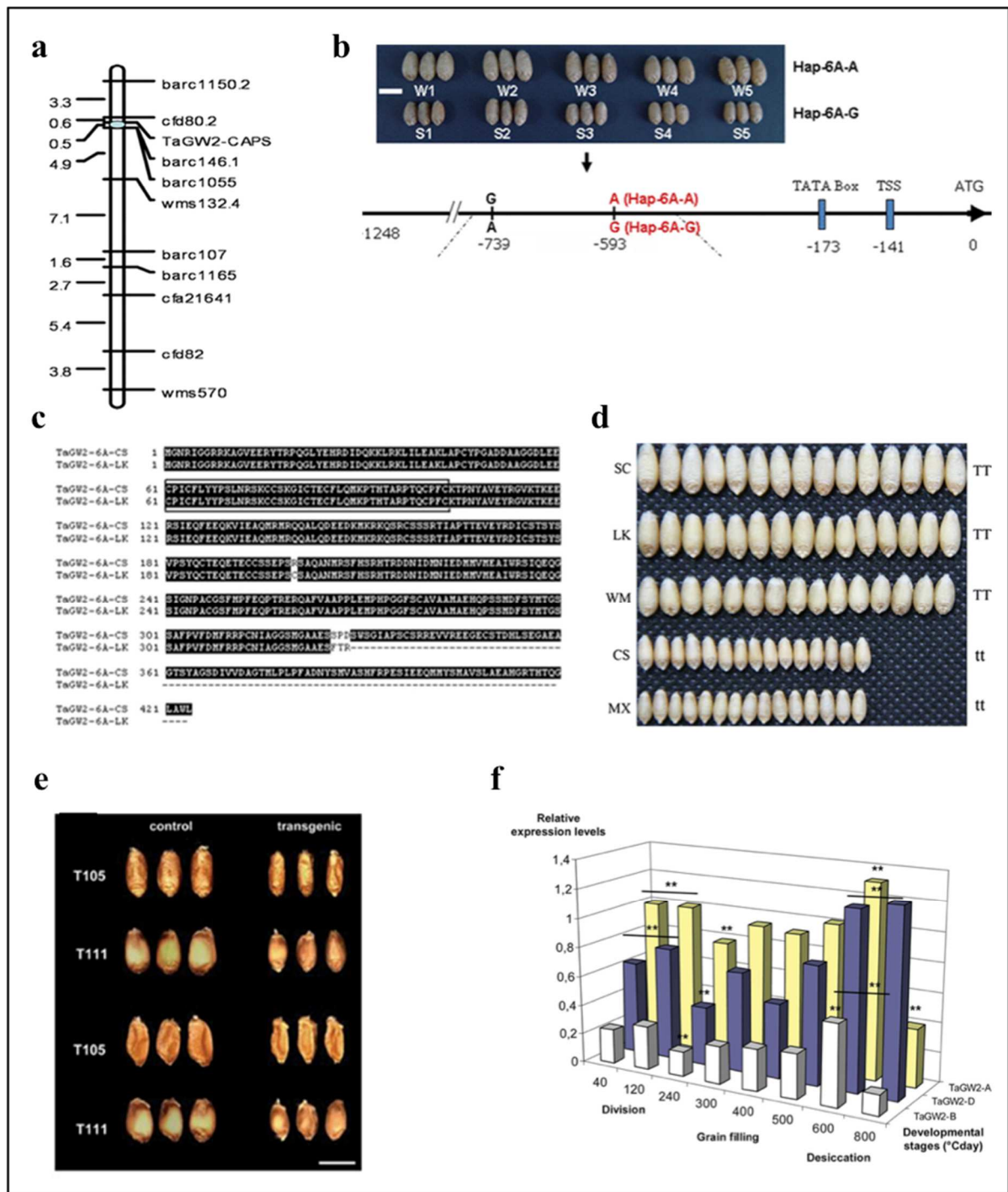


Figura 1.10. (a) Mappaggio fine del gene *TaGW2-6A* localizzato a 0,6 cM dal marker *cfd80.2* (Su et al. 2011). (b) Fenotipi delle cariossidi di varietà di frumento che differiscono nel genotipo. Posizione degli SNPs che formano gli aplotipi Hap-6A-A e Hap-6A-G nella regione del promotore di *TaGW2-6A*. Lunghezza della barra 5mm (Su et al. 2011). (c) Allineamento delle sequenze amminoacidiche di *TaGW2* della varietà Chinese Spring (CS) e Lankadali (LK) (Yang et al. 2012). (d) Cariossidi di 5 varietà di frumento tenero che differiscono per la grandezza della cariosside omozigoti per l'inserzione (TT) o wt (tt) per il gene *TaGW2-A*. SC Sichuandali, LK Lankadali, WM Wanmai 38, CS Chinese Spring, MX Mingxian 169 (Yang et al. 2012). (e) Fenotipi delle cariossidi delle linee *TaGW2* silenziate (T111 e T105) e dei rispettivi controlli nulli segreganti. Lunghezza della barra 5mm (Bednarek et al. 2012). (f) Livelli di espressione degli omeologhi *TaGW2* in differenti stati di sviluppo della cariosside (Bednarek et al. 2012).

1.18. La reazione di ubiquitinazione

La regolazione dell'espressione e dell'attività proteica è stata per lungo tempo considerata solo in termini di efficienza nella trascrizione/traduzione. Negli ultimi anni, la scoperta di meccanismi di regolazione post-trascrizionali e post-traduzionali ha mostrato che il fattore chiave nel determinare la quantità di trascritto/proteina è il rapporto tra la sintesi e la degradazione proteica (Mazzucotelli et al. 2006).

L'ubiquitina è una proteina globulare costituita da 76 amminoacidi, altamente conservata tra tutti gli organismi eucarioti. Attraverso la reazione di ubiquitinazione, l'ubiquitina viene coniugata alle proteine accettrici tramite la formazione di un legame isopeptidico tra l'estremità C-terminale dell'ubiquitina (residuo di glicina 76) e l'aminogruppo del residuo di lisina del polipeptide coinvolto nella reazione (Pickart, 2001). La principale funzione dell'ubiquitinazione è la degradazione delle proteine target attraverso il proteosoma 26S. Oltre all'eliminazione delle proteine tronche o aberranti per l'*housekeeping* cellulare, questa via regola la quantità delle proteine attive che dipendono dal rapporto degradazione/sintesi (Sadanandon et al. 2012)

L'ubiquitinazione è un processo enzimatico complesso, che prevede l'azione sequenziale di tre differenti enzimi: l'enzima di attivazione dell'ubiquitina (E1), l'enzima di coniugazione dell'ubiquitina (E2) e l'enzima responsabile del legame dell'ubiquitina con la proteina bersaglio (ubiquitina ligasi E3). L'E1 è responsabile dell'attivazione del residuo di glicina contenuto all'estremità C-terminale dell'ubiquitina, attraverso un meccanismo ATP-dipendente. L'ubiquitina attivata in questa prima fase viene successivamente trasferita al residuo catalitico (una cisteina) dell'E2 mediante la formazione di un ulteriore legame tioestere. Infine, l'ultima fase del processo è catalizzata dall'enzima E3, e prevede la formazione del legame isopeptidico tra l'estremità C-terminale dell'ubiquitina, precedentemente attivata, e l' ϵ -aminogruppo del residuo di lisina della proteina accettrice (Figura 1.11; Hershko e Ciechanover 1998).

Le proteine E3 possono sia possedere un'attività enzimatica intrinseca sia semplicemente coadiuvare il trasferimento dell'ubiquitina dall'E2 al substrato proteico. Il ruolo maggiormente studiato e attribuito all'ubiquitinazione riguarda il riconoscimento delle proteine bersaglio da parte del proteosoma 26S, che a sua volta è responsabile della degradazione proteolitica di varie proteine cellulari. Il proteosoma è un complesso proteolitico multienzimatico che riconosce come segnale degradativo una catena di almeno quattro molecole di ubiquitina, legate tra loro attraverso il residuo di lisina 48 dell'ubiquitina. Il legame tra l'ubiquitina e la proteina accettrice costituisce così un metodo rapido e reversibile per controllare l'abbondanza cellulare dei livelli proteici (Mazzucotelli et al. 2006). L'ultima fase del processo di ubiquitinazione determina il trasferimento ultimo dell'ubiquitina dall'E3 al substrato, e risulta essere la reazione più specifica e la più lenta. Questa osservazione porta ad attribuire una funzione fondamentale agli enzimi E3 ubiquitina ligasi. Più di mille proteine E3 ligasi sono state predette in *Arabidopsis*. La grandezza di questa famiglia genica, suggerisce che l'enzima E3 ligasi ha un ruolo chiave nella specificità della reazione di ubiquitinazione, ed è responsabile del riconoscimento e del legame di un unico o di un gruppo ristretto di substrati. Ad oggi sono state identificate circa un migliaio di E3 che

sono state classificate in tre gruppi principali: le E3 ubiquitina ligasi di tipo HECT, di tipo RING-finger e di tipo U-box (Mazzucotelli et al. 2006).

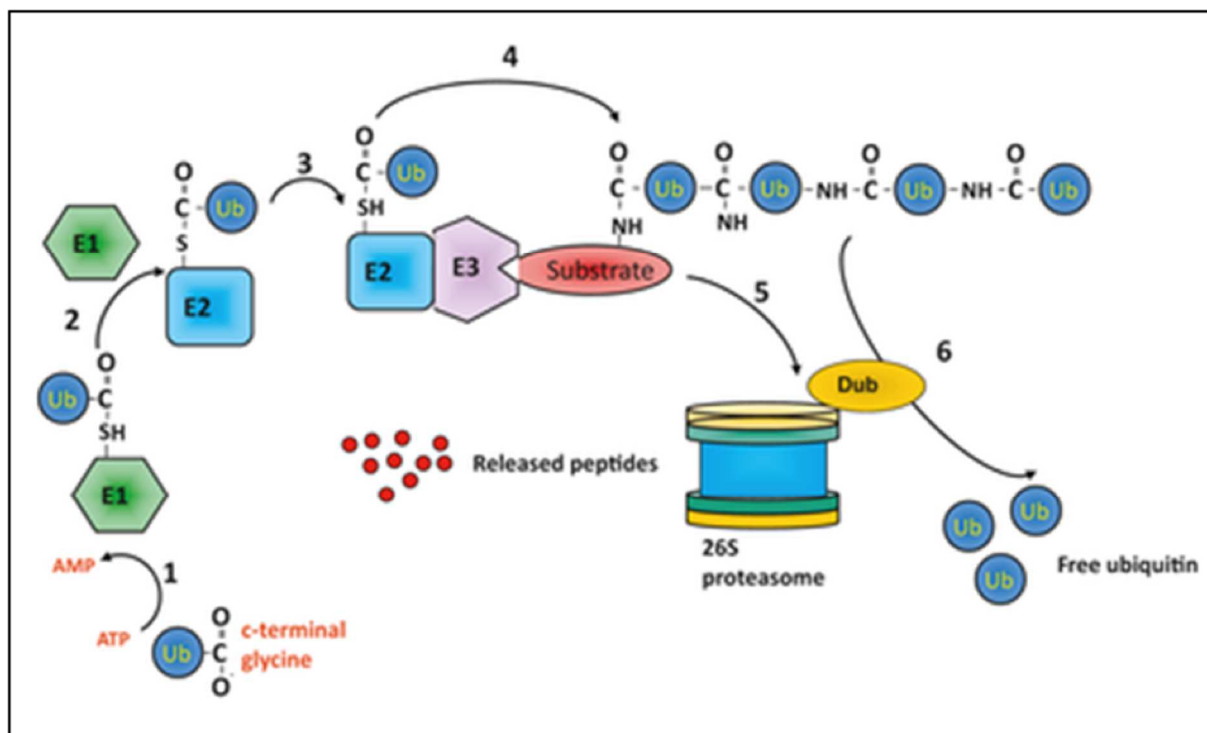


Figura 1.11. Reazione enzimatica del sistema ubiquitina-proteasoma. (1) Attivazione ATP-dipendente dell'ubiquitina (Ub) da parte di E1 (enzima di attivazione dell'ubiquitina). L'Ub attivata si lega ad un cisteina conservata di E1 tramite un legame tioestere con il gruppo carbossilico della sua glicina terminale. (2) Trasferimento di Ub a E2 (enzima di coniugazione dell'ubiquitina) attraverso la formazione di un legame tioestere. (3) L'enzima E2 trasferisce l'ubiquitina attivata alla ubiquitina ligasi (E3) che facilita il trasferimento della ubiquitina da E2 ad un residuo di lisina della proteina bersaglio, spesso formando un complesso intermedio con la E3 e la proteina target. (4) Ubiquitinazione iniziale della proteina bersaglio attraverso la formazione di un legame isopeptidico con l'Ub. Si legano successivamente ulteriori Ubs per formare una catena di poli-Ub. (5) Le proteine bersaglio con una catena di poli-Ub, legate ad al residuo di lisina 48, sono indirizzate al proteosoma 26S. (6) Le catene poli-Ub vengono disassemblate dal proteosoma 26S associato ad un enzima con attività di deubiquitinazione (DUB) con rilascio di ubiquitina libera. Il proteosoma 26S degrada la proteina bersaglio in frammenti peptidici (Sadanandon et al. 2012).

1.18.1. La ligasi E3 di tipo RING finger

Le proteine contenenti il dominio RING, insieme alle proteine F-box, rappresentano la più abbondante famiglia genica di ubiquitina ligasi E3.

Il dominio RING-finger è costituito da otto residui, sette di cisteina ed uno di istidina altamente conservati, coordinati insieme dalla presenza di due atomi di zinco, a formare una struttura a ponte che serve per un adeguato ripiegamento dell'enzima e per l'interazione con l'E2 (Figura 1.12; Borden e Freemont 1996). Il riconoscimento e il successivo legame tra l'E3 e i suoi diversi substrati, avviene tramite la giustapposizione tra l'E3 e una specifica regione di "ubiquitinazione" presente nelle proteine bersaglio. Generalmente inoltre, l'interazione coinvolge altre proteine con funzione mediatrice, e può richiedere delle modificazioni post-traduzionali che riguardano i diversi substrati. Le E3 del tipo RING-finger possono a loro volta essere suddivise in proteine monomeriche, oppure in complessi proteici

costituiti da subunità multiple. Il motivo ricco in cisteina RING è stato per primo identificato in una proteina codificata dal gene *Really Interesting New Gene* (Freemont et al. 1991). Le proteine di tipo RING sono ampiamente presenti negli animali, nelle piante, nei lieviti, nei funghi, nei virus e mostrano una diversità di domini RING (Borden 1996; Stone et al. 2005).

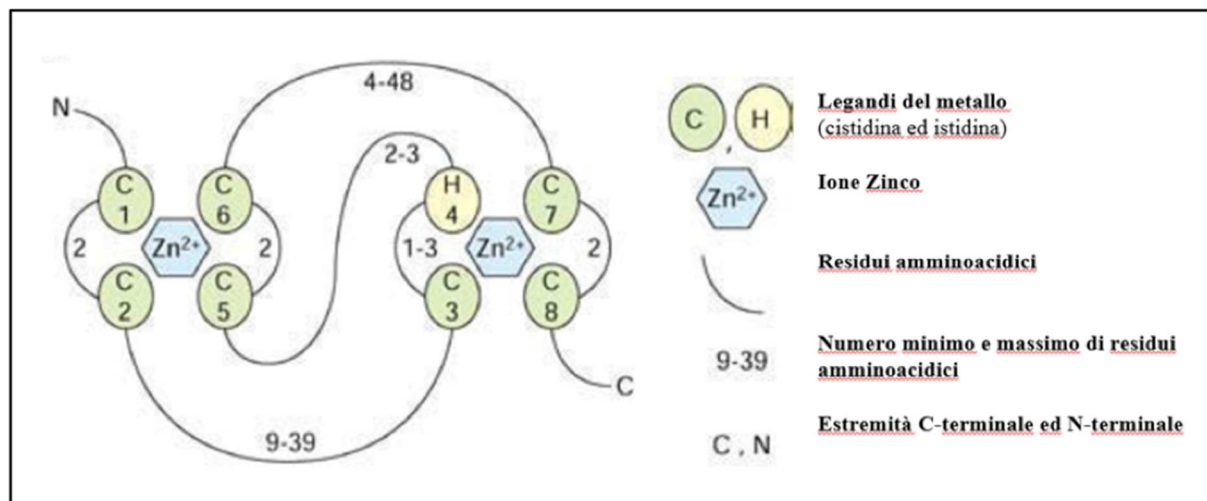


Figura 1.12. Rappresentazione schematica della struttura di un dominio RING. Le coppie metallo-ligando 1 e 3 coordinare uno ione zinco, mentre le coppie 2 e 4 coordinano il secondo (Kosarev et al. 2002).

Finora, sette tipi di questi domini sono stati identificati in *Arabidopsis*; compresi due domini di tipo canonico, RING-HC (C3HC4) e RING H2 (C3H2C3), e cinque di tipo RING-v, RING-C2, RING-D, RING-S/T e RING-G (Stone et al.2005, Albert et al.2002).

Una ubiquitina ligasi E3 di tipo RING-finger ben caratterizzata è COP1, che in *Arabidopsis* svolge la funzione di regolatore centrale nel controllo della luce durante le fasi iniziali di sviluppo della plantula (Holm et al.2001).

In riso, OsGW2 è caratterizzata da un dominio RING (C5HC2) precedentemente mai descritto, che ha la particolarità di avere un residuo di cisteina ed istidina implicati nel legame con lo ione metallico rispettivamente alla posizione 5 e 6 (Su et al. 2007). Queste caratteristiche sono state ritrovate anche nel dominio RING di proteine omologhe in mais, frumento, lieviti e funghi, indicando che GW2 probabilmente rappresenta una proteina con un nuovo tipo di dominio RING. In frumento, studi di trascrittomici hanno evidenziato che l'interazione tra i fitormoni e il sistema di degradazione proteica ubiquitina-proteasoma 26S, gioca un ruolo cruciale nei processi di sviluppo della cariosside (Capron et al. 2012).

Gli enzimi ubiquitina ligasi E3 finora caratterizzati nelle piante hanno mostrato un ruolo fondamentale nella regolazione di numerosi processi biologici, quali: il controllo ormonale della crescita vegetativa, i meccanismi di riproduzione, la risposta alla luce, la tolleranza a stress biotici ed abiotici ed il riparo del DNA (Mazzucotelli et al. 2006).

2. Finalità

In uno scenario in cui la produttività delle colture è messa a rischio da diversi fattori, tra cui i cambiamenti climatici e l'erosione dei terreni, e dove vi è la necessità di sfamare una popolazione mondiale in rapida crescita, l'aumento delle rese rappresenta uno dei principali obiettivi nei programmi di miglioramento genetico. Negli ultimi anni, a questo obiettivo si sta affiancando sempre più l'esigenza di migliorare gli aspetti qualitativi e nutrizionali delle specie coltivate. Questa tendenza è certamente legata alla diffusione di importanti malattie legate a regimi alimentari errati. Infatti, nei paesi industrializzati, uno stile di vita sedentario ed un consumo eccessivo di cibo, in particolare di alimenti raffinati a base di cereali, ha contribuito alla diffusione di una “epidemia” di malattie metaboliche. I cereali, ed in particolare il frumento, rappresentano una risorsa ideale per apportare nuovi benefici alla salute umana in quanto rappresentano la maggiore fonte di energia nell'ambito della dieta umana.

Negli ultimi anni, la produzione di amidi ad alto contenuto di amilosio ha suscitato particolare interesse a causa delle sue peculiari caratteristiche nutrizionali e tecnologiche. L'incremento del contenuto di amilosio è stato associato all'aumento di amido resistente nei prodotti alimentari. L'amido “resistente” è la frazione dell'amido, essenzialmente costituita da catene lineari di amilosio retrogragate, in grado di resistere all'azione degli enzimi digestivi umani e di essere fermentata dalla microflora intestinale con importanti benefici per la salute. Pertanto, la possibilità di produrre cibi ricchi in “amido resistente” costituisce una prospettiva interessante per la prevenzione di numerose malattie correlate a regimi alimentari errati. Inoltre, le farine con un elevato contenuto di amilosio possiedono caratteristiche tecnologiche superiori per la produzione di alcuni tipi di alimenti: migliorano il nervo della pasta e la croccantezza di alcuni prodotti da forno quali waffles e cracker senza comprometterne la palatabilità.

Il primo obiettivo di questo progetto di dottorato ha riguardato la produzione di nuove linee di frumento duro ad elevato contenuto di amilosio attraverso una strategia di genetica inversa, chiamata TILLING. A tale scopo è stata identificata nuova variabilità genetica nei geni *SBEIIa* che codificano per un enzima con un ruolo chiave nella sintesi dell'amilopectina in frumento. La produzione di linee di mutanti *knock-out* per tale gene è finalizzata all'ottenimento di nuovi genotipi con fenotipo “high amylose”.

Un indice della produttività in frumento è la resa in granella, un carattere quantitativo, sotto controllo multigenico, caratterizzato da una bassa ereditabilità e modulato dall'interazione genotipo-ambiente. In frumento, l'isolamento dei geni attraverso le mappe di clonaggio risulta difficile a causa della sua natura poliploide. Approcci di genomica comparativa hanno dimostrato che geni ortologi in diverse specie hanno una funzione parallela nella regolazione del fenotipo fornendo così un efficace strumento per isolare caratteri di interesse in frumento. Nelle specie modello, molti QTL o geni associati alle rese sono stati isolati. Ad esempio in riso, il gene *GW2* è stato identificato come un regolatore negativo della grandezza delle cariossidi.

Il secondo obiettivo di questo progetto di dottorato è stato lo studio della funzione del gene *GW2* nel regolare la dimensione della cariosside in frumento duro. A tale scopo è stata identificata nuova variabilità genetica per il gene *GW2* attraverso un approccio TILLING. Lo sviluppo di linee mutanti per tale gene è finalizzata sia a studi di genomica funzionale che alla produzione di genotipi *knock-out* che potenzialmente dovrebbero mostrare un fenotipo a seme grande.

Nel corso del progetto di dottorato, un obiettivo secondario è stato quello di verificare l'efficienza dell'HRM *genotyping* come metodo di MAS in programmi di *breeding*.

3. Materiali e metodi

3.1. Materiali vegetali

Sono state utilizzate la cultivar di frumento duro Svevo e le varietà di frumento tenero Lankaodali e Rebelde. Inoltre, sono state utilizzate le linee ditelosomiche del cromosoma 6 di *Chinese Spring* (Sears e Sears 1978). Nella tabella 3.1 sono riportate le informazioni relative alle accessioni dei frumenti utilizzati negli esperimenti di caratterizzazione del polimorfismo nella regione promotrice del gene *GW2-A*.

Tabella 3.1. Elenco delle accessioni utilizzate per l'analisi del polimorfismo *In/Del* nella regione del promotore del gene *GW2-A*

Specie	Codice
<i>T. urartu</i>	B2 (23), B4 (23), B5(23), B6 (23), B7(24), id 1551, id 1545
<i>T. monococcum</i>	C7(3), C9(3), C6(6), C7(7), C7(6), id1331
<i>T. turgidum ssp. durum</i>	21811, 6, aus 36496, 11617, aus 3561, aus 20677, aus 36624, aus 36251
<i>T. turgidum ssp. dicoccum</i>	B1 (5x), aus 35807, aus 33286, mvgb502, mvgb303,
<i>T. turgidum ssp. carthlicum</i>	PI 499972, PI 585017, PI 585018, PI 341800, PI 572849, PI 115816, PI 585018
<i>T. turgidum ssp. turanicum</i>	PI 290530, PI 184543, PI 191599, PI 192648, PI 11390, PI 278350, PI 2810530,
<i>T. turgidum ssp. polonicum</i>	PI 266846, PI 208991, PI 290512, PI 261753, PI 306549, PI 352487, PI 136617, PI 272564, PI 352488
<i>T. turgidum ssp. dicoccoides</i>	aus 35658, aus 35646, aus 21420, aus 3211 aus g 3105, mvgb 947, mvgb 4, mvgb 1022, aus 21325, aus 21282, aus 161279, mvgb 558
<i>T. aestivum ssp. aestivum</i>	Avorio, Tiepolo, B2(4), A8 (4), Rebelde, Yumai 34
<i>T. aestivum ssp. spelta</i>	34366, 353625, 348678, 8T

3.2. Estrazione Acidi Nucleici

3.2.1. Estrazione DNA genomico

Il DNA genomico è stato isolato come descritto da D'Ovidio e Porceddu (1996). Al tessuto fogliare polverizzato in azoto liquido sono stati aggiunti 80 µl di tampone di estrazione (100mM Tris pH 8, 50mM EDTA pH 8, 500mM NaCl) e 16 µl di SDS 20%. Il tutto è stato omogenizzato delicatamente e incubato a 65°C per 10 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 26,7 µl di acetato di potassio 5M e, dopo aver agitato delicatamente il campione è stato posto in ghiaccio per 20 minuti in modo da far precipitare le proteine denaturate. I frammenti cellulari e le proteine sono stati separati mediante centrifugazione a 14000 rpm, il surnatante recuperato e il DNA precipitato mediante l'aggiunta di isopropanolo. Il pellet di DNA, così ottenuto, è stato lavato con etanolo al 70%, asciugato sotto vuoto e risospeso in 20 µl di

TE (Tris. Cl 10 mM pH8.0, EDTA 1 mM). A questo punto si è proceduto al trattamento con ribonucleasi A (1µg RNAsi per 10µg di DNA genomico) per degradare l'RNA per 10 minuti a 65°C. Il DNA estratto è stato conservato a 4°C.

3.2.2. Estrazione RNA totale dalle cariossidi

L'estrazione e la successiva manipolazione dell'RNA sono state effettuate utilizzando delle procedure di lavoro molto accurate, finalizzate a evitare il contatto con RNAsi presenti in tutti i materiali biologici. L'acqua è stata trattata *over-night* (o/n) con dietil pirocarbonato (DEPC), un inibitore delle RNAsi. Per isolare l'RNA da cariossidi immature (14 DPA) di frumento a partire da 100 mg di materiale si è ricorso al protocollo che prevede l'utilizzo del TRIZOL (Gibco). La distruzione dei tessuti vegetali è stata realizzata con l'utilizzo di mortaio e pestello in presenza di azoto liquido. La polvere ottenuta con tale trattamento è stata trasferita in un tubo da 2 ml precedentemente raffreddato, e mescolata con 0,5 ml di tampone di estrazione (20 mM Tris pH 9; 200 mM NaCl; 1% Sarcosyl; 20 mM EDTA; 5 mM DTT) agitando vigorosamente con il vortex. In seguito, sono stati aggiunti 0,5 ml di fenolo/cloroformio/IAA (25:24:1) agitando con il vortex. I campioni sono stati centrifugati a 4°C per 5 minuti a 5000 rpm. Il surnatante (circa 300 µl) è stato recuperato, e posto in un nuovo micro tubo al quale sono stati aggiunti 1 ml di Trizol e 0,4 ml di cloroformio/IAA (24:1) agitando vigorosamente con il vortex. Il campione è stato centrifugato a 5000 rpm per 10 min a 4°C fase acquosa risultante viene recuperata e trasferita in un nuovo tubo. Per purificare il campione un lavaggio con 1ml di cloroformio/IAA, seguito da centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti a 4°C. La fase superiore è stata trasferita in una nuova provetta. La precipitazione dell'RNA è stata effettuata aggiungendo 2 volumi di etanolo al 100% e 1/10 del volume di acetato di sodio (3M) pH 5.2 seguita da un'incubazione di 30 min a -80°C e successiva centrifugazione a 10000 rpm per 10 min a 4°C. Il supernatante è stato rimosso procedendo al lavaggio del pellet con 1 ml di etanolo 70%. Il pellet è stato lasciato seccare all'aria sotto cappa per 5-10 minuti e risospeso in 50 µl di H₂O DEPC, con l'aggiunta di 0,1 µl di inibitore di RNAsi.

3.3. Separazione degli acidi nucleici con elettroforesi su gel di agarosio

L'identificazione e la separazione dei frammenti di DNA è stata eseguita mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'0.8%, 1,2% ed al 2% in TBE 0,5x (Tris-borato-EDTA) con l'aggiunta di una soluzione di bromuro di etidio (0,5 µg/ml). Le separazioni elettroforetiche sono state condotte ad un voltaggio massimo di 80V per migliorare la separazione dei frammenti.

3.4. Metodi per l'isolamento di frammenti genici

3.4.1. Amplificazione PCR

Le reazioni di amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), sono state eseguite a partire da 50-100 ng di DNA genomico in un volume finale di 50 µl. La miscela di reazione è costituita da 1X GoTaq® Hot Start Colorless Master e 50-100 pmoli di ogni oligonucleotide. Quando non indicato

differentemente, le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 1 ciclo iniziale di 2 min a 95°C seguito da 40 cicli di denaturazione 1 min a 95°C, annealing 1 min a 60-67°C, estensione 1-4 min (a seconda della lunghezza del frammento da amplificare) a 72°C con un ultimo ciclo di estensione allungato a 5 min.

3.4.2. Isolamento del gene *SBEIIa-B* dalla cultivar di frumento duro Svevo

L'isolamento dell'intera regione codificante del gene *SBEIIa-B* è stata ottenuta tramite PCR attraverso l'utilizzo dei primer riportati in tabella 3.2 producendo 5 frammenti. I frammenti sono stati analizzati per elettroforesi sul gel d'agarosio all'1% purificati e sottoposti a sequenziamento. Ogni amplicone è stato sequenziato con gli oligonucleotidi *forward* e *reverse* utilizzati per la rispettiva l'amplificazione. Per il sequenziamento dei frammenti 3 e 5 sono stati utilizzati ulteriori primer riportati in tabella 3.3.

Tabella 3.2. Coppie di oligonucleotidi allele specifici utilizzate per l'isolamento del gene *SBEIIa-B*

Amplicone	Sequenza (5' - 3')	Sequenza (5' - 3')	Bp	T. annealing
1	CGTTGCTCCCCCTTCTCATCGC	AGACTAGTGGAGGCGTT	1695	61
2	ATGTGGTGGATGGGTATGG	TCCATAGAATAAACCATCAGACCG	1970	63
3	CCTTTTGTGACCATTACTAAGGATA	ACCGAAGTCAAGCTCCTCACTC	1740	61
4	CAAAGGAGGGAGTGAGGAGCTTG	GCGCCATGTACAATATCCAG	1920	61
5	CTTTGAAGCTGTGAGCTGTTGGTACTTAG	TTTCCCAACAAGCTACCTATCCAT	2900	61

Tabella 3.3. Oligonucleotidi utilizzati per il sequenziamento del gene *SBEIIa-B*

Amplicone	Sequenza (5' - 3')
3	ACAATACTTAGAGGATGCAATCTGA
5	GTGCTGTAAGCATTGATCCGACAC
	AGAGTTATTGATCATTAAAG

3.4.3. Metodo per l'isolamento dei frammenti genici *GW2*

Le sequenze parziali dei due omeoalleli *GW2* di frumento duro sono state ottenute attraverso l'amplificazione di due frammenti A1 e A2 per il genoma A e di B1 e B2 per il genoma B attraverso un approccio *gene walking*. I primer riportati nel lavoro di Su et al. (2011; Tabella 3.4) sono stati impiegati per amplificare i frammenti A1 e B1. Gli amplificati PCR sono stati analizzati su gel di agarosio 0,8%, purificati e sottoposti a sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state allineate con il programma GENEIOUS 5.6 (www.geneious.com), che ha permesso di rivelare poliformismi utili per disegnare i

primer *forward* necessari per amplificare i frammenti 2A e 2B. Gli oligonucleotidi *reverse* sono stati disegnati sulla base dell'intera sequenza di cDNA del gene *TaGW2* disponibile in banca dati (*TaGWA* genbank acc. JN896622, *TaGWB* genbank acc. JN896623). Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) è stato utilizzato per il disegno degli oligonucleotidi.

Gli amplificati PCR sono stati analizzati su gel di agarosio 0,8%, purificati e sottoposti a sequenziamento. Sulla base della sequenza ottenuta, sia per il gene del genoma A che per quello del genoma B, è stato possibile disegnare ulteriori oligonucleotidi (Tabella 3.5) che hanno permesso di sequenziare completamente i frammenti A2 e B2.

La sequenza parziale dell'ottavo esone è stata ottenuta attraverso l'amplificazione di due frammento specifici per ogni omeoallele, utilizzando i primer *forward* riportati nel lavoro Bednarek et al. (2012) e i primer *reverse* riportati nel lavoro di Yang et al. (2012).

Tabella 3.4. Coppie di primer utilizzate per il parziale isolamento del gene *GW2*.

Amplificone	Oligo forward	Sequenza (5'-3')	Oligo reverse	Sequenza (5'-3')	bp
1A	HAP-6A-P1F	CGTTACCTCTGGTTTGGGTCGTG	HAP-6A-P1R	CACCTCTCGAAAATCTTCCCAATTA	949
2A	Gw532A-F	GAGATCACATATTCGCTTAGAGG	Gw-NEW-R	GAATGGAAAGACCGCATGTT	3256
1B	TaGW2-6B-F	GTGGTGAACATAGCAAATTGATTACAT	TaGW2-6B-R	TTGCGTAGCTTCTTCTGGTCGATAT	1275
2B	Gw532B-F	GGATCACGTATTTGCTTGGAT	Gw2-500-R	AGTATGCCTAGAATGGAAAGACC	3264
Esone 8 A	GwFra_AF	AGGAAATCCTTCTTGTGGGAGC	TaGw_AS_R3	ACAACCATGCCAACCTTGC	548
Esone 8 B	GwFra_BF	AATCCTGCTTGTGGGAGT	TaGw_AS_R3	ACAACCATGCCAACCTTGC	544

Tabella 3.5. Primer utilizzati per il sequenziamento dei frammenti PCR 2A e 2B

Oligo	Sequenza (5'-3')
Gwseq1F	GCTGTGTTGTCGTCGAGTGT
Gwseq2F	TTGCATTTGTTCTGCCGTAG
Gwseq3R	GCACTCTGCAAAATACCAAACA

3.4.4. Disegno di oligonucleotidi allele specifici (AS-PCR) per discriminare il polimorfismo *In/Del* nella regione del promotore del gene *GW2-A*

La regione polimorfica di interesse è stata amplificata tramite AS-PCR utilizzando gli oligonucleotidi riportati in tabella 3.6. Gli ampliconi sono stati analizzati per elettroforesi su gel d'agarosio all'1,5%.

Tabella 3.6. Coppia di oligonucleotidi utilizzati per la AS-PCR.

Oligo-Foward	Sequenza (5' - 3')	Oligo-Reverse	Sequenza (5' - 3')	T. annealing
GW2-A532F	GAGATCACATATTCGCTTAGAGG	GW2-Adel	GCGCCGCCTCACTGTAGATA	61

3.4.5. Retrotrascrizione dell'RNA

Circa 1µg di RNA, dopo essere stato sottoposto al trattamento con DNAsi, è stato retrotrascritto a cDNA usando il kit *QuantiTect Reverse Transcription* (Quiagen) secondo il protocollo riportato nel manuale.

3.4.6. Analisi d'espressione quantitativa (qRT-PCR)

L'analisi di espressione quantitativa Real-Time PCR (qRT-PCR) è stata effettuata attraverso l'utilizzo dello strumento iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA1, USA). Per ogni campione è stata effettuata una replica biologica e tre repliche tecniche. La reazione di amplificazione sono state eseguite con 1µl di cDNA in un volume finale di 20 µl. La miscela di reazione è costituita da 500nM di ogni oligonucleotidi e da 1x della iQ™ SYBR Green Supermix 2X (BIO-RAD) contenente il buffer, i dNTPs ed il fluoroforo SYBR Green I. Le condizioni di amplificazioni sono state le seguenti: 1 ciclo iniziale di 15 min a 95°C seguito da 40 cicli di denaturazione 30s a 95°C, annealing 1 min a 60°C, estensione 1 min. L'espressione relativa è stata determinata attraverso il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen 2001; Applied Biosystems User Bulletin No. 2-P/N 4303859). Il calcolo e l'analisi statistica è stata effettuata attraverso il programma Gene Expression Macro™ Version 1.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Come gene *housekeeping* è stata utilizzata la Gliceraldeide-3-Fosfato-Deidrogenasi (GAPDH). Gli oligonucleotidi utilizzati sono riportati in Tabella 3.7.

Tabella 3.7 Coppie di oligonucleotide utilizzati nell'esperimento di qRT-PCR

Oligo Foward	Sequenza (5' - 3')	Oligo Reverse	Sequenza (5' - 3')
GAPDHFw	CAACGCTAGCTGCACCACTAACT	GAPDHR	GACTCCTCCTTGATAGCAGCCTT
SBEIIa-AF	ACCAGTATGTTTCACGGAAACAC	SBEIIa-AR	CACCTTGACTTCCCAGGCC
SBEIIa-BF	ATATCGTGGTATGCAAGAGTTCGAC	SBEIIa-BR	CAAGAAAGAGCGCGGCCTA

3.4.7. Estrazione e purificazione dei frammenti di DNA da gel di agarosio

I frammenti di DNA estratti dal gel di agarosio sono stati purificati utilizzando il kit Wizard® DV Gel and PCR Clean-Up System della Promega. La porzione di gel contenente il frammento di DNA da purificare, è stata tagliata con una lama da bisturi sterile e trasferita in un tubo da microcentrifuga. Dopo aver pesato la frazione di gel recuperata, sono stati aggiunti 100 µl dell'apposito tampone (Membrane Binding Solution) per ogni 10 mg del frammento di gel. Il contenuto del microtubo è stato miscelato

vigorosamente utilizzando il vortex e poi, al fine di far sciogliere il gel, è stato incubato a 60°C per 10-15 minuti. Una volta sciolto, il campione è stato caricato su una colonna di affinità (SV Minicolumn) posta su un microtubo, ed è stato incubato a temperatura ambiente per un minuto e subito dopo centrifugato per 30 secondi a 14000 rpm, in modo da far legare il DNA alla membrana della colonna. Quest'ultima è stata poi lavata con 500 µl di un apposito tampone (Membrane Wash Solution), contenente etanolo, che è stato subito rimosso con una centrifugazione di 30 secondi a 14000 rpm. Questa centrifugazione è stata ripetuta una seconda volta per rimuovere eventuali residui di etanolo presenti nel Membrane Wash Solution. Il DNA è stato quindi eluito dalla colonnina mediante l'aggiunta di acqua sterile distillata seguita da incubazione a temperatura ambiente per un minuto e successiva centrifugazione per 1 minuto a 14000rpm.

3.4.8. Determinazione delle sequenze nucleotidiche

Per le analisi di sequenze nucleotidiche è stato utilizzato il servizio commerciale della Eurofins MWG (Germania).

3.5. TILLING

3.5.1. Generazione dei *pool* di DNA

Il DNA genomico delle singole piante M₂ è stato diluito nella concentrazione finale di 5 ng/µl. ed impiegato per la produzione di *pool* in piastre PCR da 96 pozzetti; in ciascun pozzetto sono stati miscelati, in rapporto 1:1, i DNA genomici isolati da due distinti individui. La concentrazione finale del DNA genomico in ciascun pozzetto è 2 ng/µl in un volume di 5µl.

3.5.2. Amplificazione allele specifici per i geni di interesse

L'analisi TILLING dei geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* è stata effettuata con l'utilizzo dei primer riportati nel lavoro di Botticella et al 2011 (Tabella 3.7; 3.8). Per l'analisi dei geni *GW2*, sono state allineate le sequenze dei due genomi A e B per identificare polimorfismi nella regione genica maggiormente idonea per l'analisi TILLING. Le coppie di oligonucleotidi sono state disegnate con il programma Primer 3 (Tabella 3.5; 3.7) e sono state validate per PCR sulle linee ditelocentriche 2AS, 2BS e 2DS di *Chinese Spring*.

1th round PCR

Le amplificazioni PCR sono state condotte in un volume finale di 10 µl utilizzando 10 ng di DNA genomico, 5µl GoTaq® Hot Start Colorless Master, 0,5 µl di ciascun oligonucleotide (20 µM). La soluzione è stata quindi ricoperta con 10 µl di olio minerale (Sigma-Aldrich). Le condizioni di PCR utilizzate sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 95°C per 2 min; 40 cicli a 95°C per 30 s, 62°–

67°C per 30 s e 72°C per 1,8-2,3 min; step di estensione finale 72°C per 10 min. Gli oligonucleotidi utilizzati sono riportati in tabella 3.8 per i geni *SBEIIa* e in tabella 3.9 per il gene *GW2*

Tabella 3.8. Coppie di oligonucleotidi utilizzate nelle amplificazioni allele specifiche dei geni *SBEIIa* (Botticella et al. 2011)

Amplicone	Oligo-fowars (5'-3')	Oligo-reverse (5'-3')	T. annealing	Dimensioni (bp)
A ⁽²⁻⁵⁾	CGCTCGCTCGCTCCAATC	GCAACTGGTCAGTATTCAGTAAGCTAAG	65	1720
A ⁽⁶⁻⁹⁾	TCTGAGAATATGCTGGGACGTAG	GTTTCGAAAATGCTACATGCTCA	62	1560
A ⁽¹⁰⁻¹³⁾	GTTTCGAAAATGCTACATGCTCA	GGGAAGTATCTAAGACTCCGTAGCAC	67	2100
B ⁽⁴⁻⁹⁾	ATGTGGTGGATGGGTTATGG	TCCATAGAATAAACCATCAGACCG	63	1970

Tabella 3.9. Coppie di oligonucleotidi utilizzate nelle amplificazioni allele specifiche dei geni *GW2*

Amplicone	Oligo-fowars (5'-3')	Oligo-reverse (5'-3')	T. annealing	Dimensioni (bp)
A	GCAGCATTCCAACTCCATCT	ATGAATTTGTCCAACAATATGAGCTTC	63	2023
B	AAGCAGCATTCCAATTGATGG	TCCCTGCTTTTAGAGTAGCTGTCATCTG	64	2146

2th round PCR

Le amplificazioni PCR sono state condotte come descritto nel paragrafo precedente e sono state allestite in piastre PCR da 96 pozzetti Frame-Star® (4titude® Ltd, Surrey, UK). Una diluizione 1:60 dell'amplicone della 1th round PCR è stato utilizzato come DNA stampo. Alla reazione PCR è stato aggiunto il fluoroforo LCGreen Plus Dye (IdahoTechnology Inc.).

Le condizioni di PCR utilizzate sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 95 °C per 2 min; 40 cicli a 95°C per 20 s, 60°C per 20 s e 72°C per 20 s; step di estensione finale 72°C per 10 min; 95°C per 30 s; 25°C per 1 min. La soluzione è stata ricoperta con 10 µl di olio minerale. L'ultimo step di denaturazione e rinaturazione è stato eseguito per aumentare l'efficienza del processo di formazione degli eteroduplex. Le temperature di *annealing* ottimali sono state determinate per ogni coppia di oligonucleotidi attraverso una PCR in gradiente. Gli oligonucleotidi utilizzati sono riportati in tabella 3.10 per i geni *SBEIIa* e 3.11 per il gene *GW2*.

Tabella 3.10. Coppie di oligonucleotidi utilizzate 2th round PCR dei geni *SBEIIa*

Amplificone	Esone	Oligo-forward (5'-3')	Oligo-reverse (5'-3')	Dimensioni (bp)
SBEIIa-A	2	CCACTGACCGACTCACT	GGTGAAGAGGCGCATACA	215
	3	CCACTGACCGACTCACT	TGAAGATTTCCGGCACG	156
	4	TGGTTTCGTTAGTCTGCTCT	TGAGCGAAAGTAGCGGG	313
	5	TTTGGGTATGCCTCCGT	TGAGCGAAAGTAGCGGG	163
	6	TTGCTCTAAATTTATGATCTGGCT	AGGTGGAAGATTGCCAAG	153
	7	TTGCTCTAAATTTATGATCTGGCT	GCTACATGCTCACTAAATAATTGG	152
	8	CTCTGCCCACTAAGGGT	AAATTTCAATTAATAATGTAATGGAGATCG	204
	9	CCTTTTGTGACCATTCTACTAAGGATA	ACCAGAAACAGGTGAAATAACT	157
	10	ACAATACTTAGAGGATGCATCTGA	GGTGAAGAGGCGCATACA	212
	11	ACAATACTTAGAGGATGCATCTGA	ACCAGATAAACAGTAAAGCAGC	223
	12	GTTGCATTGCTTCATCAATGATT	CAAATATGGTGACAGAAGTCAGAG	237
	13	GTTGCATTGCTTCATCAATGATT	CATAGCAATTATTTCAAGTGCCT	266
SBEIIa-B	4	AACACACTGCTAAATTTGAATGAT	AGACTAGTGAGGCGT	190
	5	TGCTGAAGGTATCATCTAATTGC	TGACCATTAACAATAGATTAGAAGGTG	159
	6	CAGTTACTCTAAATTTATGATCTGGCT	AGGTGGAAGATTGCCAAG	134
	7	CCTATTGATGCCGATATTTGATATG	TCCTCGACTAAATAATTGGCCAG	152
	8	AACTCTGCCTACTAAGGGT	ACACTGGAAATTCATTTAATAATGTAAC	204
	9	CCTTTTGTGACCATTCTACTAAGGATA	CCGAAACAGGTGAAATAACT	157

Tabella 3. 11. Coppie di oligonucleotidi utilizzate 2th round PCR dei geni *GW2*

Esone	Oligo forward (5'-3')	Oligo reverse (5'-3')	T° annealing.	Dimensioni bp
2	CCTGTCCTAAAAATGCATGTT	TAACAAGTAACACACAATCACTGG	60	143
3	TAGGTGCAAATTTCTTACATGTC	CAGGATATTTGAAACAAGAACAGAGA	60	127
4	GGGCCTTGTCATTTCTCAC	AGTAATGAATTTGGCTTTCTAATATCAAC	60	185
5	TGTTGATATTAGAAAGCCAAATTCATTTAC	CAGATTAACTACAGAAAAATTGACATTAT	60	259
6	CGACAAATGTACACATTTAATAATGTCAA	CATAAAACAACATACCAAGTATGATGGA	60	214

3.5.3. Analisi HRM

Le piastre PCR sono state brevemente centrifugate e quindi sottoposte all'analisi HRM utilizzando lo strumento LightScanner (Idaho Technology, Inc.). I campioni sono stati riscaldati in un intervallo di temperatura variabile tra 70°C e 99°C. La denaturazione degli ampliconi comporta il rilascio dell'LCGreen e lo strumento registra la diminuzione dell'emissione di fluorescenza all'aumentare delle temperature. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software LightScanner®. La normalizzazione e la determinazione dell'intervallo di temperatura delle curve di *melting* sono state eseguite secondo le istruzioni riportate nel manuale dello strumento. Sono stati utilizzati due diversi modi di visualizzare i dati: le curve di *melting* normalizzate (F/T) e le curve differenziali ($\Delta F/T$). Le curve di *melting* normalizzate mostrano il cambiamento dei valori di fluorescenza, in ogni campione, durante la denaturazione dei prodotti PCR all'aumentare della temperatura. Le curve differenziali

mostrano la differenza relativa di fluorescenza di ciascun campione rispetto ad un campione di riferimento. In accordo con il manuale dello strumento, valori di ΔF di 0,05 sono stati considerati significativi e i campioni corrispondenti putativi mutanti.

I due genotipi putativi mutanti, costituenti il *pool*, sono stati sequenziati per identificare quale dei due contiene lo SNP. La scelta dei primer usati nel sequenziamento si è basata sul criterio di copertura di tutto l'esone includendo i siti di *splicing*.

3.6. HRM genotyping

HRM *genotyping* è stato utilizzato per la genotipizzazione delle mutazioni d'interesse all'interno di una popolazione segregante. Per ogni mutazione analizzata è stata effettuata una prima PCR per produrre frammenti allele specifici, come descritto per il TILLING. Gli ampliconi della prima PCR sono stati diluiti 60 volte ed 1 μ l è stato utilizzato come template per una seconda PCR (vedi paragrafo 3.5.2). Gli oligonucleotidi per la Nested-PCR sono stati disegnati adiacenti allo SNP da analizzare ed amplificano piccoli ampliconi (50-100bp). L'analisi HRM è stata condotta come descritto precedentemente. Per lo studio delle curve di *melting* è stato utilizzato il programma *Amplicon genotyping* dello strumento LightScanner. Gli oligonucleotidi specifici per il polimorfismo analizzato sono riportati in tabella 3.12.

Tabella 3.12. Oligonucleotidi utilizzati per la genotipizzazione

Gene	Mutazione	1 th round PCR (5'-3')	Nested-PCR (5'-3')
<i>SBEIIa-A</i>	SBEIIa-A ⁻	Fw - GTTCGAAAATGCTACATGCTCA	Fw - TGGCACTGATACACATTACTTCCAC
		Rv - GGGAAGTATCTAAGACTCCGTAGCAC	Rv - ACATACTTCCCAACTCCCATAGTT
	SVEMS_1433	Fw - GTTCGAAAATGCTACATGCTCA	Fw - ATAATGGCAATCCAGGAGCA
		Rv - GGGAAGTATCTAAGACTCCGTAGCAC	Rv - TGAAGAGGCGCATACAGAAA
<i>SBEIIa-B</i>	SBEIIa-B ⁻	Fw - ATGTGGTGGATGGGTTATGG	Fw - CCATCTGGTGTGAAGGATTCTG
		Rv - TCCATAGAATAAACCATCAGACCG	Rv - CACCTGGAGCCTGCACAGA
<i>GW2-B</i>	GW2-B ^{-G188E}	Fw - AAGCAGCATTCCAATTGATGG	Fw - CTTACAATTTACTATGTTTCGTTGCAGT
		Rv - TCCCTGCTTTTAGAGTAGCTGTCATCTG	Rv - GTTAGCCTGAGCAGAACATGAAG
	GW2-B ^{-P69L}	Fw - AAGCAGCATTCCAATTGATGG	Fw - TCCCTGTCTTAAAAATGCATG
		Rv - TCCCTGCTTTTAGAGTAGCTGTCATCTG	Rv - CTGTACATATCCCTTTCGAGCAAC

3.7. Metodi per la determinazione delle proprietà chimico fisiche dell'amido

3.7.1. Isolamento e purificazione dell'amido (Dought Method)

La metodica descritta di seguito è utilizzata per l'isolamento dell'amido da quantità relativamente piccole (25g) di sfarinato di frumento.

La metodica consiste di cinque fasi:

- 1) Formazione dell'impasto a partire dallo sfarinato (60% circa di acqua).
- 2) Separazione dell'amido dal glutine attraverso ripetuti lavaggi in fase acquosa dell'impasto.

- 3) Sedimentazione dell'amido attraverso ripetuti passaggi di centrifugazione.
- 4) Eliminazione dello strato superficiale di colore grigio-giallo.
- 5) Essiccamento all'aria dell'amido isolato.

3.7.2. Isolamento dei granuli di amido

I granuli d'amido sono stati isolati da mezza cariosside come descritto da Zhao e Sharp (1996) con alcune modifiche. Le mezze cariossidi senza embrione sono state macinate in mortaio e lo sfarinato posto in provette contenenti 1 ml di H₂O. I campioni sono stati lasciati a 4°C per tutta la notte. Il giorno seguente i campioni sono stati agitati sul vortex, centrifugati per cinque minuti a 13,000 rpm eliminando il surnatante. Al pellet sono stati aggiunti, per due volte, 300 µl di H₂O, il tutto è stato mescolato in modo da rompere tutti gli eventuali grumi, e lasciato sedimentare per un minuto. I granuli d'amido così portati in sospensione sono stati stratificati su 1 ml di NaCl 5 M (Mohammadkani et al. 1999), centrifugati per cinque minuti a 13,000 rpm eliminando successivamente il surnatante. Ogni campione è stato lavato per due volte con 1 ml di un tampone composto da Tris-HCl 55 mM pH6.8; 2.3% SDS; 1% ditioneitolato (DTT) e 10% glicerolo, e per tre volte con 1 ml di H₂O. Ad ogni passaggio è stato agitato su vortex, centrifugato per cinque minuti a 13,000 rpm eliminando il surnatante. Infine è stato aggiunto 1 ml di acetone allontanando il surnatante dopo centrifugazione a 13,000 rpm per 10 minuti. I granuli di amido così isolati sono stati lasciati seccare per circa un'ora all'aria, e conservati poi a -20°C.

3.7.3. Determinazione dell'amilosio

La determinazione del contenuto di amilosio è stata eseguita attraverso una versione modificata del metodo di Chrastil et al. (1987).

Estrazione dei lipidi

15 mg di amido purificato di ciascun campione (in tre repliche) sono stati immersi in una soluzione acquosa all'85% di metanolo e tenuti in un bagnetto alla temperatura di 60°C per 30 min; i campioni sono stati vortexati ad intervalli di tempo di 5 min per favorire la solubilizzazione di lipidi. I campioni sono stati centrifugati, in tubi di vetro pyrex, a 2,500 g. Il solvente è stato rimosso delicatamente utilizzando una pipetta da 1ml; alla fine è stata utilizzata una siringa da 1 ml con ago facendo attenzione a non toccare il pellet di amido presente sul fondo. I campioni sono stati asciugati all'aria.

Solubilizzazione dell'amido.

I campioni *lipid free* sono stati solubilizzati in 2 ml di NaOH e 4 ml di H₂O e tenuti in un bagnetto alla temperatura di 95°C per 30 min; i campioni sono stati mescolati con il vortex ad intervalli di tempo di 2 min per favorire la completa solubilizzazione dell'amido.

Determinazione dell'amilosio

Di ogni replica 0,1 ml sono stati trasferiti in un nuovo tubo contenente 5 ml di TCA 0,5% (acido tricloroacetico). Sono state prodotte due repliche per ciascun campione.

Le soluzioni sono state agitate con il vortex; in ciascun campione sono stati aggiunti 0,05 ml di una soluzione 0,01N I₂-KI. I campioni sono stati nuovamente agitati in vortex. Dopo 30 min è stata misurata l'assorbanza a 620 nm. Come bianco è stata utilizzata H₂O distillata e amido purificato *waxy* all'0% di amilosio. Per ciascun campione sono state utilizzate due repliche.

Retta di taratura

Un campione di 15 mg di amilosio puro di patata (Sigma Aldrich) e un campione di 15 mg di amido *waxy* purificato (da frumento duro o tenero) sono stati processati come descritto sopra.

È stata quindi generata una retta di taratura utilizzando diverse miscele dei campioni di amilosio e di amido *waxy* come descritto in tabella 3.8. I valori delle percentuali di amilosio di ciascun campione sono stati determinati utilizzando l'equazione della retta e calcolando le opportune medie.

Tabella 3.8. Descrizione della retta di taratura utilizzata per le determinazioni del contenuto di amilosio.

% Amilosio totale	Volume Amilosio (µl)	Volume <i>waxy</i> (µl)	H ₂ O
0	0	0	100
0	0	100	0
20	20	80	0
40	40	60	0
60	60	40	0
80	80	20	0

3.8. Programmi Bionformatici

3.8.1. Predizione struttura secondaria delle proteine

La struttura secondaria delle proteine è stata predetta attraverso l'utilizzo del programma bioinformatico GORIV disponibile in rete (Garnier et al. 1996).

3.8.2. Analisi filogenetica della proteina GW2

Le sequenze delle proteine omologhe GW2 in diverse specie di graminacee sono state ricercate e scaricate al sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Il multiallineamento di tali sequenze è stato eseguito con ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) ed utilizzato per generare l'albero filogenetico consenso attraverso il software Geneious R7 (<http://www.geneious.com/>) usando rispettivamente Jukes-Cantor e Neighbor-Joining come modello di distanza genetica e metodo per la costituzione dell'albero. L'analisi filogenetica è stata eseguita in accordo a 1000 repliche *bootstrap*. Le sequenze proteiche utilizzate per il multiallineamento e l'analisi filogenetica sono riportate in tabella 3.13.

Tabella 3.13 Informazioni delle proteine omologhe GW2 utilizzate per l'analisi filogenetica.

Nome proteina	Codice GenBank	Lunghezza proteina (aa)	Specie
TuGW2	_*	424	<i>T. urartu</i>
TaGW2-A	AFU88754.1	424	<i>T. aestivum</i>
TaGW2-B	AFU88755.1	424	<i>T. aestivum</i>
OsGW2-I	ABO31101.1	425	<i>O. sativa Indica</i>
OsGw2-J	NP_001046414.1	423	<i>O. sativa Japonica</i>
ZmGw2-ch.4	AFW65938.1	430	<i>Z. mais</i>
ZmGW2-ch.5	AFW71120.1	428	<i>Z. mais</i>
BdGW2	XP_003571977.1	424	<i>B. distachyon</i>
HvYrg1	ABY51682.1	424	<i>H.vulgare</i>
SbGW2	XP_002453598.1	428	<i>S. bicolor</i>
SiGW2-1	XP_004951329.1	429	<i>S. italica</i>
SiGW2-2	XP_004951330.1	428	<i>S. italica</i>

* Sequenza ottenuta dal *genome draft* di *Triticum urartu* (Ling et al. 2013).

4. Risultati

4.1. Costituzione della popolazione TILLING in frumento duro

In collaborazione con la ditta “Società Produttori Sementi S.p.A.” (PSB, Bologna, Italia), nell'ambito del progetto AGER (Agroalimentare e Ricerca) “FROM SEED TO PASTA - Multidisciplinary approaches for a more sustainable and high quality durum wheat production” è stata sviluppata una popolazione mutagenizzata di frumento duro. Circa ventimila semi della cultivar Svevo sono stati trattati con una soluzione di EMS (Figura 4.1). Le 4766 piante M_1 risultanti dal trattamento sono state allevate in serra e attraverso il metodo di selezione SSD (*Single Seed Descent*) sono state ottenute 3996 piante M_2 . Da tali individui è stato estratto il DNA genomico che è stato utilizzato per le successive analisi genetiche mediante l'approccio TILLING. Delle piante M_2 , 1214 sono risultate sterili o sono morte nelle fasi iniziali di sviluppo, mentre 181 hanno prodotto meno di quattro semi e non sono state fatte avanzare alla generazione M_3 (Bovina et al. 2014). Durante la stagione 2012 sono state allevate 2601 famiglie M_3 2300 in pieno campo e 301 in camera di crescita. In totale, 117 famiglie (4,9%) hanno mostrato un fenotipo letale e non hanno raggiunto la generazione M_4 . Le rimanenti 2484 famiglie M_4 sono state raccolte, campionate e caratterizzate a livello fenotipico per diversi caratteri, come la morfologia della pianta, del seme, le caratteristiche qualitative e le rese (Figura 4.1; Bovina et al. 2014).

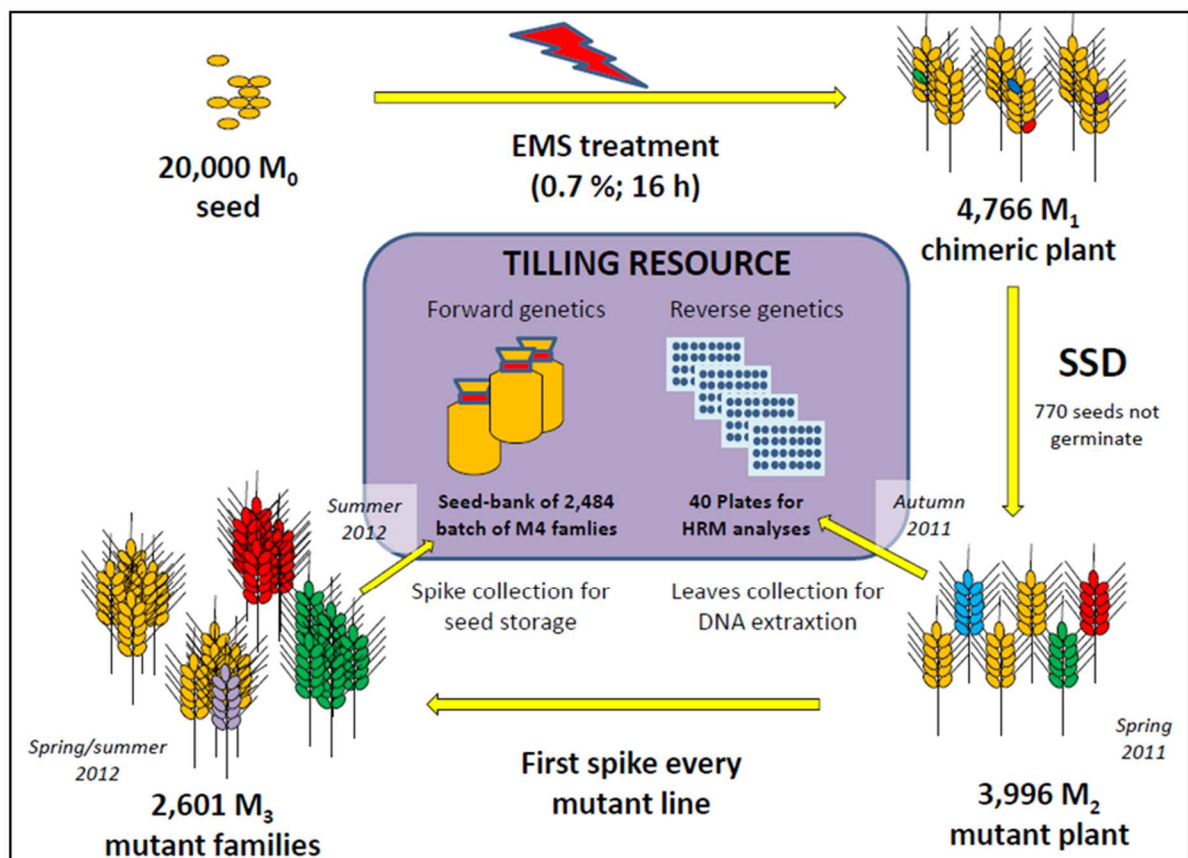


Figura 4.1. Schema dello sviluppo della popolazione TILLING di frumento duro cv Svevo. Tratto da Bovina et al. (2014).

4.2. Caratterizzazione genetica della popolazione TILLING di frumento duro

Lo screening molecolare della popolazione TILLING è stato effettuato su *pool* di DNA genomico composti da due individui M₂. La scelta di costituire dei *pool* di tale entità è stata effettuata considerando l'elevato tasso di mutazione solitamente associato a popolazioni di specie poliploidi mutagenizzate con EMS (Slade et al. 2005). Inoltre nel TILLING, l'utilizzo di *pool* composti dal DNA di almeno due individui è funzionale all'individuazione di SNP attraverso la formazione di una molecola *eteroduplex* tra il filamento a singola elica dell'amplicone wt ed il corrispondente del genotipo mutante. La tecnica HRM è stata utilizzata per l'individuazione delle mutazioni puntiformi attraverso il confronto dei profili di denaturazione degli ampliconi generati per PCR sulle regioni *target* del gene di interesse. La lunghezza ottimale dei prodotti PCR analizzati tramite HRM è compresa tra 50 e 500 bp. Tali frammenti sono stati prodotti attraverso una strategia di Nested-PCR a partire da ampliconi genoma-specifici più estesi.

Lo screening della popolazione TILLING è stato condotto per due geni *target*: *SBEIIa* e *GW2*, rispettivamente coinvolti nella via biosintetica dell'amido e nella regolazione delle dimensioni della cariossida.

4.3. Identificazione di nuove varianti alleliche nei geni *SBEIIa*

Il frumento duro, essendo tetraploide, ha due omeoalleli *SBEIIa*. Con lo scopo di individuare mutazioni puntiformi nei due geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*, la popolazione TILLING di frumento duro è stata analizzata attraverso l'utilizzo dell'HRM. Il programma CODDLE (www.proweb.org/coddle/) è stato utilizzato per determinare le regioni dei due omeoalleli *SBEIIa* più adatte all'analisi TILLING, in termini di probabilità di individuare mutazioni deleterie. Questo programma fornisce indicazioni sull'effetto delle mutazioni missenso in base alle informazioni presenti nelle banche dati e sul grado di conservazione delle posizioni amminoacidiche nella sequenza della proteina d'interesse. Il programma CODDLE necessita come "input" sia la sequenza genica del gene *target* sia quella proteica, e si basa sulla conoscenza del tipo di transizione indotta dal trattamento con l'agente EMS (G→A e C→T). Con l'analisi CODDLE sono state identificate le regioni interessate dalla presenza dei tre domini conservati, indicati con le sigle IPB004193, IPB006048 e IPB006589 e corrispondenti rispettivamente al dominio N-terminale caratteristico della famiglia degli enzimi glicoside-idrolasi, al dominio C-terminale e al sottodominio catalitico dell' α -amilasi. In figura 4.2 sono rappresentate le regioni conservate dei tre blocchi all'interno della sequenza amminoacidica dell'enzima *SBEIIa-A*; l'analisi dell'enzima *SBEIIa-B* ha dato un risultato identico.

M	A	T	F	A	V	S	G	A	T	L	G	V	A	R	P	A	G	18	
A	G	G	G	L	L	P	R	S	G	S	E	R	R	G	G	V	D	36	
L	P	S	L	L	L	R	K	K	D	S	S	R		A	V	L	S	53	
IPB006048H (8.7e-05) IC 2.48																			
R	A	A	S	P	G	K	V	L	V	P	D	G	E	S	D	D	L	71	
A	S	P	A	Q	P	E	E	L	Q		I	P	E	D	I	E	E	88	
Q	T	A	E	V	N	M	T	G	G	T	A	E	K	L	E	S	S	106	
E	P	T	Q	G	I	V	E	T	I	T	D	G	V	T	K	G	V	124	
K	E	L	V	V	G	E	K	P	R	V	V	P	K	P	G	D	G	142	
Q	K	I	Y	E	I	D	P	T	L	K	D	F	R	S	H	L	D	160	
Y	R		Y	S	E	Y	R	R	I	R	A	A	I	D	Q	H	E	177	
G	G	L	E	A	F	S	R	G	Y	E	K	L	G	F	T	R	S	195	
IPB004193A (4.0e-09) IC 1.56																			
A	E	G	I	T	Y	R	E	W	A	P	G	A	H		S	A	A	212	
L	V	G	D	F	N	N	W	N	P	N	A	D	T	M	T	R		D	230
D	Y	G	V	W	E	I	F	L	P	N	N	A	D	G	S	P		247	
A	I	P	H	G	S	R	V	K		I	R	M	D	T	P	S	G	264	
V	K	D	S	I	S	A	W	I	K	F	S	V	Q	A	P	G	E	282	
I	P	F	N	G	I	Y	Y	D	P	P	E	E		E	K	Y	V	299	
IPB004193B (1.5e-10) IC 1.44																			
F	Q	H	P	Q	P	K	R	P	E	S	L	R	I	Y	E	S	H	317	
I	G	M	S	S	P		E	P	K	I	N	S	Y	A	N	F	R	334	
IPB006589A (1.2e-08) IC 1.11																			
D	E	V	L	P	R	I	K	R	L	G	Y	N	A	V	Q	I	M	352	
IPB004193C (4.0e-20) IC 1.30																			
A	I	Q	E	H	S	Y	Y	A	S	F	G		Y	H	V	T	N	369	
F	F	A	P	S	S	R	F	G	T	P	E	D	L	K	S	L	I	387	
IPB004193D (3.2e-12) IC 2.55																			
D	R	A	H	E	L	G	L	L	V	L	M	D	I	V	H	S		404	
H	S	S	N	N	T	L	D	G	L	N	G	F	D	G	T	D	T	422	
IPB004193E (2.6e-05) IC 2.28																			
H	Y	F	H	G	G	P	R	G	H	H	W	M	W	D	S	R	L	440	
F	N	Y	G	S	W	E		V	L	R	F	L	L	S	N	A	R	457	
ttc aac tat ggg agt tgg gaa gta ttg aga ttc tta ctg tca aac gcg aga																			
IPB004193E (1.6e-15) IC 2.28																			
W	W	L	E	E	Y	K	F	D	G	F	R	F	D	G	V	T	S	475	
M	M	Y	T	H	H	G	L	Q		M	T	F	T	G	N	Y	G	492	
E	Y	F	G	F	A	T	D	V	D	A	V	V	Y	L	M	L	V	510	
N	D	L	I	H	G	L	Y	P	D	A	V	S	I	G	E	D		V	528
IPB004193F (6.7e-05) IC 1.07																			
S	G	M	P	T	F	C	I	P	V	P	D	G	G	V	G	F		545	
D	Y	R	L	H	M	A	V	A	D	K	W	I	E	L	L	K		562	
Q	S	D	E	S	W	K	M	G	D	I	V	H	T	L	T	N	R	580	
IPB006589D (6.3e-06) IC 1.17																			
R	W	L	E	K	C	V	T	Y	A	E	S	H	D	Q	A	L	V	598	
G	D	K	T	I	A	F	W	L	M	D	K		D	M	Y	D	F	615	
M	A	L	D	R	P	S	T	P	R	I	D	R	G	I	A	L	H	633	
IPB004193F (2.4e-07) IC 1.07																			
K	M	I	R	L	V	T	M	G	L	G	G	E	G	Y	L	N	F	651	
M	G	N	E	F	G	H	P	E		W	I	D	F	P	R	G	P	668	
Q	T	L	P	T	G	K	V	L	P	G	N	N	N	S	Y	D	K	686	
C	R	R	R	F	D	L		G	D	A	D	F	L	R	Y	R	G	703	
M	Q	E	F	D	Q	A	M	Q	H	L	E	E	K	Y	G		F	720	
M	T	S	E	H	Q	Y	V	S	R	K	H	E	E	D	K	V	I	738	
I	F	E	R	G	D	L	V	F	V	F	N	F	H	W	S	N	S	756	
F	F	D	Y	R	V	G	C	S	R	P	G	K	Y	K		V	A	773	
L	D	S	D	D	A	L	F	G	G	F	S	R	L	D	H	D	V	791	
D	Y	F	T	T		E	H	P	H	D	N	R	P	R	S	F	S	808	
V	Y	T	P	S	R	T	A	V	V	Y	A	L	T	E	*			824	

Figura 4.2. Identificazione delle regioni conservate corrispondenti ai domini IPB004193, IPB006048, IPB006589 all'interno della sequenza amminoacidica dell'enzima SBEIIa-A. Le regioni sottolineate indicano i domini conservati; i residui in verde indicano le posizioni amminoacidiche che sono maggiormente conservate all'interno del blocco; gli amminoacidi in rosso corrispondono ai residui meno conservati e predetti essere non fondamentali per il funzionamento dell'enzima.

Complessivamente, sono stati analizzati quattro ampliconi di dimensione differente, tre per l'omeoallele *SBEIIa-A* ed uno per *SBEIIa-B* (Figura 4.3). Ogni amplicone è stato ottenuto attraverso una strategia di Nested-PCR. Gli amplificati allele specifici sono stati ottenuti tramite l'utilizzo di primer precedentemente messi a punto nel nostro laboratorio (Botticella et al. 2011). Tali frammenti sono stati utilizzati come DNA stampo nella reazione di Nested-PCR per produrre ampliconi di dimensioni comprese tra 130-300 bp, corrispondenti alla regione genica di un singolo esone.

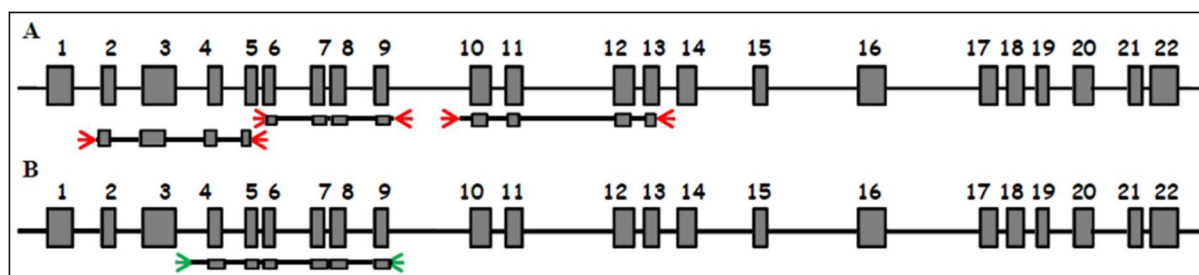


Figura 4.3. Schema dei frammenti PCR amplificati dalle coppie di oligonucleotidi genoma specifici per i due omeoalleli *SBEIIa*. I rettangoli in grigio rappresentano gli esoni; le regioni introniche sono rappresentate dalle linee orizzontali trasversali agli esoni. La numerazione si riferisce alla posizione degli esoni all'interno del gene. Le frecce in rosso ed in verde indicano gli oligonucleotidi specifici rispettivamente per il genoma A e B. Per l'allele A sono evidenziati i frammenti PCR: $A^{(2-5)}$ contenente gli esoni 2, 3, 4, 5; $A^{(6-9)}$ contenente gli esoni 6, 7, 8, 9 e $A^{(10-13)}$ contenente gli esoni 10, 11, 12, 13. Per l'allele B il frammento $B^{(4-9)}$ comprende gli esoni 4, 5, 6, 7, 8, 9.

4.3.1. Nuove varianti alleliche identificate per i due geni omeologhi *SBEIIa*

L'analisi HRM ha permesso l'identificazione di diverse curve di *melting*, con un profilo di tipo gaussiano, che corrispondevano alla presenza della mutazione (Figura 4.4). Curve con un profilo alterato o inferiore ad una differenza di fluorescenza di 0,05 sono risultati falsi positivi.

La presenza di una molecola *eteroduplex* provoca uno spostamento della curva $\Delta F/T$ a temperature più basse; infatti la curva di una molecola che presenta il *mis-match* interseca le curve dei campioni normali perché è caratterizzata da un abbassamento repentino della fluorescenza dovuto alla presenza della mutazione puntiforme nell'amplicone in esame. Anche le curve che presentano uno SNP in omozigosi presentano, nel nostro caso, un abbassamento della fluorescenza più rapido rispetto ai campioni normali; tale andamento è tipico del trattamento con EMS, che provocando transizioni del tipo C→T e G→A, porta ad un abbassamento della temperatura di *melting* della molecola.

Tutti i campioni, che presentavano una differenza di fluorescenza superiore a 0,05 rispetto al campione di riferimento, sono stati scelti come putativi mutanti e confermati tramite sequenziamento. Attraverso il confronto della sequenza nucleotidica del mutante con quella del genotipo normale, sono state individuate mutazioni sia omozigoti sia eterozigoti (doppio picco all'interno dell'elettroferogramma) (Figura 4.5).

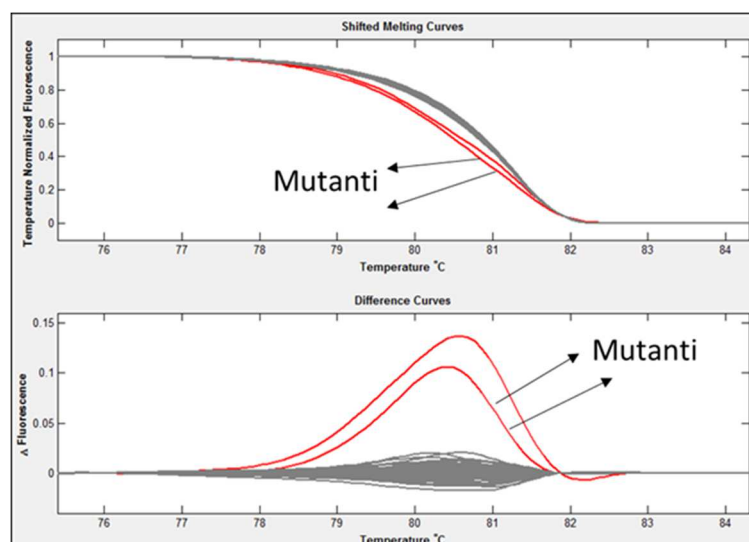


Figura 4.4. Analisi HRM della popolazione TILLING M2. Attraverso il software Light Scanner sono stati identificate due mutazioni (curve rosse). Le linee grigie rappresentano gli individui wt.

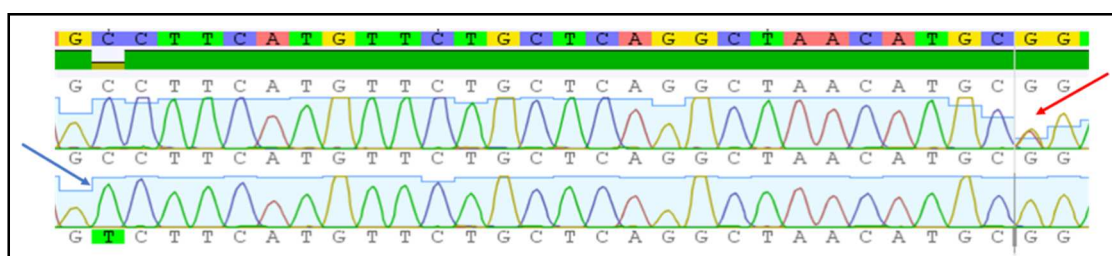


Figura 4.5. Esempio di caratterizzazione di due mutanti. Attraverso il sequenziamento e la successiva analisi degli elettroferogrammi è possibile distinguere una mutazione omozigote (freccia blu) da una mutazione eterozigote (freccia rossa). La prima appare come un *mis-match* nella sequenza consenso portando una base differente rispetto alla sequenza wt; la seconda appare come un doppio picchio nell'elettroferogramma.

In tabella 4.1 sono riportati i dati riguardanti il numero di piante analizzate ed i mutanti identificati per ciascun omeoallele *SBEIIa*. In totale, sono state individuate 39 varianti alleliche per *SBEIIa-A* e sei per *SBEIIa-B*. In funzione di tali risultati è stata calcolata una frequenza media di mutazioni, associata alla popolazione TILLING, di circa uno SNP ogni 50,5 Kb. La quasi totalità delle mutazioni è localizzata nella regione codificante. Tutte le mutazioni sono risultate essere transizioni del tipo C→T e G→A in accordo con l'effetto del trattamento con il mutageno EMS, (Greene et al. 2003; Till et al. 2004).

Tabella 4.1. Numero delle mutazioni identificate per ogni amplicone analizzato. La frequenza di mutazione associata alla popolazione è stata calcolata secondo la seguente formula: (dimensioni regione analizzata in bp) x (N° di piante analizzate)/(numero di mutanti identificati).

Amplicone	Dimensioni (bp)	N° di piante analizzate	Mutazioni	Frequenza di mutazione (1/kb)
A ⁽²⁻⁴⁾	493	1288	15	1/45
A ⁽⁶⁻⁹⁾	358	1298	12	1/38
A ⁽¹⁰⁻¹³⁾	498	1204	12	1/49
B ⁽⁴⁻⁹⁾	500	850	6	1/70

Le nuove varianti alleliche identificate sono state analizzate attraverso l'applicazione PARSESNP (Tabella 4.2). Questo programma è stato particolarmente utile per valutare l'effetto delle mutazioni missenso. I valori di PSMM e SIFT mostrati in tabella 4.2 forniscono un'indicazione della severità dell'effetto della mutazione sulla funzionalità della proteina. Per l'enzima *SBEIIa-A* sono state identificate due mutazioni missenso (S321N e G364E) nel dominio N-terminale della glicoside-idrolasi con valori di PSMM >10. In particolare, la mutazione G364E (SVEMS_1433) mostrava un valore di PSMM uguale a 30 ed un valore di SIFT pari a 0. Questa mutazione porta ad una transizione G→A nell'esone dieci in una posizione adiacente al sito di *splicing*. Nella pianta M₂ identificata, tale mutazione è risultata essere in condizione omozigote. Nessuna mutazione missenso, predetta deleteria per la funzionalità della proteina, è stata trovata nell'enzima *SBEIIa-B*. Sono inoltre state identificate rispettivamente 11 mutazioni silenti per i due omoalleli (10 per *SBEIIa-A* e 1 per *SBEIIa-B*) (Tabella 4.3).

Tabella 4.3. Mutazioni identificate per i due omoalleli *SBEIIa*.

Gene	Non codificanti	Silenti	Missenso	Non senso	Siti di <i>splicing</i>
<i>SBEIIa-A</i>	5	10	23	1	0
<i>SBEIIa-B</i>	2	1	2	1	0

Tabella 4.2. Analisi delle varianti alleliche identificate con il programma PARSESNP. Nella prima colonna (Cambiamento nucleotidico) è riportata la mutazione nucleotidica e la relativa posizione a partire dall'ATG della sequenza genica, mentre nella seconda colonna (Effetto) è riportata la sostituzione amminoacidica che ne scaturisce e la relativa posizione nella sequenza proteica. La presenza della mutazione in una zona non codificante è indicata con Introne, mentre la formazione di un codone di stop con l'asterisco (*). I valori PSMM vengono mostrati per le mutazioni missenso che cadono all'interno di un Blocco-dominio conservato; valori di PSMM>10 (in rosso) indicano che la mutazione provoca un profondo cambiamento rispetto al Blocco di riferimento; i valori <0 (in verde) indicano SNP che rendono la proteina più simile al blocco di riferimento.

<i>SBEIIa-A</i>					<i>SBEIIa-B</i>				
Cambiamento nucleotidico	Effetto	PSMM	Sift	Zigosità	Cambiamento nucleotidico	Effetto	PSMM	Sift	Zigosità
G511A	A50T			Eterozigote	C1547T	H176Y			Eterozigote
C513T	A50=			Eterozigote	C1589T	L190F			Eterozigote
C516T	V51=			Eterozigote	C1603T	R194=			Omozigote
G526A	A55T			Eterozigote	G1642A	Introne			Omozigote
G566A	S68N	-16.8	0.04	Eterozigote	C2466T	Introne			Eterozigote
G586A	A75T			Eterozigote	G2587A	W272*			Eterozigote
G588A	A75=			Omozigote					
G909A	A91T			Omozigote					
C1000T	T121I			Omozigote					
G1008A	V124I			Eterozigote					
G1531A	S164N			Omozigote					
G1531A	S164N			Omozigote					
G1541A	R167=			Eterozigote					
G1612A	G191E			Omozigote					
C1834T	H209Y	5.1	0.34	Eterozigote					
G2482A	Introne			Omozigote					
G2486A	Introne			Eterozigote					
C2504T	Introne			Omozigote					
G2510A	Introne			Eterozigote					
G2566A	R258=			Eterozigote					
G2583A	G264D			Omozigote					
G2974A	K297=			Omozigote					
C2990T	P303S			Eterozigote					
C2990T	P303S			Eterozigote					
C2990T	P303S			Omozigote					
C2997T	P305L			Eterozigote					
G3019A	R312=			Omozigote					
G3045A	S321N	15.8	0.02	Eterozigote					
G3881A	V337M	1.0	0.15	Eterozigote					
G3901A	R343=			Omozigote					
G3937A	Q355=			Omozigote					
C3954T	A361V	5.1	0.46	Omozigote					
G3963A	G364E	30.0	0.00	Omozigote					
G5181A	G416D			Eterozigote					
G5242A	W436*			Omozigote					
C5401T	L460F	3.8	0.45	Eterozigote					
G5438A	G472E			Eterozigote					
C5445T	T474=			Eterozigote					
G5480A	Introne			Eterozigote					

4.3.2. Mutazioni nonsense identificate per gli omeoalleli *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*

Per ciascuno dei due omeoalleli *SBEIIa* è stata identificata una mutazione nonsense, considerata responsabile della perdita della funzionalità della proteina a causa della formazione di un codone di stop prematuro (Tabella 4.2; W436* e W272* rispettivamente per *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*). Per l'allele *SBEIIa-A* è stata identificata una transizione G→A che ha causato la formazione di un codone di stop prematuro (TGA) nell'esone XII (*SBEIIa-A*⁻). Anche per l'allele *SBEIIa-B* una transizione G→A provoca la formazione di un codone di stop prematuro (TGA) nell'esone VIII (*SBEIIa-B*⁻). La mutazione nell'allele del genoma A è risultata essere in omozigosi, mentre la mutazione dell'allele *SBEIIa-B* è risultata eterozigote. In figura 4.6 è riportata graficamente la posizione di tutte le mutazioni identificate nella sequenza genica degli omeoalleli *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*.

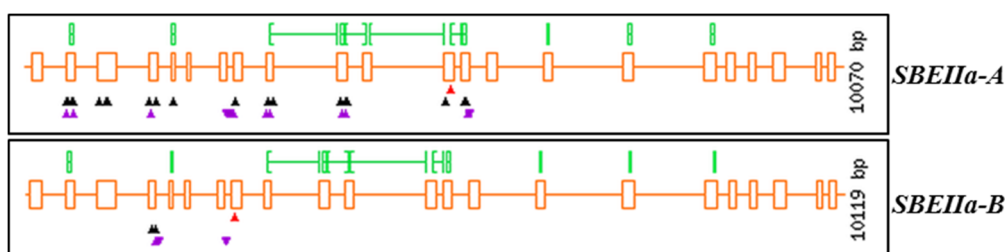


Figura 4.6. Rappresentazione grafica delle mutazioni individuate per i due omeoalleli *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*. Le linee in verde rappresentano le regioni del gene interessate dalla presenza dei domini conservati. I triangoli rivolti verso l'alto rappresentano i polimorfismi localizzati nelle regioni esoniche; i triangoli in rosso mostrano le mutazioni deleterie non senso; i triangoli in nero e in viola rappresentano rispettivamente le mutazioni missenso e le mutazioni silenti.

4.3.3. Analisi delle mutazioni nonsense e deleterie nella progenie M₃ e nelle popolazioni segreganti

Al fine di selezionare gli individui che presentavano le mutazioni di interesse in omozigosi, all'interno delle progenie M₃ o in popolazioni segreganti, è stato messo a punto un saggio di tipo PCR-MAS (*Marker Assisted Selection*) basato sullo studio delle curve di *melting* (HRM *genotyping*). Questo metodo, richiede la produzione di frammenti genoma-specifici compresi tra 50 e 100 bp, in cui lo SNP ricade in posizione centrale nell'amplicone di interesse (Figura 4.7). Questo saggio è stato utilizzato per analizzare le mutazioni *SBEIIa-A*⁻, *SBEIIa-B*⁻ e SVEMS_1433.

Per ottenere un amplificato omeoallele-specifico è stata effettuata una prima PCR utilizzando i primer riportati in tabella 3.13. In seguito, l'amplicone ottenuto è stato utilizzato come DNA stampo per una seconda reazione PCR finalizzata alla produzione di frammenti corrispondenti alle dimensioni ottimali per la tecnica del HRM *genotyping* (Figura 4.7). Per validare questo saggio, è stata allestita una piastra PCR con genotipi noti per la mutazione *SBEIIa-A*⁻. I genotipi omozigoti mutanti, wt ed eterozigoti sono facilmente distinguibili in quanto mostrano curve di *melting* differenti (figura 4.8).

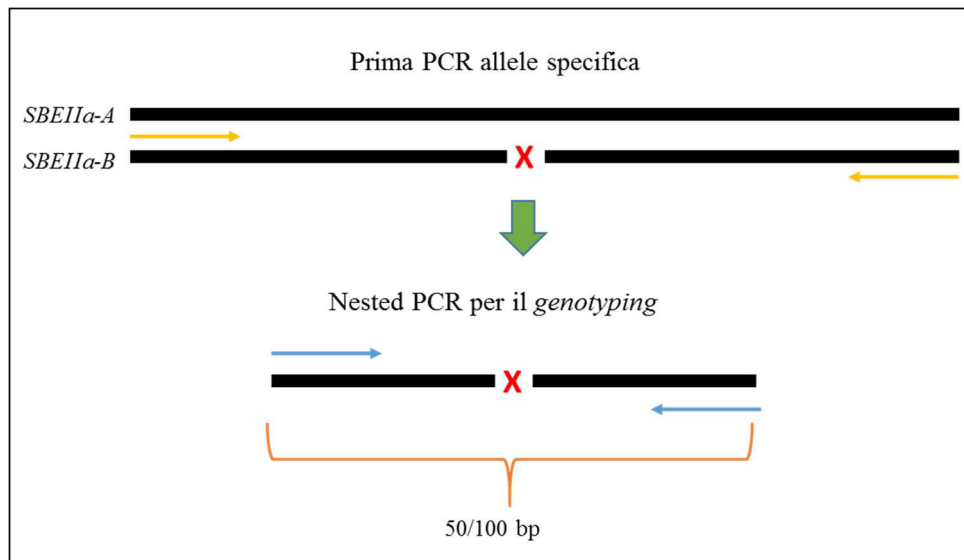


Figura 4.7. Immagine illustrativa della strategia utilizzata per selezionare la mutazione in omozigosi nelle progenie M_3 o in popolazioni segreganti. Con le frecce in giallo sono indicati gli oligonucleotidi allele specifici utilizzati per amplificare il frammento contenente la mutazione. Le frecce celesti indicano i primer utilizzati per amplificare il frammento di circa 50-100 paia di basi contenente lo SNP (indicata con la X in rosso).

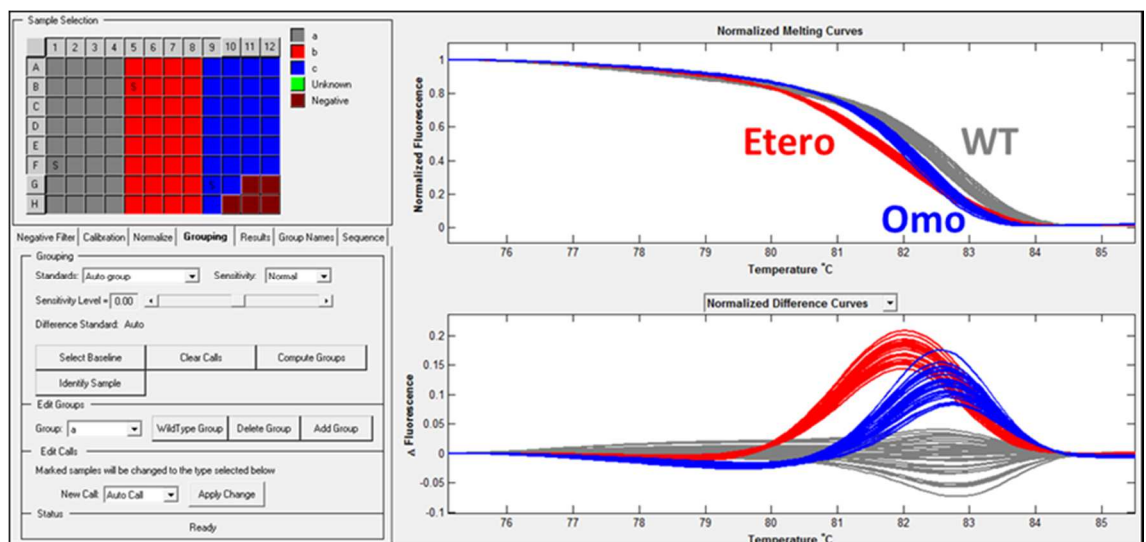


Figura 4.8. Analisi HRM *genotyping* utilizzata per i genotipi del mutante $SBEIIa-A^-$. La griglia a sinistra mostra i campioni analizzati. Le curve sulla destra mostrano le curve di *melting*. In grigio, blu e rosso sono indicati rispettivamente i campioni wt, omozigoti (Omo) ed eterozigoti (Etero) per la mutazione di interesse.

4.3.4. HRM *genotyping* della famiglia M_3 segregante per la mutazione $SBEIIa-B^-$

La linea $SBEIIa-B^-$ ha presentato nella popolazione M_2 analizzata la mutazione in condizione eterozigote. Attraverso l'uso dell'HRM *genotyping* è stata analizzata la progenie M_3 allo scopo di individuare piante omozigoti per tale mutazione.

L'analisi di 38 individui della progenie M_3 $SBEIIa-B^-$ ha permesso di identificare 7 piante omozigoti per la mutazione di interesse, 18 eterozigoti e 13 wt (Figura 4.9).

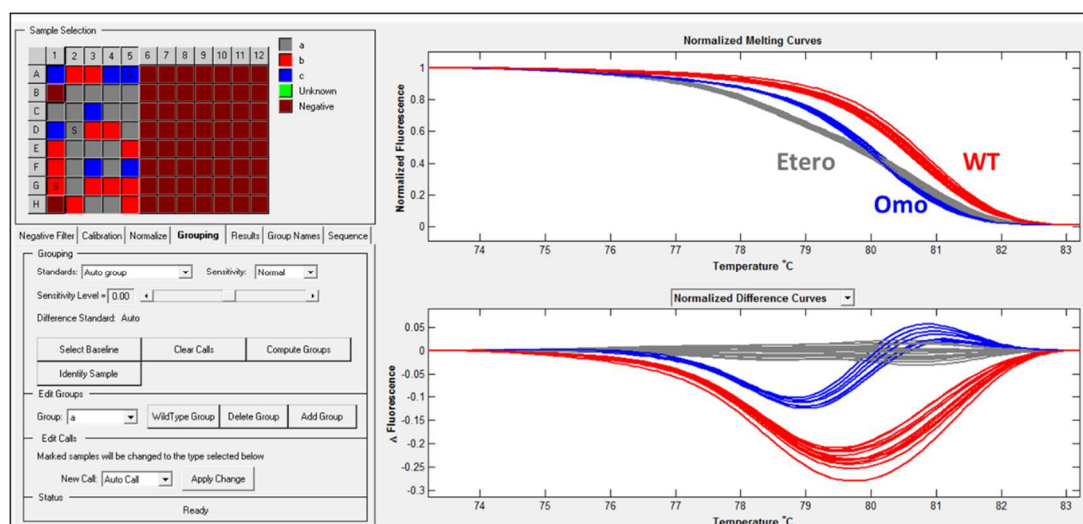


Figura 4.9. Analisi HRM della progenie M₃ del mutante SBEIIa-B⁻. La griglia a sinistra mostra i campioni analizzati. Le curve sulla destra mostrano le curve di *melting*. In rosso, blu e grigio sono indicati rispettivamente i campioni wt, omozigoti (Omo) ed eterozigoti (Etero) per la mutazione di interesse.

4.3.5. Piramidizzazione delle mutazioni di interesse per *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*

Allo scopo di ottenere una linea doppio *null* per entrambi gli omeoalleli *SBEIIa* e per studiare gli effetti fenotipici della mutazione SVEMS_1433, predetta deleteria per la funzionalità della proteina, sono stati effettuati gli incroci riportati in tabella 4.4. Le piante F₁ ottenute da tali incroci, per autofecondazione, hanno generato le progenie F₂ segreganti per le mutazioni di interesse.

Tabella 4.4. Schema degli incroci effettuati per piramidizzare le mutazioni di interesse individuate per i geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*.

Incrocio	Genotipo 1 x Genotipo 2
1	SBEIIa-A ⁻ x SBEIIa-B ⁻
2	SVEMS_1433 x SBEIIa-B ⁻

4.3.6. Analisi genotipica delle popolazioni segreganti F₂ derivanti dalla piramidizzazione delle mutazioni di interesse per *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*

L'HRM *genotyping* è stato utilizzato per analizzare le popolazioni segreganti F₂ derivanti dagli incroci descritti in tabella 4.4. In accordo con la legge di assortimento indipendente dei cromosomi, ogni 16 piante analizzate è attesa una pianta omozigote per le mutazioni in entrambi i genomi.

Su 176 piante analizzate F₂ SBEIIa-A⁻ x SBEIIa-B⁻, 11 piante hanno mostrato un genotipo mutante doppio *null* (SBEIIa-A⁻B⁻) e 14 sono risultate wt per entrambi gli omeoalleli. La differenza tra le piante attese e quelle osservate non è risultata significativa ($\chi^2=8,02$, $p>0,05$).

Per l'incrocio SVEMS_1433 x SBEIIa-B⁻ sono state analizzate 113 piante di cui cinque sono risultate omozigoti per entrambe le mutazioni e sei wt per entrambi gli omeoalleli. Questi numeri sono significativamente diversi dal risultato atteso per la segregazione mendeliana di due caratteri ($\chi^2=19,60$, $p<0,05$).

4.3.7. Analisi di espressione degli omeoalleli *SBEIIa* nei genotipi singoli e doppio nulli

Sulle linee singolo *nulli* *SBEIIa-A*⁻ e *SBEIIa-B*⁻ e sulla linea doppio *nulli* *SBEIIaA*⁻*B*⁻ è stata condotta un'analisi d'espressione dei due omeoalleli *SBEIIa*. L'analisi ha avuto lo scopo di verificare se le mutazioni, responsabili della formazione dei codoni di stop prematuri, avevano un effetto sul livello dei trascritti. L'analisi è stata condotta sul cDNA dei tre genotipi sintetizzato mediante RT-PCR a partire dall'RNA isolato dalle cariossidi immature allo stadio di 14 giorni post-antesi (14 DPA). Per l'analisi di espressione quantitativa real-time PCR (qRT-PCR) sono stati utilizzati primer omeoallele-specifici precedentemente disegnati nel nostro laboratorio (Botticella et al. 2011). Il gene della Gliceraleide-3-Fosfato Deidrogenasi (GAPDH) è stato utilizzato come *house keeping* per normalizzare le quantità di cDNA.

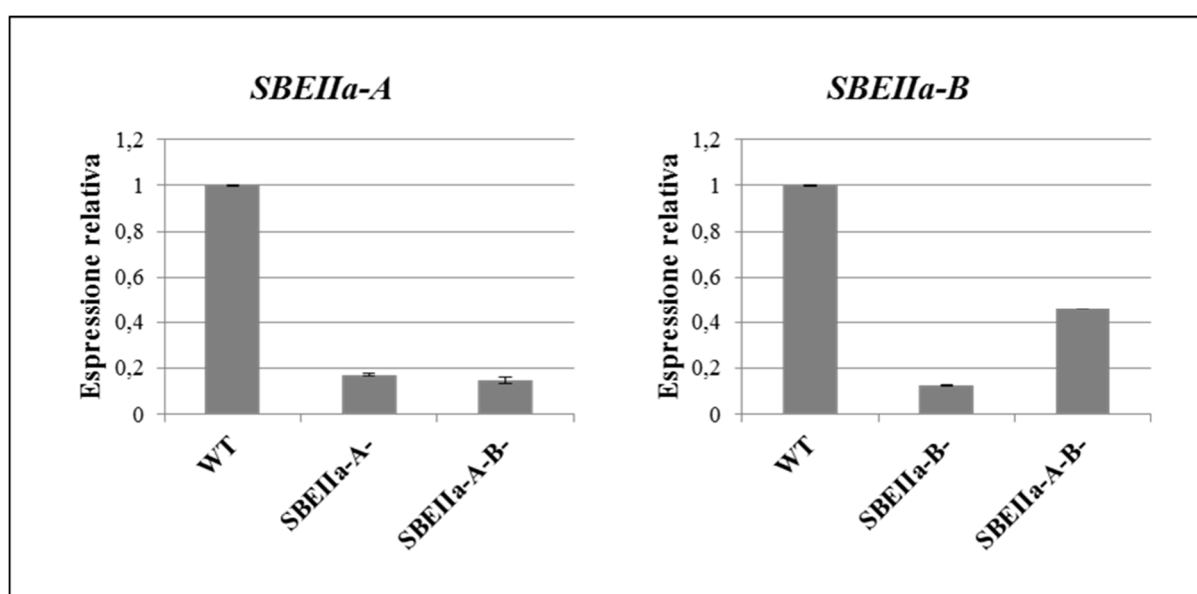


Figura 4.10. Analisi di espressione qRT-PCR dei geni omeologhi *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* condotta su cariossidi immature (14 DPA) della cultivar Svevo wt (WT), del mutante singolo *nulli* per il genoma A (*SBEIIa-A*⁻), del mutante singolo *nulli* per il genoma B (*SBEIIa-B*⁻) e del mutante doppio *nulli* per entrambi gli omeoalleli (*SBEIIa-A*⁻*B*⁻). I dati sono presentati come la media $\pm$ l'errore standard della media.

Se confrontato con il wt (cv Svevo), il livello di trascritto dell'allele *SBEIIa-A* ha mostrato una riduzione dell'83% nel genotipo *SBEIIa-A*⁻ e dell'85,5% nel doppio *nulli* *SBEIIaA*⁻*B*⁻ (Fig. 4.10). Per l'allele *SBEIIa-B* sono stati ottenuti risultati simili. La sua espressione, rispetto al wt, è risultata ridotta dell'87,7% nel genotipo *SBEIIa-B*⁻ e del 54% nel doppio *nulli* *SBEIIaA*⁻*B*⁻ (Fig. 4.10).

4.3.8. Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) dei granuli di amido delle linee mutanti di interesse

Attraverso l'analisi al microscopio elettronico a scansione, è stata caratterizzata la morfologia dei granuli di amido della linea doppio *nulli* *SBEIIa-A*⁻*B*⁻, dei singoli *nulli* *SBEIIa* (*SBEIIa-A*⁻ e *SBEIIa-B*⁻) e del mutante SVEMS_1433 (Figura 4.11). Tale analisi ha mostrato profonde alterazioni nella morfologia dei granuli di amido di tipo A sia del mutante doppio *nulli* *SBEIIa-A*⁻*B*⁻ che del mutante SVEMS_1433. In queste due linee, i granuli sono risultati deformati, presentando una forma irregolare ed appiattita,

rispetto alle linee wt (WT e WT nulli). Le linee *nulli* parziali SBEIIa-A⁻ e SBEIIa-B hanno invece presentato dei granuli che non mostravano differenze significative rispetto al nulli segregante ed al wt.

4.3.9. Determinazione del contenuto di amilosio nelle linee mutanti di interesse

Al fine di valutare l'effetto del silenziamento dei geni *SBEIIa* sulla composizione dell'amido, è stato determinato il contenuto di amilosio in tre linee sorelle doppio *nulli* SBEIIa-A⁻B⁻, nei singoli *nulli* SBEIIa (SBEIIa-A⁻ e SBEIIa-B⁻) e nella linea mutante SVEMS_1433 (Figura 4.12).

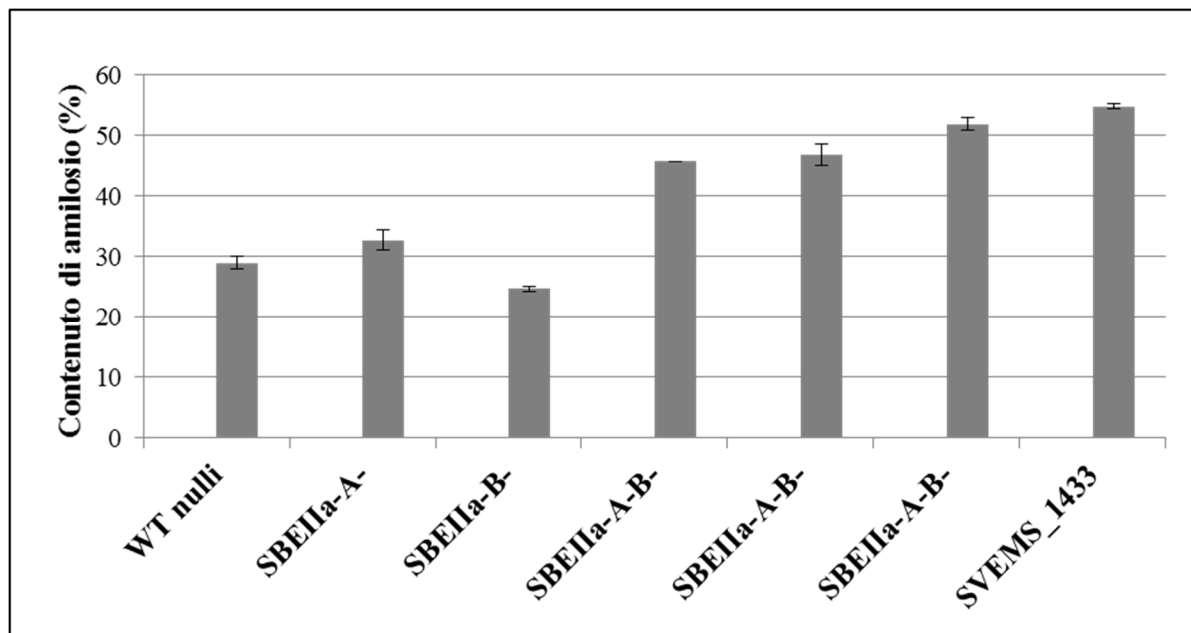


Figura 4.12. Analisi del contenuto di amilosio condotta su cariossidi mature del genotipo *nulli* segregante wt (WT nulli), del mutante singolo *nulli* per il genoma A (SBEIIa-A⁻), del mutante singoli *nulli* per il genoma B (SBEIIa-B⁻), del mutante doppio *nulli* per entrambi gli omeoalleli (SBEIIa-A⁻B⁻; tre linee) e del mutante deleterio per il genoma A (SVEMS_1433). I dati sono presentati come la media $\pm$ l'errore standard della media.

La linee singolo *nulli* SBEIIa-A⁻ e SBEIIa-B⁻ non hanno mostrato una variazione del contenuto di amilosio significativa rispetto alla linea nulli segregante wt. Invece, le tre linee sorelle doppio *nulli* SBEIIa-A⁻B⁻ hanno mostrano un aumento del contenuto di amilosio rispettivamente del 158%, 162% e 179%. Infine, inaspettatamente, l'incremento più alto del contenuto di amilosio (189%) è stato osservato nella linea mutante SVEMS_1433.

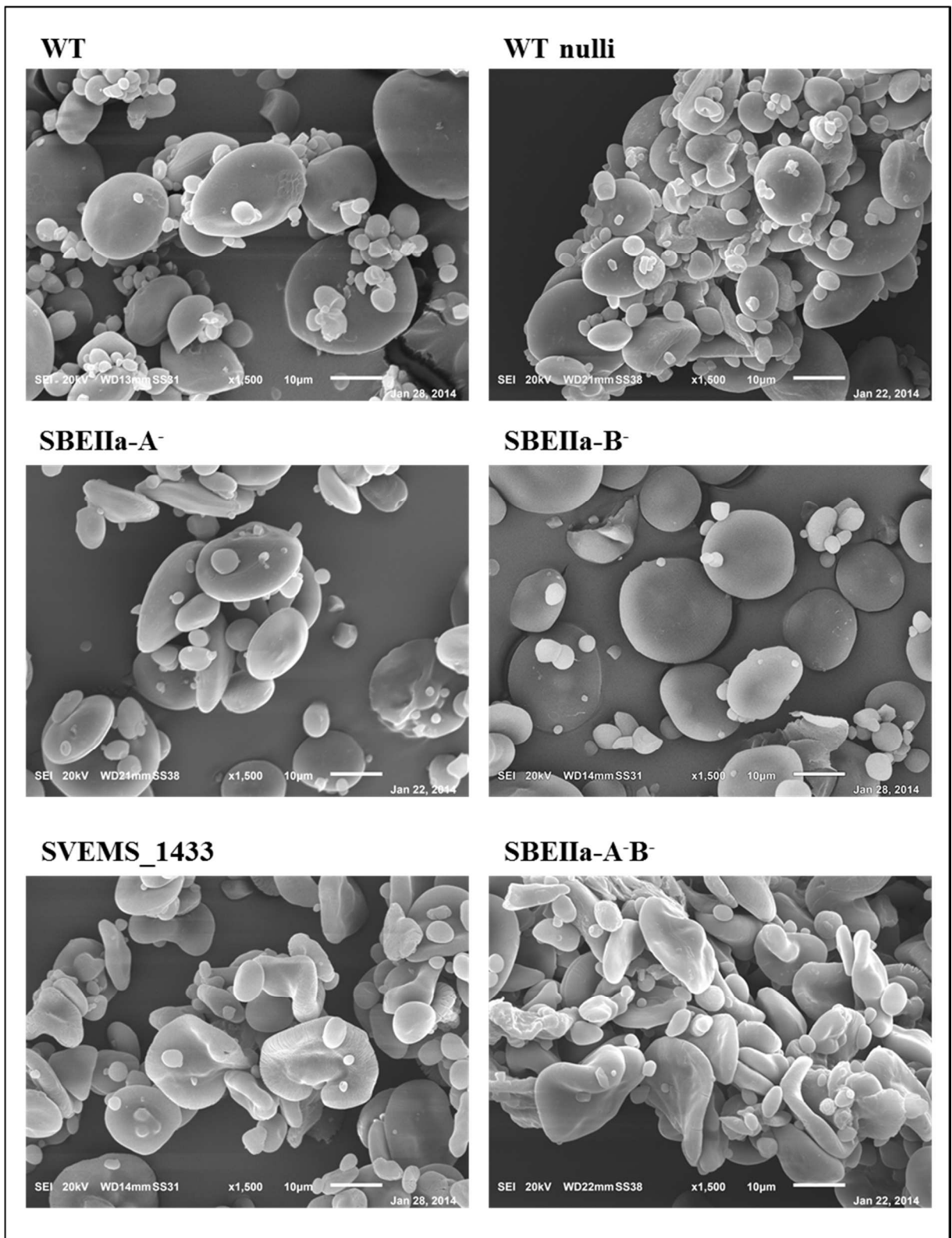


Figura 4.11. Analisi SEM dei granuli di amido nelle cariossidi mature della cultivar Svevo wt (WT), del genotipo nulli segregante wt (WT nulli), della linea doppio *nulli* SBEIIa-A⁻B⁻, dei singoli *nulli* SBEIIa (SBEIIa-A⁻ e SBEIIa-B⁻) e del mutante SVEMS_1433.

4.3.10. Sequenziamento dell'allele *SBEIIa-B* nella linea SVEMS_1433

La linea SVEMS_1433 ha presentato una morfologia dei granuli di amido ed un contenuto di amilosio simile al mutante doppio *nulli* *SBEIIa-A-B*. Per indagare il motivo di questo interessante fenotipo si è ipotizzata la presenza di una mutazione deleteria o non senso anche nell'omeoallele *SBEIIa-B*. Per dimostrare questa ipotesi, è stato sequenziato l'allele *SBEIIa-B* sia della linea mutante SVEMS_1433 che del genotipo wt (cv Svevo) e sono state confrontate le due sequenze per identificare possibili polimorfismi.

La strategia utilizzata per il sequenziamento del gene *SBEIIa-B* è schematizzata in figura 4.13. Il gene è stato isolato attraverso la produzione di cinque frammenti PCR (Figura 4.14), dalla cui unione si è ottenuta l'intera sequenza codificante il gene. L'utilizzo di almeno un oligonucleotide allele specifico per ciascuna amplificazione ha consentito di ottenere frammenti PCR puri e corrispondenti al singolo omeoallele *SBEIIa-B*. I cinque frammenti PCR coprono l'intera regione codificante composta da 22 esoni. Tali ampliconi sono stati sequenziati attraverso una strategia di *gene walking*.

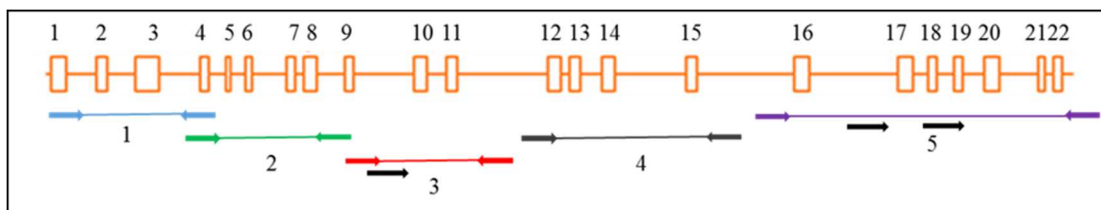


Figura 4.13. Rappresentazione schematica della strategia PCR utilizzata per sequenziare il gene *SBEIIa-B* sia nella linea mutata SVEMS_1433 che nella cultivar Svevo. I rettangoli arancioni rappresentano gli esoni mentre le linee che li collegano rappresentano le regioni introniche. I segmenti colorati rappresentano i cinque frammenti amplificati per PCR, le frecce colorate i primer utilizzati sia per l'amplificazione che per il sequenziamento, mentre le frecce in nero sono i primer interni utilizzati solo per il sequenziamento.

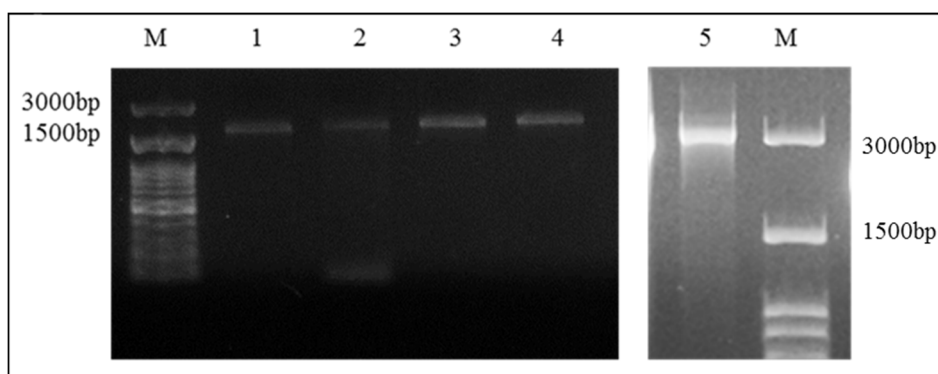


Figura 4.14. Gel elettroforetico dei frammenti genoma specifici amplificati per sequenziare l'allele *SBEIIa-B* della linea SVEMS_1433. I numeri in alto (1, 2, 3, 4, 5) corrispondono ai frammenti amplificati che sono di rispettivamente di 1655 bp, 1798 bp, 1970 bp, 1920 bp e 2900 bp; M, Marker Genedirex 100 bp.

L'allineamento della sequenza dell'allele *SBEIIa-B* tra la linea SVEMS_1433 e Svevo ha identificato una sola mutazione in condizione omozigote nell'esone 10. Questa mutazione è una transizione G→A, coerente con l'effetto del trattamento EMS applicato alle piante, adiacente al sito di *splicing* dell'esone. L'analisi di allineamento delle sequenze ha mostrato che, nella linea SVEMS_1433, l'allele A e l'allele B del gene *SBEIIa* presentavano lo stesso SNP nella stessa posizione (Figura 4.15).

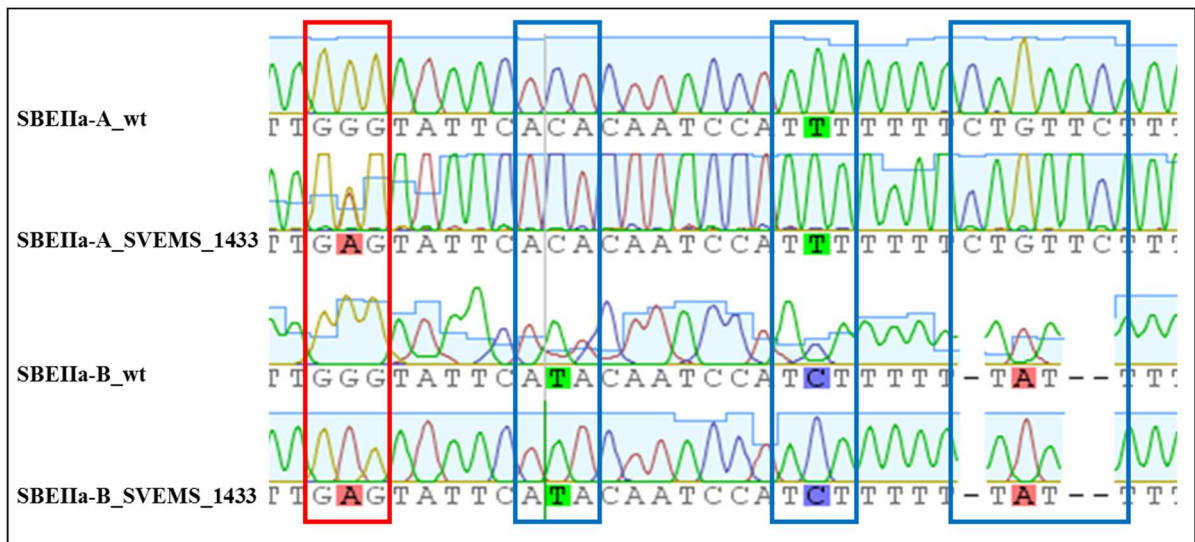


Figura 4.15. Allineamento tra le sequenze dell'allele A e dell'allele B della linea SVEMS_1433 e del wt Svevo. Nel riquadro in rosso è evidenziato lo SNP che caratterizza la linea SVEMS_1433 presente in entrambi gli alleli. La sequenza dell'allele SBEIIa-A della linea SVEMS_1433 presenta lo SNP di interesse in condizione eterozigote (doppio picco nell'elettroferogramma). Nel box celeste sono evidenziati alcuni SNP che discriminano l'allele A dall'allele B.

4.3.11. Predizione della struttura secondaria delle proteine omeologhe SVEMS_1433

Attraverso l'utilizzo del programma bioinformatico GOR IV (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) è stato possibile predire la struttura secondaria delle proteine omeologhe SBEIIa-A e SBEIIa-B mutanti nella linea SVEMS_1433 e confrontarle con le rispettive proteine wt (SBEIIa-A_wt e SBEIIa-B_wt). L'analisi ha mostrato che il cambiamento amminoacidico G364E comporta la perdita della formazione di due foglietti β in corrispondenza della mutazione su entrambi gli omeoalleli (Figura 4.16).

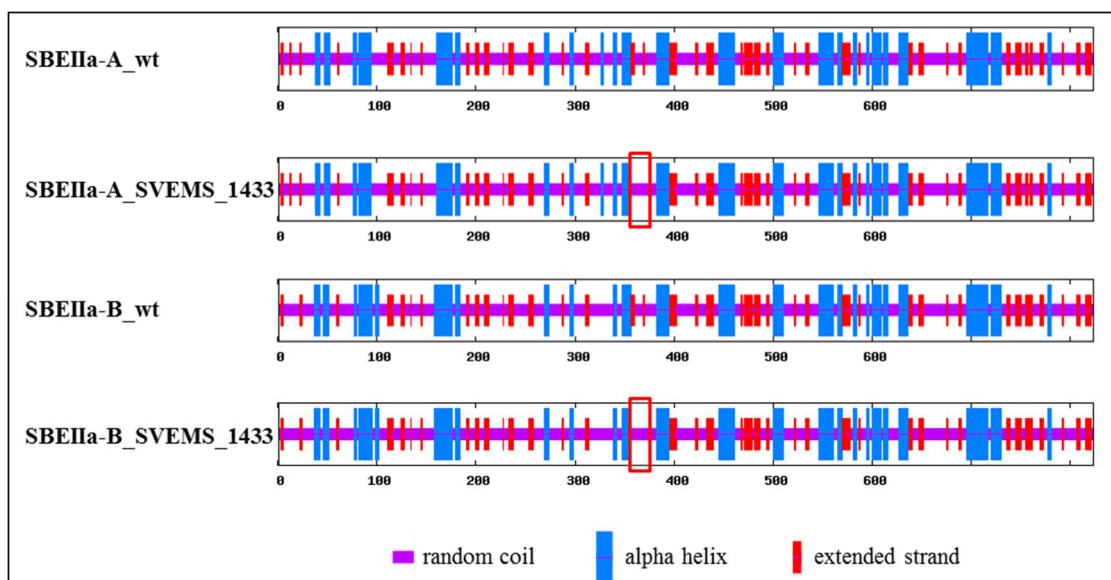


Figura 4.16. Predizione GOR IV della struttura secondaria delle proteine omeologhe SBEIIa-A_wt e SBEIIa-B_wt e delle proteine mutate per il genoma A e B della linea mutante SVEMS_1433. Il rettangolo in rosso mette in evidenza la regione interessata dalla mutazione responsabile della variazione di struttura secondaria delle proteine omeologhe mutate SBEIIa-A_SVEMS_1433 e SBEIIa-B_SVEMS_1433 se confrontate con le rispettive controparti wt (SBEIIa-A_wt e SBEIIa-B_wt).

4.4. Identificazione di nuove varianti alleliche nei geni omeologhi GW2

Al fine di aumentare le rese in frumento è stata ricercata nuova variabilità allelica per il gene *GW2*, regolatore negativo della grandezza della cariosside, sia nella popolazione TILLING di frumento duro che nel mutante naturale a seme grande Lankaodali.

4.4.1. Isolamento dei geni *GW2-A* e *GW2-B* dalla cultivar Svevo di frumento duro

Le sequenze parziali dei geni omeologhi *GW2-A* e *GW2-B* sono state isolate dal DNA genomico di *T. durum* cv Svevo attraverso una strategia basata sulla PCR.

Ciascun gene è stato isolato attraverso la produzione di due ampliconi sovrapponibili dalla cui unione si è ottenuta una regione rispettivamente di 4097 bp per *GW2-A* e 4112 bp per *GW2-B* (Figura. 4.17). Tale regione si estende dal 5'UTR fino al sesto esone. Il primo frammento (A1 e B1) di entrambi gli omeoalleli è stato isolato in due reazioni PCR indipendenti attraverso l'utilizzo di oligonucleotidi genoma-specifici riportati nel lavoro di Su et al. (2011). L'analisi dell'allineamento tra le due sequenze ha rilevato diversi polimorfismi (Figura 4.18), utilizzati poi per il disegno degli oligonucleotidi *forward* necessari per l'amplificazione dei frammenti A2 e B2 (Figura 4.17) in combinazione con i *reverse* disegnati sul sesto esone delle sequenze di cDNA del gene *TaGW2*, disponibili in banca dati (*TaGW2-A*, GenBank acc. JN896622; *TaGW2-B*, GenBank acc. JN896623). L'utilizzo di oligonucleotidi omeoallele-specifici per ciascuna amplificazione ha consentito di ottenere frammenti PCR puri e corrispondenti ad un singolo allele *GW2*.

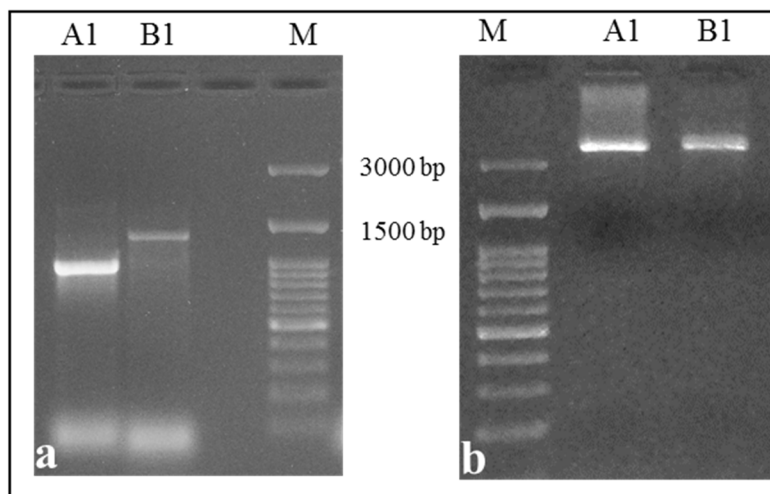


Figura 4.17. (a) Analisi elettroforetica dei frammenti A1 e B1 e (b) A2 e B2. Gli ampliconi A1 e B1 sono di rispettivamente 949 bp e 1275 bp; gli ampliconi A2 e B2 sono rispettivamente di 3256 bp e 3264 bp. M, Marker Genedirex 100bp.

I frammenti nella figura 4.17a sono stati sequenziati attraverso l'utilizzo dei primer HAP-6A-P1F e HAP-6A-P1R per l'allele A e *TaGW2-6B-F* e *TaGW2-6B-R* per l'allele B. Mentre per quanto riguarda gli ampliconi della figura 4.17b sono stati inizialmente sequenziati con i primer *Gw532A-F* e *Gw-NEWR* per l'allele A e *Gw532B-F* e *Gw2500-R* per l'allele B. Per sequenziare gli interi ampliconi è stata seguita una strategia di *gene walking*, disegnando primer che permettessero di sequenziare la

regione interna dei frammenti A2 e B2 ottenuti. La struttura parziale dei geni è stata quindi ricostruita connettendo le sequenze dei due frammenti sovrapposti A1 e A2 per l'allele GW2-A e B1 e B2 per l'allele GW2-B.

```

GW2-A      TTCCTTATAGCCAATGTGGTGAACATAGCAAATTGATTCCCCGGGTTTGATTCCATGTG 60
GW2-B      -----

GW2-A      CTCTAGCCAAAATAGATCAAATCAGCAAGATATCTTATGCTATGAATGGTGATAGTGGTC 120
GW2-B      -----TAGATCAAATCAACAAGATATCTTATGCTATGAATGATGATAGTGGTC 48
          *****

GW2-A      GCTCATGTTTCATCTCGACTGCCGAAATCATGTGCCCTTAGCGGACGTTGTACTCCTCGGC 180
GW2-B      GCTCATGTTTCATCTCGACTGCCGAAATCATGTGCCCTTAGCGGACGTTGTACTCCTCGGC 108
          *****

GW2-A      AGTGGCCACTATCAACGAGCGGCGGCAGCCAAGACGAAGGGATCCATGCAGATCGTGAGC 240
GW2-B      AGTGGCCACTATCAGCGAGCGGCGGCAGCCAAGCGCAAGGGATCCATGCAGATCGTGAGC 168
          *****

GW2-A      AACCGTCCATGCGTGGCTGCGGCAGACCGGAGCAGAGTAGGAGGCGGCAGATTCCACCA 300
GW2-B      AACCGTCCATGCACGGCTGCGGCAGACCGGAACACGAGTGGGAGGCGGCAGATTCC-CCA 227
          *****

GW2-A      TGGAAGGCCGAGGAGTGGCAAGGGTAGAGGTGGATGCAGGAGGAGGGGGAGAAAGGC 360
GW2-B      TGGAAGGCCGAGGAGTGGCAGGGTAGAGGTGTATGCAGGAGGAGGGAAGAGAAAGGC 287
          *****

GW2-A      TGGTGCTATGGACCGCGGGAGGGGAGGACGTGCCAGTGACGAGGGAAGCGAAGGGCGGAG 420
GW2-B      TGGTGCTATGGCCCGCGGGACGGGAGGACGTGCCAGTGACGAGGGAAGCGAAGGGCGGAG 347
          *****

GW2-A      CGGCAGGAGGCCTGTGCGGTGATGAGATCCCGTACAGCAGCTCGCAACAAACCTAGCT 480
GW2-B      CGGCAGGAGGCCTAGCGGGTTGATGAGATCCCGTGCAGTAGCTCGCAACAAACCTAGCT 407
          *****

GW2-A      CGCGCGAGAAGAGAGAGGGGATGTTGCGATCAAAGAGAGGACGAGAGAAAACCGGCGTGG 540
GW2-B      CACGCCAGGAGAGAGAAGGGATGTTGAGATCAAAGAGAGAAGGAGAGAAAACCGGCGTGG 467
          * * * * *

GW2-A      TAAGAAAAATCGAT - AAGGAAAGAACATCGTATGAGTGGAGAAGGGTGAGACGAAAA -TA 598
GW2-B      TAAGAAAAATCGATGAAGGAAAGGACATCGTACGAGTGGGAAAGGGTGAGACGAAAAATA 527
          *****

GW2-A      AATCGAACGAAAAATAATCATAAAGTGAAAGCTACCAAGTCCTTCTTTAAAGTAGAGATC 658
GW2-B      ATTCGACGAAAAATAAACGTAAAGTGAAAGCTATCAAATCCTCCTTTAAAGTAGGGATC 587
          * * * * *

GW2-A      ACATATTGCTTAGAGGAAAGATGAAGGGTAGGTGATGCGCCCGCGGTGATGCACTCAT 718
GW2-B      ACGTATTGCTTGGATGAAAGATGAAGGGTAGGTGATGCGCCCGCGGTGATGCACTCAT 647
          * * * * *

GW2-A      CATGTCGCTTCCCATTTACGAAAGCATTACCTATGTTTATCAAGCGTTACATGGGATAGG 778
GW2-B      CATGTCGCTTCCCATTTACGAAAGCATTACCTATGTTTATCAAGCGTTACAGGGGATAGG 707
          *****

```

Figura 4.18. Allineamento delle sequenze parziali dei geni *GW2-A* e *GW2-B* ottenute attraverso l'utilizzo dei primer riportati da Su et al. (2011). Gli asterischi indicano le basi conservate tra i due alleli. In giallo ed in verde sono evidenziate le regioni sulle quali sono stati disegnati i primer specifici rispettivamente per il genoma A e per il genoma B.

4.4.2. Analisi delle sequenze nucleotidiche dei due omeoalleli GW2-A e GW2-B

La struttura dei due geni è stata determinata attraverso il confronto delle sequenze dei due alleli GW2-A e GW2-B con le sequenze di cDNA del gene *TaGW2* isolato dalla cultivar *Recital* disponibili in banca dati (*TaGW2-A*, GenBank acc. JN896622; *TaGW2-B*, GenBank acc. JN896623). I due geni sono entrambi costituiti da otto esoni, le cui dimensioni sono riportate in tabella 4.5. Inoltre, è stata eseguita un'ulteriore analisi *in silico*, utilizzando il genoma di *T. urartu* (Ling et al. 2013), che ha permesso l'identificazione dell'intera regione codificante del gene GW2-A.

Tabella 4.5. Descrizione delle dimensioni degli esoni nei geni GW2.

Esone	GW2-A (bp)	GW2-B (bp)
1	198	198
2	52	52
3	46	46
4	82	82
5	163	163
6	103	103
7	67	63
8	564	564

4.4.3. Caratterizzazione della proteina GW2

Tramite il programma *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) sono state allineate e comparate le sequenze amminoacidiche parziali codificate dai due alleli GW2-A e GW2-B (Figura. 4.20) di frumento duro e la proteina GW2-A di *T. urartu*. La proteina GW2 di *T. urartu* è costituita da 424 residui amminoacidici ed ha un peso molecolare di circa 47 kDa. Questa proteina è caratterizzata dalla presenza di un dominio RING di tipo C5HC2 di 43 amminoacidi, compreso tra i residui amminoacidici 61-103. Questo dominio contiene otto amminoacidi (sette cisteine ed un'istidina) le cui posizioni sono considerate essere fondamentali per la formazione del motivo a dita di zinco tipico della proteina GW2. Nella regione N-terminale, è situato un motivo ricco in residui di leucina denominato NES (*Nuclear Exportation Signals*), che è responsabile del trasporto della proteina dal nucleo al citosol. In frumento duro, la regione N-terminale di entrambi gli alleli è risultata essere altamente conservata (98.1% dall'aminoacido 1 al 104) e la proteina GW2-A risulta identica a quella di *T. urartu*. Le sequenze amminoacidiche del dominio RING e LxxLxLx sono identiche sia in entrambi gli alleli di frumento duro sia in *T. urartu* (Figura 4.19).

```

                                     NES
TuGW2      MGNRIGGRRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKKLRKLILEAKLAPCYPGADDAAGGDLEE 60
GW2-A      MGNRIGGRRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKKLRKLILEAKLAPCYPGADDAAGGDLEE 60
GW2-B      MGNRIGGRRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKKLRKLILEAKLAPCYPGADDAAGGDLEE 60
          *****

          C1 C2          C3 C4 C5      H6      C7 C8
TuGW2      CPICFLYYPSLNRSKCCSKGICTECFLQMKPTHTARPTQCPFCITPNYAVEYRGVKTKEE 120
GW2-A      CPICFLYYPSLNRSKCCSKGICTECFLQMKPTHTARPTQCPFCITPNYAVEYRGVKTKEE 120
GW2-B      CPICFLYYPSLNRSKCCSKGICTECFLQMKPTHTARPTQCPFCITPNYAVEYRGVKTKEE 120
          *****

          . RING DOMAIN
TuGW2      RSIEQFEEQKVIEAQMRVRQQALQDEEDKMKRKQSRCSSRTIAPTTEVEYRDICSTSYS 180
GW2-A      RSIEQFEEQKVIEAQMRVRQQALQDEEDKMKRKQSRCSSRTIAPTTEVEYRDICSTSYS 180
GW2-B      RSIEQFEEQKVIEAQMRMRQQALQDEEDKMKRKQSRCSSRTIAPTTEVEYRDICSTSYS 180
          *****

TuGW2      VPSYQCTQQETECCSSEPSCSAQANMRSFHSRHTRDDNIDMNIEDMMVMEAIWRSIQEQG 240
GW2-A      VPSYQCTQQETECCSSEPSCSAQANMRSFHSRHT----- 104
GW2-B      VPSYQCTEQETECCSSEPSCSAQANMRSFHSRHT----- 104
          *****

TuGW2      SIGNPSCGSFMPFEQPTRERQAFVAAPPLEMPHPGGFSCAVAAMAEHQPSMDFSMTGS 300
GW2-A      -----
GW2-B      -----

TuGW2      SAFPVFDMFRRPCNIAGGSMGAAESSPDWSGSIAPSCSRREVVREEGECSTDHWSEGAEA 360
GW2-A      -----
GW2-B      -----

TuGW2      GTSYAGSDIVVDAGTMLPLPFADNYSMVASHFRPESIEEQMMYSMAVSLAEAHGRHTHTQG 420
GW2-A      -----
GW2-B      -----

TuGW2      LAWL 424
GW2-A      ---
GW2-B      ---

```

Figura 4.19. Allineamento delle sequenze aminoacidiche parziali delle proteine GW2-A e GW2-B di frumento duro e della proteina GW2-A di *T. urartu*. Nella box verde è evidenziato il motivo NES, ricco in residui di leucina (LxxLx); mentre nella box in rosso è evidenziato il dominio RING e i residui numerati di cisteina ed istidina, nelle posizioni conservate, deputati al legame con lo ione metallico.

Attraverso una ricerca nel database NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sono state identificate le sequenze amminoacidiche ortologhe alla proteina GW2 di frumento isolate da altre specie appartenenti alla famiglia delle *Poaceae* (*Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Brachypodium distachyon*, *Setaria italica*). L'allineamento delle sequenze amminoacidiche ha evidenziato che in tutte le specie la parte N-terminale, che comprende i domini RING e NES è altamente conservata (Figura 4.20).

SiGW2-2	SYMAGSSTFPVYDMIRRPCNISGGSMCAVENSSSLDTWSGIAPSCSR-EVLREEGECSTDH	356
SiGW2-1	SYMAGSSTFPVYDMIRRPCNISGGSMCAVENSSSLDTWSGIAPSCSR-EVLREEGECSTDH	357
	:*.::*:**:* **::*: : ** : ***:..* :*:** **	
OsGW2-J	WSEGAEAGTSYAGSDIVADAGTMPQLPFAENFAMAPSHFRPESIEEQMMFMSMALSLADG-	411
OsGW2-I	WSEGAEAGTSYAGSDIVADAGTMPQLPFAENFAMAPSHFRPESIEEQMMFMSMALSLADG-	413
BdGW2	WSEGAEAGTSYAGSDIVADAGTMPQLPFAENYMAPSHFRPESIEEQMMYSMTVSLAEA-	412
TuGW2	WSEGAEAGTSYAGSDIVVDAGTMLPLPFADNYSMVASHFRPESIEEQMMYSMAVSLAEA-	412
TaGW2-A	LSEGAEAGTSYAGSDIVVDAGTMLPLPFADNYSMVASHFRPESIEEQMMYSMAVSLAEA-	412
TaGW2-B	WSEGAEAGTSYAGSDIVVDAGTTPLPVTDNYSMVASHFRPESIEEQMMYSMAVSLAEA-	412
HvYrg1	WSEGAEAGTSYAGSDIMADAGTMPPLPFADNYSMAASHFRPESIEEQMMYSMAVSLAEA-	412
ZmGW2-ch.5	WSEGAEAGTSYAGSDIMVDAGAMQPLPFAENFTMAPSHFRPESIEEQMMFMAVSLAEGH	416
SbGW2	WSEGAEAGTSYAGSDIMADTGTMQPLPFAENFTMAPSHFRPESIEEQMMFMAVSLAEAH	416
ZmGW2-ch.4	WSEGAEAGTSYAGSDIMADAGAMQPLPFAENFAMGPHFRPESVEEQMMFMAVSLAEAH	418
SiGW2-2	WSEGAEAGTSYAGSDIMADAGSMQPLPFAENFAMAPSHFRPDSIEEQMMFMAVSLTDAH	416
SiGW2-1	WSEGAEAGTSYAGSDIMADAGSMQPLPFAENFAMAPSHFRPDSIEEQMMFMAVSLTDAH	417
	*****::*:**:* **::*: * .*****:*****:*****:*****:	
OsGW2-J	HGRTHSQGLAWL	423
OsGW2-I	HGRTHSQGLAWL	425
BdGW2	HGRTHSQGLAWL	424
TuGW2	HGRTHSQGLAWL	424
TaGW2-A	HGRTHSQGLAWL	424
TaGW2-B	HGRTHSQGLAWL	424
HvYrg1	HGRTHSQGLAWL	424
ZmGW2-ch.5	HGRTHSQGLAWL	428
SbGW2	HGRTHSQGLAWL	428
ZmGW2-ch.4	HGRTHSQGLAWL	430
SiGW2-2	HGRTHSQGLAWL	428
SiGW2-1	HGRTHSQGLAWL	429
	***:*.::*:**:*	

Figura 4.20. Allineamento delle sequenze amminoacidiche delle proteine GW2 isolate dalle principali specie appartenenti alla famiglia delle *Poaceae*. L'asterisco indica gli amminoacidi conservati; in rosso sono evidenziati gli amminoacidi conservati del dominio RING; in giallo è evidenziato il residuo amminoacidico all'interno del dominio RING delle accessioni di riso che è diverso dal residuo amminoacidico presente in tutte le altre specie; in verde è evidenziato il motivo NES (LxxLxL); a sinistra il nome della proteina delle varie specie cerealicole (OsGW2-J, *Oryza sativa Japonica* [riso]; OsGW2-I, *Oryza sativa Indica* [riso]; BdGW2, *Brachypodium distachyon*; TuGW2, *Triticum urartu*; TaGW2-A e TaGW2-B, *Triticum aestivum* [frumento]; HvYrg1, *Hordeum vulgare* [orzo]; ZmGW2-ch.4 e ZmGW2-ch.5, *Zea mays* [mais]; SbGW2, *Sorghum bicolor* [sorgo]; SiGW2-1 e SiGW2-2, *Setaria italica*).

4.4.4. Analisi filogenetica della proteina GW2

Al fine di stimare le relazioni evolutive delle le proteine GW2 tra le differenti specie, è stato costruito un albero filogenetico attraverso il metodo Neighbor-Joining. In totale sono state analizzate 12 sequenze amminoacidiche che includono, oltre alle proteine GW2 di frumento tenero e di *T. urartu*, anche sequenze isolate da altre specie appartenenti alla famiglia delle Poaceae come orzo, riso, mais, sorgo, *Brachypodium distachyon* e *Setaria italica*. Tutte le sequenze possono essere raggruppate in due gruppi principali (Figura 4.21). Le sequenze delle due specie appartenenti alla tribù delle *Triticeae* (orzo e frumento) sono molto vicine tra di loro e formano il gruppo I. Filogeneticamente più distanti dalle proteine GW2 di frumento sono quelle presenti negli altri cereali presi in considerazione per questo studio, che formano il gruppo II.

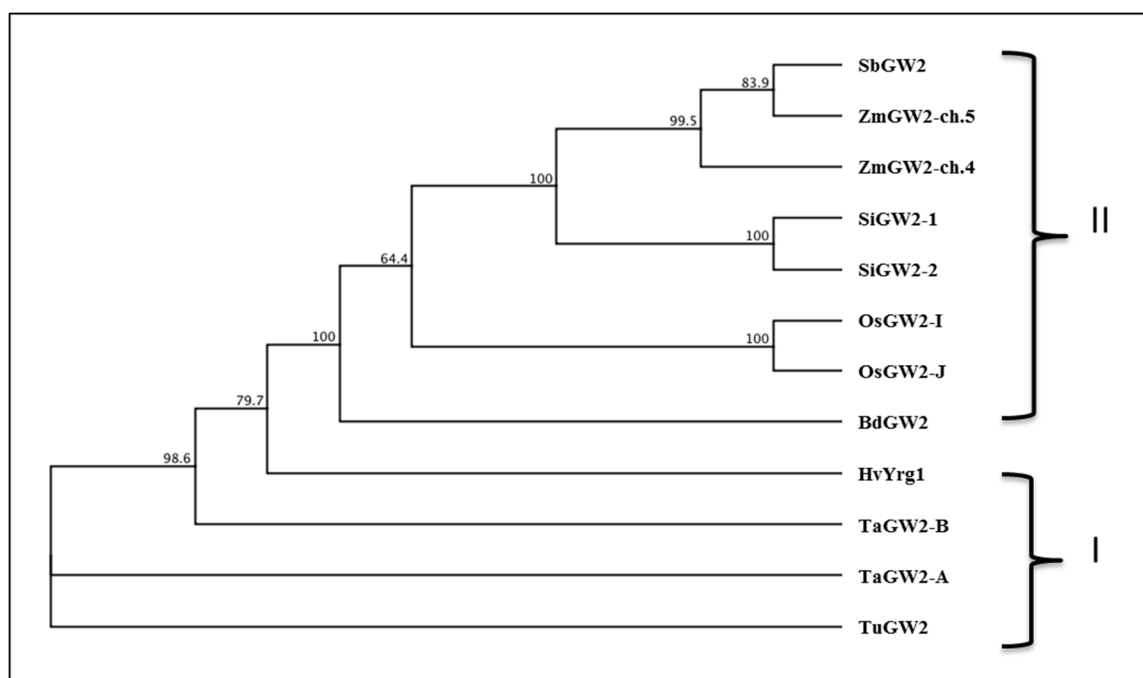


Figura 4.21. Albero filogenetico consenso delle proteine omologhe GW2 delle principali specie appartenenti alla famiglia delle Poaceae. Ad ogni nodo dell'albero viene mostrata la percentuale di supporto *bootstrap* (1000 repliche). Albero filogenetico basato sulle sequenze delle proteine GW2. OsGW2-J, *Oryza sativa Japonica* [riso]; OsGW2-I, *Oryza sativa Indica* [riso]; BdGW2, *Brachypodium distachyon*; TuGW2, *Triticum urartu*; TaGW2-A e TaGW2-B, *Triticum aestivum* [frumento]; HvYrg1, *Hordeum vulgare* [orzo]; ZmGW2-ch.4 e ZmGW2-ch.5, *Zea mays* [mais]; SbGW2, *Sorghum bicolor* [sorgo]; SiGW2-1 e SiGW2-2, *Setaria italica*).

4.4.5. TILLING

Le analisi TILLING sono state condotte su circa 2500 linee mutagenizzate di frumento duro descritte nel capitolo precedente al fine di individuare mutazioni puntiformi in entrambi gli omeoalleli del gene GW2.

4.4.5.1. Sviluppo di primer allele specifici per l'analisi di TILLING

Attraverso l'utilizzo del programma CODDLE sono state identificate le regioni dei due omeoalleli GW2 interessate dalla presenza di domini funzionali, più adatte all'analisi TILLING, in termini di probabilità di individuare mutazioni deleterie. Nell'allele GW2-A, sono stati identificati due domini conservati indicati con le sigle IPB003888 corrispondente al dominio N-terminale e IPB007696 al C-terminale (dato non mostrato). Nella figura 4.22 viene riportata la regione conservata del blocco IPB003888 all'interno della sequenza amminoacidica di GW2-A. L'analisi dell'omeologo GW2-B ha mostrato la sola presenza del dominio IPB003888 nella regione N-terminale. L'individuazione dei domini conservati è stata utilizzata per la valutazione dell'effetto delle mutazioni missenso sulla funzionalità della proteina. In figura 4.23 è riportata la sequenza del gene GW2-A che è stata ritenuta più idonea per l'analisi TILLING per l'alta frequenza di siti "caldi"; la tabella 4.6 riassume gli esoni che sono stati analizzati e il numero di nucleotidi identificati dal programma CODDLE, che se mutati dall'EMS, provocano un codone di stop prematuro.

84

97

AGTACTACCCAAGCCTTAACCGATCAAAATGTTGCTCGAAAGGGATATGTACAGGT AATGTATCTGTCCTACTAG
 CTACTACCAGTGATTGTGTGTTACTTGTAGGTGCAAATTTCTTACATGTCTTGTGTTGTTATTTTGCAGAGTGC
 TTTCTTCAAATGAAACCAACTCATACTGCTCGACCTACACAGTATCCTTCATACCATCTCTGTTCTTGTTCAAA
 TATCCTGTATTGGTAAGTAATGTATGGGCCCTTGTCAATTCTCACGGTAACACTTAACCAATAAAGATGCCCATTC
 TGCAAAACCCCAACTATGCTGTGGAGTATCGTGGTGTAAAGACAAAGGAGGAAAGGAGCATAGAGCAATTTGT
 AGTCTTATTCCCTAATGTGTTTGTGTTTGTGTTGATATTAGAAAGCCAAATTCATTTACTTTATCTTGATAAAT
 TTTGTTACAGGAAGAACAGAAAGTCATTGAAGCACAGATGAGGGTGCGGCAGCAAGCACTTCAAGACGAAGAGGA
 TAAGATGAAAAGAAAAAGAGTAGGTGCTCTTCTAGCAGAACAATCGCTCCAACAACAGAAGTGGAGTATCGAGA
 TATTTGCAGCACATCCTATTCAAGTCTGCACTAGATACGACAAATGTACACATTTAATAATGTCAATTTTTCTGT
 AGTTTAATCTGATAACTTACAATTTACTATGTTTCGTTGCAGTGCCATCGTACCAATGTACCCAGCAAGAAACTGA
 ATGTTGTTTCGTCTGAGCCTTCATGTTCTGCTCAGGCTAACATGCGGTCTTTCCATTCTAGGCATACTCGGT

Figura 4.23. Immagine illustrativa delle regione analizzata del gene *GW2-A*. In verde sono evidenziati le regioni esoniche; in viola i nucleotidi che se mutati portano ad un codone di stop; in rosso i siti di *splicing*.

Tabella 4.6. Identificazione dei nucleotidi che se mutati dall'EMS, provocano un codone di stop prematuro nei vari esoni del gene *GW2-A*.

ESONE	NUCLEOTIDI
2	1
3	3
4	1
5	7
6	4

In totale sono stati individuati 16 nucleotidi che, se mutati, portano alla formazione di codoni di stop prematuri causando la perdita della funzione della proteina

L'allineamento delle sequenze genomiche degli alleli *GW2-A* e *GW2-B* ha permesso di identificare regioni geniche adatte a disegnare coppie di oligonucleotidi genoma specifici per i due alleli da poter utilizzare per le analisi TILLING. La specificità dei primer è stata testata utilizzando le linee ditelosomiche di frumento tenero *Chinese Spring*. In specifico sono state utilizzate le linee ditelosomiche prive dei bracci corti del cromosoma 6, in cui sono localizzate le tre copie omeologhe del gene *GW2* di frumento tenero (Su et al, 2011; Tabella 4.7).

Tabella 4.7. Composizione cromosomica delle linee ditelosomiche di *Chinese Spring*.

Linee	CS	CS6AL	CS6BL	CS6DL
Braccio assente	Nessuno	6AS	6BS	6DS
Genotipo GW2	GW-A, GW-B, GW-D	GW-B, GW-D	GW-A, GW-D	GW-A, GW-B

In figura 4.24 è riportata l'analisi elettroforetica dei prodotti PCR ottenuti da due coppie di oligonucleotidi specifiche, rispettivamente, per gli omeoalleli *GW2-A* e *GW2-B* (Tabella 3.9). Nella individuazione degli oligonucleotidi specifici per i due omeoalleli non si è tenuto conto del gene *GW*-

2D (genoma D). Nella figura 4.24a la banda corrispondente all'amplificato della linea Cs6AL, che doveva essere assente, risulta di dimensioni differenti perché è il prodotto dell'amplificazione del gene *GW2* localizzato sul genoma D (dato confermato mediante sequenziamento).

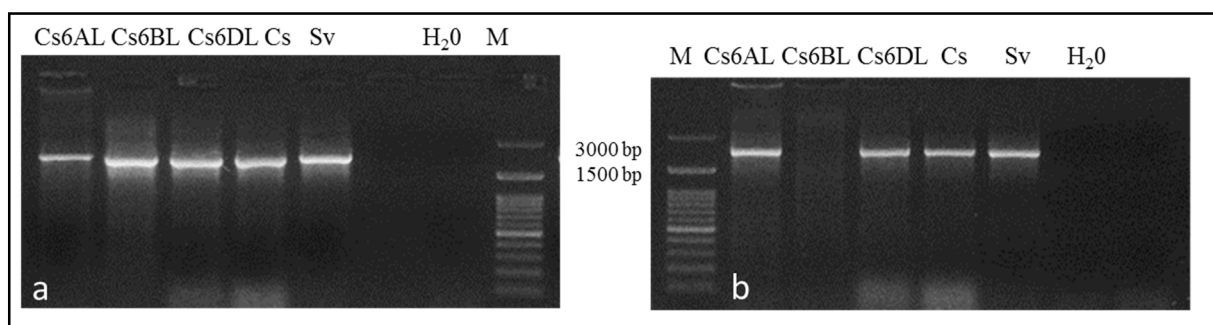


Figura 4.24. Separazione su gel di agarosio all'1,2% del prodotto PCR ottenuto con primer specifici per gli alleli *GW2-A* (a) e *GW2-B* (b) sul DNA genomico delle linee ditelosomiche *Chinese Spring* Cs6AL, Cs6BL e Cs6DL prive rispettivamente dei bracci corti dei cromosomi 6A, 6B e 6D. Cs indica la cv di frumento tenero *Chinese spring* mentre Sv indica la cv di frumento duro *Svevo*. M, Marker Genedirex 100 bp.

Sia per il genoma A che per il genoma B, gli oligonucleotidi sono stati disegnati in modo da amplificare la regione del gene identificata dal programma CODDLE, contenente un'alta densità di regione codificante. Le due coppie di primer amplificano la regione che si estende dall'esone 2 all'esone 6 (Fig. 4.25).

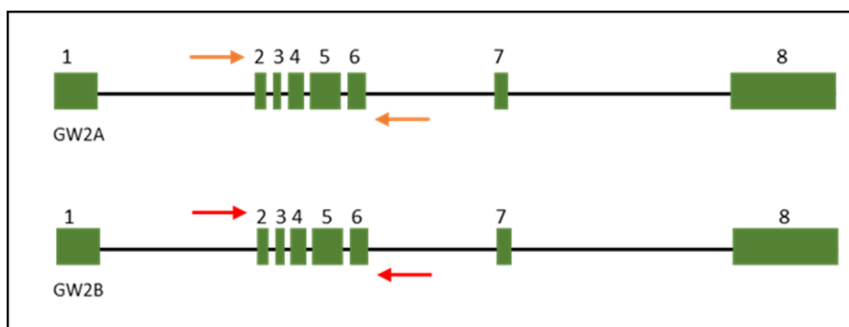


Figura 4.25. Schema dei frammenti PCR amplificati dalle coppie di oligonucleotidi genoma specifici per i due omeoalleli *GW2-A* e *GW2-B*. I rettangoli in verde rappresentano gli esoni; le regioni introniche sono rappresentate dalle linee orizzontali nere; la numerazione si riferisce alla posizione degli introni all'interno del gene; la freccia arancione e rossa indicano, rispettivamente, gli oligonucleotidi specifici per l'allele *GW2-A* e *GW2-B*.

4.4.5.2. Produzione degli ampliconi per l'analisi *High Resolution Melting*

Gli ampliconi omeologhi specifici sono stati ottenuti mediante PCR sui *pool* costituiti ciascuno da due genotipi della collezione di DNA genomico estratto dalle piante M₂ della popolazione mutagenizzata. Gli ampliconi di dimensioni ottimali per l'analisi HRM sono stati prodotti attraverso una strategia di Nested-PCR: i frammenti PCR omeologo-specifici, descritti nel paragrafo precedente, sono stati utilizzati come DNA stampo in una seconda reazione PCR finalizzata alla produzione di frammenti corrispondenti ciascuno alla regione genica di un singolo esone e di dimensioni comprese tra 141 e 281 bp. Le coppie di oligonucleotidi utilizzate (Tabella 3.11) sono posizionate a circa 20 nt a monte

(*forward*) e a valle (*reverse*) dell'esone *target*. Questo tipo di strategia risulta essere selettiva per l'individuazione di SNP localizzati nella regione codificante ed è ideale nel caso di geni ricchi di regione non codificante come i geni *GW2*.

4.4.5.3. Nuove varianti alleliche identificate per i due omeologhi *GW2*

L'analisi della popolazione mutagenizzata tramite HRM è stata condotta come descritto nel sottocapitolo 4.3. I genotipi che sono stati identificati come putativi mutanti, sono stati confermati tramite sequenziamento e sono state individuate sia mutazioni in condizione omozigote che eterozigote. Tutte le mutazioni identificate sono transizioni del tipo C→T e G→A, coerentemente con l'effetto del trattamento con EMS applicato alla popolazione (Greene et al. 2003; Till et al. 2004).

In tabella 4.8 sono riportati i dati relativi al numero di piante analizzate e dei mutanti identificati per ciascuno allele *GW2*. In totale sono state identificate 29 nuove varianti alleliche: 16 per il gene *GW2-A* e 13 per il *GW2-B*. Inoltre, è stata calcolata una frequenza media di mutazione di circa 1 SNP ogni 61 Kb per il gene *GW2-A* e di 1 SNP ogni 82 Kb per il gene *GW2-B*.

Tabella 4.8. La frequenza di mutazioni associata alla popolazione è stata calcolata secondo la formula: (dimensione regione analizzata) x (N° piante analizzate)/(N° di mutanti identificati).

Amplicone	Dimensioni (bp)	N° piante analizzate	Mutazioni identificate	Frequenza mutazioni (1/Kb)
A (2-6)	492	2002	16	1/61
B (2-6)	492	2184	13	1/82

Tabella 4.9. Caratterizzazione delle varianti alleliche mediante il programma PARSesNP per l'allele GW2-A e GW2-B. Nella seconda colonna (Cambiamento nucleotidico) è riportata la mutazione nucleotidica e la relativa posizione a partire dall'ATG della sequenza genica, mentre nella terza colonna (Effetto) è riportata la sostituzione amminoacidica che ne scaturisce e la relativa posizione nella sequenza proteica. La presenza della mutazione in una zona non codificante è indicata con Introne, mentre la mutazione sul sito di *splicing* è indicata con Splic. Jun. I valori PSSM vengono mostrati per le mutazioni missenso che cadono all'interno di un Blocco-dominio conservato; valori di PSSM>10 (in rosso) indicano che la mutazione provoca un profondo cambiamento rispetto al Blocco di riferimento; i valori <0 (in verde) indicano SNP che rendono la proteina più simile al blocco di riferimento. I valori di SIFT inferiori a 0,05 (in rosso) indicano che la mutazione è predetta deleteria per la funzionalità della proteina.

Allele	Cambiamento nucleotidico	Effetto	PSSM	SIFT	Zigosità
GW2-A	C1933T	N72=			Eterozigote
	C1948T	C77=			Omozigote
	G1957A	G80=			Eterozigote
	G1962A	C82Y	-0.2	0.11	Omozigote
	C1981T	Introne			Eterozigote
	C1982T	Introne			Eterozigote
	G2055A	Introne			Omozigote
	C2109T	Introne			Eterozigote
	C2233T	A109V	3	0.17	Eterozigote
	G2245A	R113H			Omozigote
	G2265A	E120K			Eterozigote
	G2269A	R121K			Omozigote
	C2466T	C157=			Eterozigote
	C2528T	S178F			Eterozigote
	C2699T	A204V			Eterozigote
	C2715T	F209			Eterozigote
GW2-B	C1915T	P69L	-10.6	1.00	Eterozigote
	G1960A	Splic. Jun			Omozigote
	C2110T	Introne			Eterozigote
	C2209T	C103=			Omozigote
	G2369A	E127K			Eterozigote
	G2440A	M150I			Eterozigote
	C2523T	S178F	3.5	0.00	Omozigote
	C2529T	S180L	9.3	0.01	Eterozigote
	C2627T	P182S	-3.2	0.67	Eterozigote
	G2645A	E188K	10.9	0.17	Eterozigote
	C2675T	P198S	-7.2	0.81	Omozigote
	G2703A	R207Q	1.2	0.12	Eterozigote
	C2905T	Introne			Eterozigote

Tabella 4.10. Mutazioni identificate nei due omeoalleli GW2

Gene	Non codificanti	Silenti	Missenso	Non senso	Siti di splicing
GW2-A	4	5	7	0	0
GW2-B	2	1	9	0	1

Le nuove varianti alleliche identificate sono state analizzate attraverso il programma PARSESNP al fine di valutare l'effetto delle mutazioni missenso sulla funzionalità della proteina. La quasi totalità delle mutazioni identificate ricadono nelle regione codificante dei due alleli; la maggior parte (16) sono risultate mutazioni *missenso*, di cui 7 nel gene GW2-A e 9 nel GW2-B (Tabella 4.13). Sono state, inoltre, individuate 5 mutazioni silenti per l'allele GW2-A e una per l'allele GW2-B; 4 mutazioni nelle regioni non codificanti del gene GW2-A e 2 nel gene GW2-B (Tabella. 4.10).

Per l'allele GW2-A non sono state trovate mutazioni predette deleterie per la funzionalità della proteina. Tuttavia, la variante allelica G1962A (GW2-A^{C82Y}) causa una sostituzione dell'amminoacido cisteina (C) in tirosina (Y) in posizione 82 interessando proprio una delle 7 cisteine conservate del dominio RING, coinvolte nel legame con lo ione zinco necessario per la formazione del motivo a dita di zinco (Figura 4.26).



Figura 4.26. L'immagine mostra l'allineamento tra il dominio RING della proteina GW-A e della variante allelica 4. In grigio sono evidenziati i residui amminoacidici comuni.

Per quanto riguarda, invece, l'allele GW2-B è stata identificata una mutazione sul sito di *splicing* (GW2-B) tra il secondo esone e il secondo introne. In questo mutante, la G è mutata in A nella posizione 1960 dall'ATG e questo cambiamento provoca la perdita della sequenza di *splicing* (GT) e di conseguenza un non corretto processamento del mRNA.

Tre mutazione missenso, predette deleterie per la funzionalità della proteina, sono state identificate nel dominio IPB00388D. La mutazione G188E (GW2-B^{G188E}) presenta un valore di PSSM > 10, mentre le altre due mutazioni (S178F, S180L), non hanno valori significati di PSMM ma presentano rispettivamente valori di SIFT di 0 e 0.01. Questi valori, sono inferiori al limite 0.05; per cui la sostituzione amminoacidica potrebbe avere un effetto deleterio sulla funzionalità della proteina GW2-B. Infine, è stata identificata una mutazione missenso (GW2-B^{P69L}) che non presenta valori di PSMM > 10, ma risulta interessante perché è situata all'interno del dominio RING. Questa mutazione è altamente probabile che abbia effetti deleteri sulla funzione della proteina, essendo tale dominio conservato non solo tra i due omeoalleli di frumento duro, ma anche tra gli ortologi delle principali specie cerealicole (Figura. 4.20).

La disponibilità di nuove varianti alleliche, che presentano cambiamenti amminoacidici nei domini catalitici dell'enzima, rappresentano uno strumento utile per la caratterizzazione funzionale della proteina GW2, la cui funzione non è ancora ben nota. In figura 4.27 è riportata la posizione di tutte le mutazioni identificate all'interno dei due alleli.

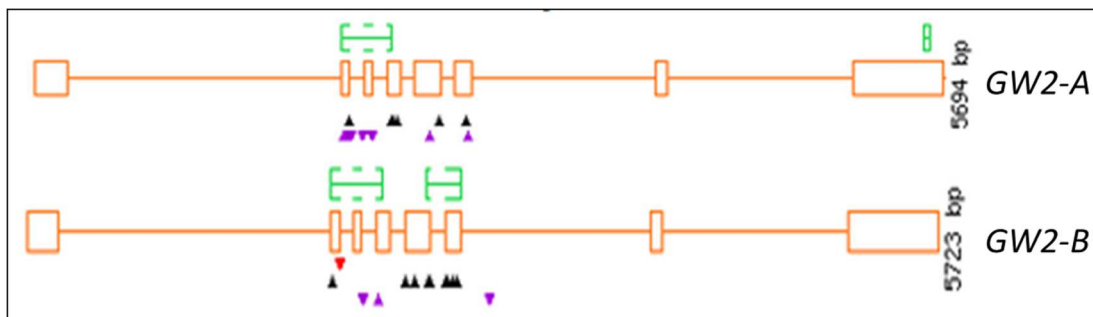


Figura 4.27. Rappresentazione schematica delle mutazioni individuate per i due alleli GW2-A e GW2-B. Le linee in verde rappresentano le regioni del gene interessate dalla presenza dei domini conservati. I triangoli rivolti verso l'alto rappresentano i polimorfismi localizzati nelle regioni esoniche; il triangolo in rosso mostra la mutazione nel sito di *splicing*; i triangoli in nero e in viola rappresentano, rispettivamente, le mutazioni missenso e le mutazioni silenti.

4.4.6. Predizione struttura secondaria delle proteine omeologhe GW2 mutate

Attraverso l'utilizzo del programma bioinformatico GOR IV è stato possibile predire la struttura secondarie delle proteine GW2-A_WT, GW2-B_WT e delle varianti alleliche rispettivamente del genoma A (GW2-A^{C82Y}) e B (GW2-B^{P69L} e GW2-B^{E188K}). L'analisi ha mostrato che le proteine mutate GW2-A^{C82Y} e GW2-B^{P69L} presentano una conformazione nella struttura secondaria diversa rispetto alle proteine wt. Invece, il cambiamento amminoacido E188K non porta cambiamenti nella conformazione della proteina (Figura 4.28).

4.4.7. HRM *genotyping* delle mutazioni predette deleterie nella progenie M₄

Le linee GW2-B^{P69L} e GW2-B^{G188E} presentano la mutazione di interesse, nella popolazione TILLING M₂, in condizione eterozigote. Attraverso l'uso dell'HRM *genotyping* è stata analizzata la progenie M₄ allo scopo di individuare piante omozigoti per tali mutazioni (Figura 4.29).

Per ottenere un amplificato specifico per il gene GW2-B è stata effettuata una prima PCR con i primer utilizzati per il TILLING (Tabella 3.9). La Nested-PCR è stata effettuato utilizzando i primer specifici per le mutazioni di interesse (Tabella 3.12).

Della linea GW2-B^{P69L} sono state analizzate 8 piante di cui 2 omozigoti, 3 WT e 3 eterozigoti per la mutazione C1915T. Della linea GW2-B^{G188E} sono state analizzate 10 piante per la mutazione G2645A e 6 sono risultate omozigoti mentre le restanti sono risultante WT.

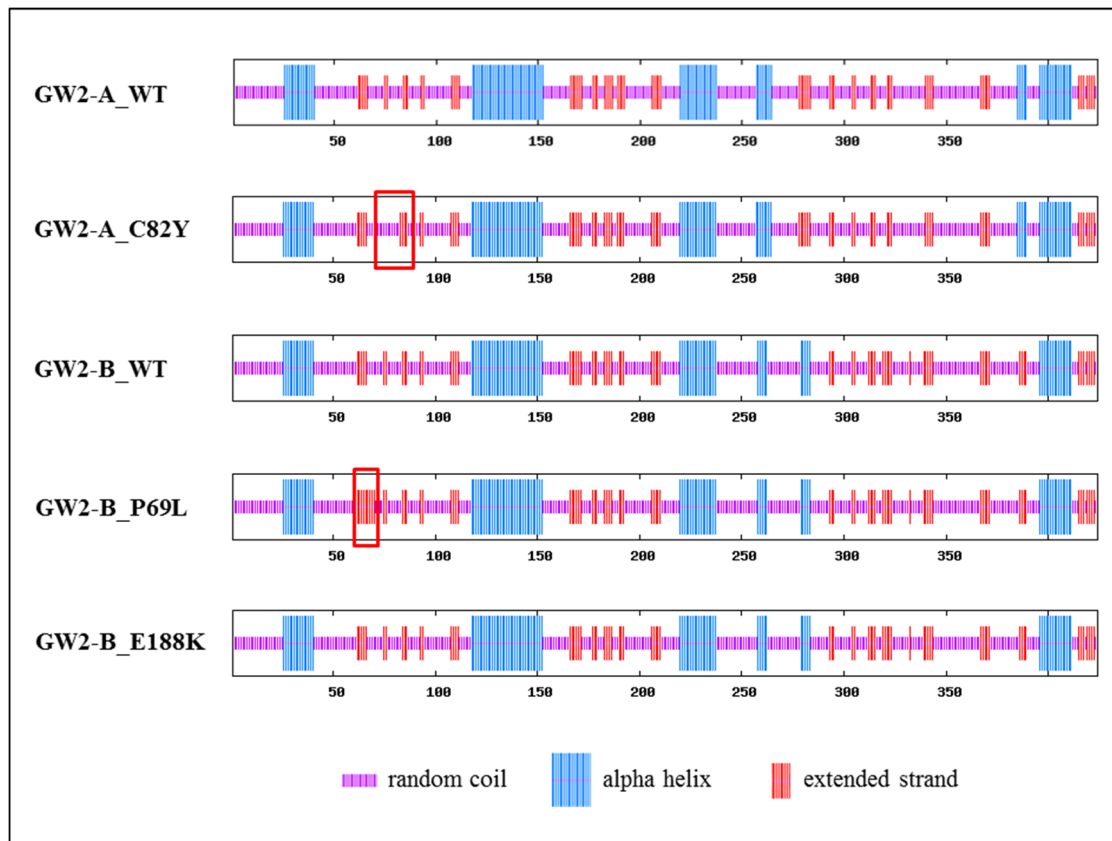


Figura 4.28. Predizione GOR IV della struttura secondaria delle proteine GW2-A_WT, GW2-B_WT e delle varianti alleliche rispettivamente del genoma A (GW2-A^{C82Y}) e B (GW2-B^{P69L} e GW2-B^{E188K}). I rettangoli rossi mettono in evidenza le regioni interessate dalle mutazioni responsabili della variazione di struttura secondaria delle proteine mutate se confrontate con le rispettive controparti WT.

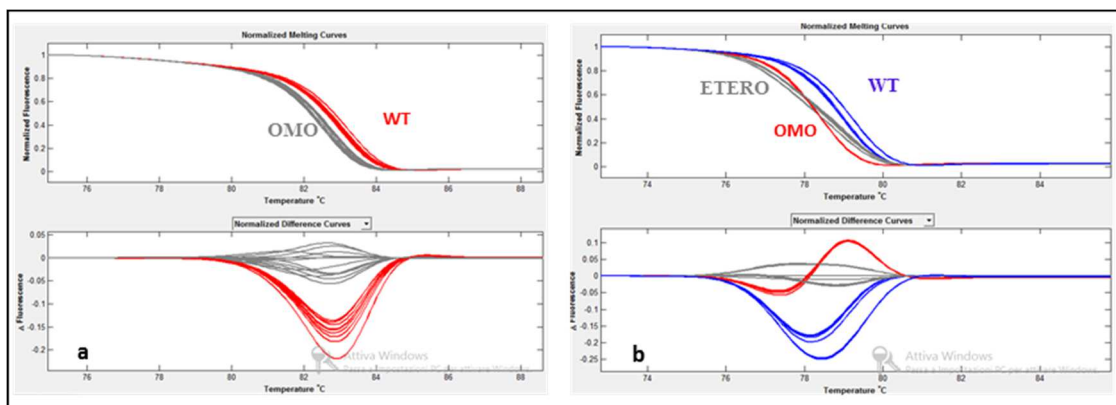


Figura 4.29. Analisi HRM *genotyping* della popolazione M₄ del mutante GW2-B^{G188E} e GW2-B^{P69L}. (a) Curve di *melting* dei campioni analizzati della linea GW2-B^{G188E} in grigio ed in rosso sono indicati rispettivamente i campioni omozigoti e WT per la mutazione. (b) Curve di *melting* dei campioni analizzati della linea GW2-B^{P69L}; in grigio, in rosso ed in blu sono indicati rispettivamente i campioni eterozigoti (ETERO), omozigoti (OMO) e WT per la mutazione.

4.4.8. Analisi del gene GW2-A nel mutante naturale Lankaodali

In un recente lavoro, è stata identificata una varietà cinese di frumento tenero (Lankaodali) a seme grande (Yang et al. 2012). Tale carattere è stato associato alla presenza di uno SNP (inserzione di una T) nell'esone 8 del gene GW2-A che provoca lo slittamento del *frame* di lettura e la formazione di un codone di stop prematuro. Yang et al. (2012) hanno disegnato dei primer per un saggio PCR in grado di

discriminare per la presenza/assenza dell'inserzione e che possono essere utilizzati in programmi di *breeding*.

In questo lavoro di tesi, al fine di aumentare la dimensione del seme in varietà commerciali italiane, la varietà Lankaodali è stata incrociata con la cultivar di frumento duro Svevo e la varietà di frumento tenero Rebelde. La progenie F_1 è stata analizzata con i primer di Yang et al. (2012) ma non è stato possibile distinguere la presenza o assenza del polimorfismo. Il sequenziamento del gene *GW2-A* di Lankaodali ha mostrato, che differentemente da quanto riportato da Yang et al. (2012), non è presente l'inserzione di una base sull'esone 8 (Figura 4.30). Tuttavia, l'allineamento tra le sequenze *GW2-A* isolate dalla varietà Lankaodali e dalla cultivar Svevo, ha mostrato la presenza di una delezione di 113 bp nella regione del promotore di Lankaodali a -116 bp dall'ATG. Questa regione include il sito di inizio della trascrizione (TSS, *Transcription Start Site*) e la TATA Box (predetti da Su et al. 2010; Figura 4.31).

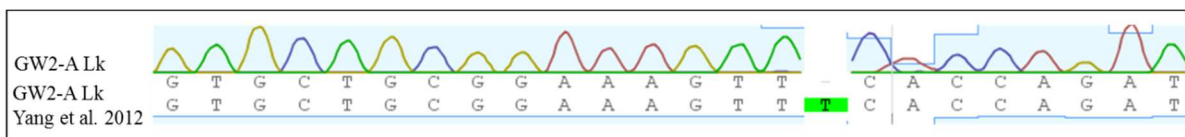


Figura 4.30. Allineamento tra la sequenza ottenuta di *GW2-A* di Lankaodali e la sequenza identificata nel lavoro di Yang et al. 2012. Lk; Lankaodali.

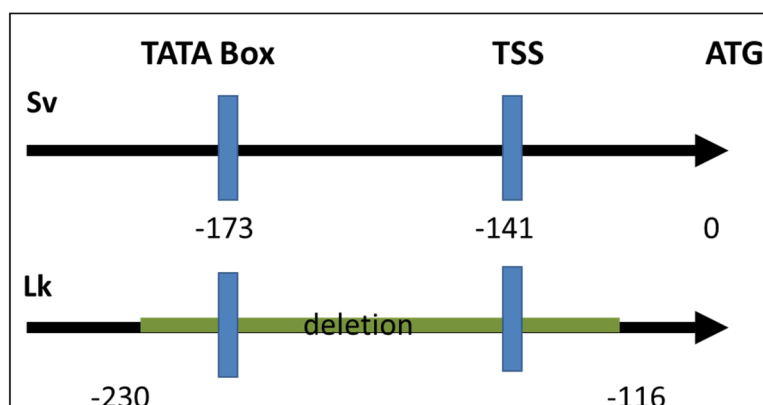


Figura 4.31. Immagine rappresentativa della regione del promotore del gene *GW2-A*. La freccia nera indica la sequenza del promotore del gene *GW2-A*; in verde è rappresentata la delezione presente nella varietà Lankaodali. Sv, Svevo; Lk, Lankaodali; TSS, *Transcription Start Site*.

4.4.9. Disegno di un saggio di tipo PCR-MAS per l'identificazione della delezione nel promotore identificata in Lankaodali

Per verificare la presenza o assenza della delezione nella regione del promotore in popolazioni segreganti o tra differenti varietà, sono stati disegnati dei primer specifici per l'allele *GW2-A* (AS-PCR) che discriminano per la presenza o assenza di tale polimorfismo. Attraverso la AS-PCR è stato possibile analizzare la progenie degli incroci F_1 tra la varietà Lankaodali e la cultivar di frumento duro Svevo e la varietà di frumento tenero Rebelde (Figura 4.32).

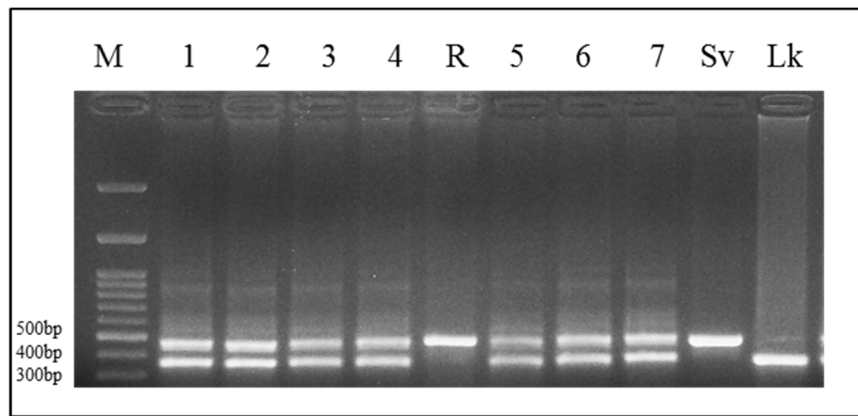


Figura 4.32. Analisi elettroforetica della progenie F₁ Lankaodali x Rebelde (campioni 1, 2, 3, 4) e Lankaodali x Svevo (campioni 5, 6, 7); Frammento Sv e R 469 bp; Frammento Lankaodali 356 bp; R, Rebelde; Sv, Svevo; Lk, Lankaodali. M, Marker Genedirex 100 bp.

4.4.10. Analisi del promotore del gene *GW2-A* in diverse specie e varietà di frumento

L'analisi del polimorfismo della regione del promotore di *GW2-A* è stata condotta sui frumenti selvatici diploidi, su le forme selvatiche e coltivate dei tetraploidi e su alcune varietà di frumento esaploide (Tabella 3.1). Nessuno dei frumenti analizzati ha presentato la delezione riscontrata in Lankaodali nella regione del promotore (dato non mostrato).

5. Discussione

Nel presente lavoro di dottorato è stata utilizzata una piattaforma TILLING di frumento duro (cv Svevo; Bovina et al. 2014) per identificare nuove varianti alleliche nei geni *SBEIIa* e *GW2* con l'obiettivo di migliorare sia le caratteristiche qualitative sia le rese della granella. La cultivar Svevo è stata scelta sia per le elevate caratteristiche qualitative nel processo di pastificazione che per la sua importanza a livello economico in Italia. Svevo è una cultivar primaverile precoce, caratterizzata da un alto contenuto proteico, un buon indice di giallo della semola e soprattutto un'elevata attitudine alla trasformazione industriale.

Negli ultimi anni, il TILLING è stato riconosciuto un valido strumento per il miglioramento delle colture, tra cui anche il frumento (Dong et al. 2009a; Uauy et al. 2009; Sestili et al. 2010a; Botticella et al. 2011; Hazard et al. 2012; Slade et al. 2012; Chen et al. 2012; Bovina et al. 2014). Il TILLING è una tecnica di genetica inversa che combina la mutagenesi classica con tecniche ad alta processività per il rilevamento di mutazioni puntiformi. I mutanti, indotti attraverso trattamento chimico con EMS, sono caratterizzati da polimorfismi a singolo nucleotide che hanno un effetto poco invasivo nel genoma della specie *target*. Il TILLING presenta diversi vantaggi rispetto ad altre tecniche di genetica inversa come, ad esempio, la mutagenesi inserzionale e l'RNAi. L'applicazione di queste tecniche implicano l'utilizzo della trasformazione genetica e della rigenerazione delle piante, processi mal tollerati dai cereali. Inoltre, la mutagenesi inserzionale non permette di generare serie alleliche ma unicamente mutanti *loss-of-function*. Le varietà generate attraverso il TILLING non sono sottoposte a norme di registrazione e commercializzazione restrittive come quelle previste invece per le piante transgeniche.

L'utilizzo di questa tecnica è particolarmente utile in frumento e in generale nelle piante con genomi poliploidi, dove la selezione dei caratteri d'interesse a livello fenotipico risulta difficile a causa della ridondanza di funzione dei geni omeologhi. Attraverso il TILLING è possibile identificare nuove varianti alleliche caratterizzate da mutazioni presenti nei domini conservati delle proteine. La disponibilità di genotipi caratterizzati da queste mutazioni rappresenta una risorsa d'interesse per studi funzionali con lo scopo di stabilire il ruolo svolto dai singoli amminoacidi nell'attività catalitica della proteina. Tuttavia la potenzialità maggiore del TILLING è la possibilità di generare mutanti *knock-out*, ossia genotipi caratterizzati dalla perdita di funzione del gene d'interesse.

Identificazione di nuova variabilità genetica nei loci *SBEIIa* attraverso il TILLING

In frumento, i geni *SBEIIa* sono stati associati a caratteri qualitativi di interesse relativi alle proprietà nutrizionali e tecnologiche delle farine. La perdita di funzione dei geni *SBEIIa*, sia in frumento tenero che in frumento duro, porta a fenotipi caratterizzati da un drastico incremento del contenuto di amilosio (Regina et al. 2006; Sestili et al. 2010b; Slade et al. 2012; Botticella et al. unpublished). Nei cereali, il fenotipo *high amylose* ha negli ultimi anni suscitato notevole interesse per le sue potenzialità di produrre alimenti ricchi in amido resistente, un componente bioattivo che apporta notevoli benefici alla salute umana. L'amido resistente è un componente ad azione prebiotica che stimola la produzione di SCFA ed

in particolare del butirrato che rappresenta uno dei composti preposti al mantenimento dei colonociti e alla prevenzione di importanti malattie come il cancro. L'aumento della percentuale di amido non digerito contribuisce alla diminuzione dell'indice glicemico degli alimenti e rappresenta una nuova opportunità nella gestione di diverse malattie legate a disturbi alimentari, molto diffuse nel mondo occidentale. Inoltre, le farine con un elevato contenuto di amilosio migliorano il nervo della pasta e la croccantezza di alcuni prodotti da forno quali *waffles* e cracker senza comprometterne la palatabilità.

Un fattore determinante per l'applicazione del TILLING è la disponibilità di sequenze che permettano di disegnare oligonucleotidi specifici in grado di isolare le sequenze codificanti per la proteina o il dominio proteico d'interesse producendo robuste amplificazioni PCR (Comai e Henikoff 2006). In specie poliploidi, come il frumento, l'utilizzo del TILLING è subordinato alla disponibilità di amplificazioni PCR omeoallele-specifiche che richiedono la conoscenza delle sequenze nucleotidiche dei singoli omeologhi codificanti per la proteina di interesse.

Precedentemente, nel nostro laboratorio, sono state isolate da frumento tenero le sequenze dei geni omeologhi *SBEIIa*. Attraverso l'utilizzo di *tool* bioinformatici, sono state identificate le regioni dei geni maggiormente idonee per l'analisi TILLING e sono stati disegnati gli oligonucleotidi utili per lo screening (Botticella et al. 2011). Inoltre è stata messa a punto la tecnica dell'HRM come metodo di rilevamento delle mutazioni puntiformi nei geni *SBEIIa* (Botticella et al. 2011).

Nel presente lavoro, dopo aver validato l'efficienza dei primer riportati da Botticella et al. (2011) in frumento duro, sono state identificate una serie di varianti alleliche per entrambi gli omeologhi *SBEIIa*. Per questi geni è stata calcolata una densità di mutazione di 1 SNP ogni 50,5 Kb analizzate. Questo valore è risultato migliore rispetto alla frequenza di mutazione (1 SNP su 68 Kb) identificata da Uauy et al. (2009) per gli stessi geni *SBEIIa* in un'altra popolazione TILLING di frumento duro. La popolazione mutagenizzata di Uauy et al. (2009) è stata ottenuta attraverso un trattamento mutageno più intenso (0,75% di EMS per 18 h) rispetto a quello utilizzato per generare la popolazione utilizzata nel presente lavoro (0,7% di EMS per 16 h; Bovina et al. 2014). Lo screening delle mutazioni per i geni d'interesse nella popolazione di Uauy et al. (2009) è stata analizzata utilizzando un metodo di rilevazione basato su gel di poliacrilammide non denaturante. Questo risultato suggerisce che l'HRM risulta uno strumento altamente efficace nel rilevamento delle mutazioni puntiformi in popolazioni TILLING, come confermato nel lavoro di Botticella et al. (2011).

L'HRM è un saggio *closed-tube* che viene eseguito direttamente su frammenti PCR e non prevede alcun processamento post PCR degli ampliconi. Tale tecnica offre vantaggi in termini di costi e soprattutto di tempo rispetto agli altri metodi di identificazione di mutazione utilizzati nel TILLING (Hofinger et al. 2009). Sebbene il costo degli strumenti HRM sia paragonabile a quello del 4300 DNA Analyzer (LI-COR) comunemente utilizzato nel TILLING, il metodo HRM offre notevoli vantaggi nel risparmio di materiale di consumo perché non richiede analisi su gel degli ampliconi. L'analisi al LightScanner richiede inoltre al massimo 10 min per generare le curve di *melting* degli ampliconi e l'identificazione dei profili mutanti.

In questo lavoro sono state generate varianti alleliche caratterizzate dalla presenza di SNP deleteri per i due geni omeologhi *SBEIIa*. In particolare, sono state identificate due linee che presentano rispettivamente un codone di stop prematuro nell'allele *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*.

Per l'allele *SBEIIa-A*, sono state identificate diverse mutazioni predette non tollerate per la funzionalità dell'enzima. Queste mutazioni risultano utili per caratterizzare a livello funzionale le diverse regioni della proteina. In particolare, la linea SVEMS_1433 ha presentato dei valori di PSMM e SIFT molto significativi che indicavano la non tolleranza del cambiamento amminoacidico indotto dalla mutazione. Nello specifico, tale linea è caratterizzata dalla presenza di uno SNP (da G ad A) a ridosso del sito di *splicing* (ss) del decimo introne, nel dominio N-terminale caratteristico della famiglia degli enzimi glicoside-idrosilasi. In letteratura è riportato che mutazioni di questo tipo potrebbero portare a fenomeni di *splicing* alternativo (Fairbrother et al. 2004). A tal proposito, sia in pianta che negli animali sono state identificate delle regioni regolatrici dello *splicing* degli esoni definite ESE (*Exonic Splicing Enhancers*; Tian e Kole 1995; Coulter et al. 1997; Liu et al. 1998; Schaal e Maniatis 1999; Fairbrother et al. 2002). Gli ESE si trovano maggiormente nelle regioni esoniche nelle vicinanze del 5' e 3' dei ss. Mutazioni in tali regioni portano ad un non corretto processamento dell'RNA e di conseguenza a fenotipi aberranti. L'analisi sul genoma umano condotta da Faber et al. (2010) ha correlato la presenza di malattie a *splicing* alternativi nei geni di interesse, dovuti a SNP nelle vicinanze o adiacenti al sito di *splicing*. Considerando tali meccanismi, la linea SVEMS_1433 potrebbe rappresentare un valido strumento per lo studio funzionale dei meccanismi di *splicing*, ed in particolar modo sulla caratterizzazione degli elementi ESE, negli organismi vegetali.

Con lo scopo di caratterizzare fenotipicamente la mutazione deleteria SVEMS_1433 ed ottenere fenotipi di interesse è stato effettuato un programma di incrocio con la linea mutante *nulli SBEIIa-B*.

MAS basato sull'HRM per la selezione delle mutazioni nei programmi di incrocio

Le strategie di MAS rappresentano uno strumento largamente utilizzato nei programmi di *breeding* moderni. Nel presente lavoro è stato messo a punto un saggio MAS basato sull'HRM per identificare le mutazioni di interesse all'interno di popolazioni segreganti. Il saggio prevede lo studio delle curve di *melting* di piccoli ampliconi (da 50 a 100 bp) attraverso il quale è possibile discriminare per la presenza dello SNP. L'applicazione dell'HRM induce transizioni di tipo G→A e C→T che portano a un abbassamento della temperatura di *melting* degli ampliconi d'interesse. I genotipi omozigoti per la mutazione sono facilmente distinguibili rispetto agli omozigoti wt perché presentano una perdita di fluorescenza più rapida. I genotipi eterozigoti, invece, sono caratterizzati da un tipico doppio picco della curva di *melting* ed anch'essi possono essere facilmente discriminati. L'HRM *genotyping* è un saggio *close-tube* rapido e poco costoso, che richiede solamente l'utilizzo della PCR e l'analisi delle curve di *melting* al LightScanner. Questa tecnica è stata utilizzata con successo per l'analisi delle popolazioni segreganti per le mutazioni *SBEIIa-A*, *SBEIIa-B* e SVEMS_1433.

Analisi dei trascritti nei mutanti singoli *nulli* e doppio *nulli* per il gene *SBEIIa*

L'analisi di espressione condotta nelle linee singolo *nulli* *SBEIIa-A⁻* e *SBEIIa-B⁻* e sulla linea doppio *nulli* *SBEIIaA⁻B⁻* ha mostrato che entrambi gli alleli presentavano un livello di messaggeri ridotto rispetto al wt sia nel mutante doppio *nulli* sia nelle rispettive linee singolo *nulli*. Le mutazioni in entrambe le linee singolo *nulli* causano codoni di stop prematuri nella regione codificante. Le mutazioni nonsense spesso portano a ridotti livelli di RNA dovuti al meccanismo di degradazione dei trascritti aberranti “*nonsense-mediated mRNA decay*” (NMD). NMD costituisce un meccanismo di controllo qualità dell'mRNA che previene la formazione di proteine tronche degradando gli mRNA ed è presente in molti organismi tra cui le piante (Filichkin et al. 2010; Behm-Ansmant et al. 2007). In frumento, ridotti livelli di mRNA sono stati riportati per diversi geni che contenevano codoni di stop prematuri tra cui le subunità gluteniniche HMW, i geni *waxy*, il gene polifenol ossidasi (Zhu et al. 2005; Santo e Nakamura 2005; Sun et al. 2011). Botticella et al. (2011) e Slade et al. (2012) hanno ipotizzato che il meccanismo NMD possa intervenire anche nella degradazione dei messaggeri dei geni *SBEIIa* nelle linee *SBEIIa nulli* dove è presente un codone di stop prematuro.

Analisi del contenuto di amilosio nei mutanti *SBEIIa*

Il contenuto di amilosio di entrambe le linee singolo *nulli* *SBEIIa-A⁻* e *SBEIIa-B⁻* non ha mostrato una differenza significativa rispetto al contenuto di amilosio della linea di controllo *nulli* segregante wt. Questi dati confermano che la perdita di funzione di un singolo omeoallele *SBEIIa* non è sufficiente per aumentare il contenuto di amilosio; tale risultato è in accordo con precedenti lavori (Botticella et al. 2011; Slade et al. 2012; Hazard et al. 2012). Al contrario, le tre linee sorelle doppio *nulli* *SBEIIa-A⁻B⁻* hanno mostrato rispettivamente un contenuto di amilosio del 158, 162 e 178% superiore rispetto a quello della linea *nulli* segregante wt. Valori simili di amilosio sono stati ottenuti in frumento duro in mutanti TILLING doppio *nulli* *SBEIIa* da Slade et al. (2012) mentre le linee di frumento duro *SBEIIa* silenziate attraverso RNAi hanno mostrato un contenuto di amilosio più alto (Sestili et al. 2010b). In frumento tenero, la perdita d'espressione dei tre omeoalleli *SBEIIa*, porta ad un aumento di amilosio di circa 250% (Slade et al. 2012; Botticella et al. unpublished) superiore all'aumento che si ottiene in frumento duro (Slade et al. 2012; Hazard et al. 2012).

Analisi dei granuli di amido nei mutanti *SBEIIa*

Dato che la struttura ed il contenuto dell'amilopectina giocano un ruolo significativo nell'organizzazione e nella morfologia dei granuli di amido, tali caratteristiche sono state analizzate nei mutanti TILLING *SBEIIa* ottenuti nel presente lavoro. L'analisi morfologica dei granuli di amido ha mostrato una marcata differenza tra la linea doppio *nulli* *SBEIIa-A⁻B⁻* e le linee di controllo Svevo e *nulli* segregante wt. I granuli di tipo A sono apparsi più piccoli, deformati ed hanno perso la tipica forma ellissoidale; anche i granuli di tipo B hanno mostrato cambiamenti morfologici rispetto alla loro normale forma sferica, presentando una forma più allungata. Risultati simili sono stati ottenuti in lavori precedenti per linee *SBEIIa* silenziate tramite RNAi (Regina et al. 2006; Sestili et al. 2010b) che per le

linee doppio *nulli* SBEIIa ottenute attraverso il TILLING (Slade et al. 2012). Nessuna differenza rispetto alla linea controllo è stata osservata per le linee singolo *nulli* SBEIIa-A⁻ e SBEIIa-B⁻. Questo risultati sono coerenti con il contenuto di amilosio osservato.

Caratterizzazione del mutante SVEMS_1433

La linea mutante SVEMS_1433 è caratterizzata dalla presenza di una mutazione predetta deleteria per la funzionalità della proteina dal programma bioinformatico PARNESNP. In frumento, come descritto da Fu et al. (2009), diversi mutanti, che presentavano dei valori di PSMM e SIFT deleteri per il gene *WKS1*, hanno mostrato un fenotipo *loss-of-function*. Attualmente, per verificare che la mutazione abbia realmente un effetto deleterio per la funzione dell'enzima SBEIIa-A, è stato effettuato un esperimento di incrocio tra la linea SVEMS_1433 e la linea SBEIIa-B⁻. Le linee doppio *nulli* SVEMS_1433-SBEIIa-B⁻ sono in fase di caratterizzazione ed il fenotipo atteso è simile a quello della linea doppio *nulli* SBEIIa-A⁻B⁻.

La linea mutante SVEMS_1433 ha mostrato un fenotipo simile alle linee doppio *nulli* SBEIIa-A⁻B⁻ con un contenuto di amilosio totale del 55% e una morfologia dei granuli profondamente alterata. Tale risultato è stato imputato ad una possibile mutazione nell'altro omeoallele (*SBEIIa-B*). Il suo sequenziamento ha confermato la presenza di una mutazione in omozigosi nella stessa posizione (G364E) a quella identificata nell'omeoallele *SBEIIa-A*.

Isolamento dei geni GW2 in frumento duro

L'aumento delle rese è uno dei principali obiettivi nei programmi di miglioramento genetico dei cereali. Un indice della produttività in frumento è la resa in granella, un carattere quantitativo, sotto controllo multigenico, caratterizzato da una bassa ereditabilità e modulato dall'interazione genotipo-ambiente. In riso, la perdita di funzione del gene *GW2* è associata all'aumento delle dimensioni della cariosside (Song et al. 2007). L'ortologo di *GW2* in frumento è stato recentemente identificato (Su et al. 2010), ma la sua funzione non è stata ancora ampiamente caratterizzata. Nel presente lavoro, la stessa piattaforma TILLING di frumento duro, utilizzata per il gene *SBEIIa*, è stata impiegata per selezionare nuova variabilità genetica nei due omeoalleli *GW2* con lo scopo di caratterizzare la funzione degli omeologhi *GW2* e selezionare linee con una dimensione della cariosside superiore.

Come descritto nel paragrafo precedente, l'utilizzo del TILLING in specie poliploidi richiede la conoscenza delle sequenze nucleotidiche degli omeoalleli codificanti per la proteina di interesse, in quanto è necessario ottenere ampliconi allele-specifici del gene *target* (Slade et al. 2005). In frumento tenero, Su et al. (2010) hanno riportato l'esistenza di tre geni codificanti per la proteina *GW2* posizionati sul braccio corto dei cromosomi 6A, 6B e 6D. Al fine di identificare regioni caratterizzate da un sufficiente grado di polimorfismo inter-genomico, attraverso una strategia basata sulla PCR, sono state isolate le sequenze nucleotidiche parziali dei due omeoalleli *GW2* localizzati sui genomi A e B di frumento duro. Ciascun gene è stato isolato attraverso la produzione di due ampliconi sovrapponibili e dalla cui unione si è ottenuta una regione che si estende dal 5'UTR fino al sesto esone. La struttura dei

due geni è stata determinata attraverso il confronto delle sequenze dei due alleli *GW2-A* e *GW2-B* con le sequenze di cDNA del gene *TaGW2* isolato dalla cultivar *Recital* disponibili in banca dati (*TaGW2-A*, GenBank acc. JN896622; *TaGW2-B*, GenBank acc. JN896623). L'allineamento tra le sequenze dei due geni *GW2* ha portato all'identificazione di numerose regioni polimorfiche, utili per il disegno di primer genoma specifici.

Ipotesi sulla funzione del gene *GW2* e caratterizzazione della regione del promotore

Di recente, alcuni lavori hanno riportato l'associazione genetica tra il gene *TaGW2-A* e le rese in frumento (Su et al. 2010; Yang et al. 2012; Zhang et al. 2013, Lin et al. 2014). Questi lavori suggeriscono che il gene *TaGW2-A* è un regolatore negativo della grandezza della cariosside, come il suo ortologo in riso. Attraverso il confronto delle sequenze codificanti i tre geni omeologhi *GW2* in frumento tenero, Su et al. (2010) non hanno identificato polimorfismi tra varietà a seme grande e piccolo. Tuttavia, gli autori hanno identificato due aplotipi nella regione del promotore: l'aplotipo Hap6A-A, associato a cariossidi grandi, e l'Hap6A-G, associato a cariossidi piccole. In un lavoro successivo sono stati identificati anche quattro aplotipi nella regione promotrice del genoma B (Qin et al. 2014). La combinazione dell'aplotipo superiore Hap6A-A con l'aplotipo superiore identificato nel genoma B, conferisce un maggiore TKW nelle cultivar moderne (Qin et al. 2014). Contrariamente ai risultati di questi lavori, Zhang et al. (2013) hanno identificato l'Hap6A-G come allele superiore per le dimensioni delle cariossidi. Queste differenze possono essere dovute alla difficoltà di analisi dei caratteri quantitativi. Le dimensioni della cariosside sono un carattere controllato da più fattori (Borner et al. 2002; Groos et al. 2003; Huang et al. 2006; Kumar et al. 2006; Li et al. 2007; Roder et al. 2008) e la presenza di un allele superiore potrebbe essere mascherata dalla presenza di altri geni che hanno un effetto negativo sulle rese.

Yang et al. (2012) hanno identificato invece un'inserzione di un nucleotide nell'ottavo esone del gene *TaGW2-A* nella varietà a seme grande Lankaodali. Questa inserzione porta ad una proteina tronca simile all'allele WY3 del gene *GW2* in riso (Song et al. 2007). Contrariamente a quanto riportato da Yang et al. (2012), il sequenziamento del gene *GW2-A* isolato dalla varietà Lankaodali non ha mostrato la presenza di un'inserzione di una base nell'ottavo esone. Tuttavia l'analisi della regione del promotore ha portato all'identificazione di una delezione nella regione corrispondente alla TATA box e al sito d'inizio della trascrizione. Questo polimorfismo potrebbe influire sui livelli di espressione del gene *GW2-A* e di conseguenza portare ad un aumento delle dimensioni della cariosside. Similmente, Ma et al. (2013) hanno caratterizzato delle accessioni di orzo con fenotipo *waxy* che presentano una delezione di 397-bp (contenente la TATA box e il sito di inizio della trascrizione) nella regione promotrice del gene *GBSSI*. Gli autori, attraverso dei saggi di espressione transiente, hanno mostrato che l'attività del gene *GUS* guidata dal promotore delle accessioni wt era significativamente più forte di quella guidata dal promotore deletato.

Infine, Bednarek et al. (2012), silenziando i tre geni omeologhi *TaGW2* in frumento tenero, hanno ottenuto inaspettatamente un fenotipo con cariossidi di dimensioni più piccole. In un lavoro recente, Qin et al. (2014) hanno dimostrato che i livelli d'espressione dei tre omeoalleli *TaGW2* sono correlate

negativamente con il TKW. I risultati contrastanti presenti in letteratura per questo gene, rendono necessarie ulteriori analisi per caratterizzarne la funzione in frumento.

Caratterizzazione della proteina GW2

Molte proteine, caratterizzate dal dominio RING, hanno la funzione di ubiquitina ligasi E3 e sono implicate nella degradazione delle proteine *target* attraverso la via del proteosoma 26S (Lorick et al. 1999; Saijo et al. 2003; Dornan et al. 2004; Disch et al. 2006). Tali proteine sono coinvolte nella regolazione di numerosi processi cellulari, compresa la trascrizione, la trasduzione del segnale, la ricombinazione ed avanzamento/regolazione del ciclo cellulare (Song et al. 2007).

Disch et al. (2006) hanno dimostrato che la proteina RING (C3H2C3) BIG BROTHER, con attività E3 ligasi, agisce come un regolatore negativo delle dimensioni degli organi florali in *A. thaliana* attraverso il *targeting* delle proteine cellulari per la degradazione. In riso, la proteina GW2 è caratterizzata da un nuovo dominio RING (C5HC2), ha attività ubiquitina ligasi E3 ed è stato ipotizzato che sia un regolatore negativo della divisione cellulare attraverso la proteolisi mediata dall'ubiquitina. In frumento, la proteina GW2 è caratterizzata dalla presenza, nella regione N-terminale, del dominio RING (C5HC2) e del motivo NES, quest'ultimo responsabile della localizzazione cellulare (Bednarek et al. 2012). Il confronto tra le sequenze amminoacidiche delle proteina GW2 di frumento e le sequenze dei rispettivi ortologhi delle principali specie appartenenti alla famiglia delle Poaceae, ha messo in evidenza che la regione N terminale è completamente conservata. Al contrario risulta molto meno conservata la regione C-terminale, che contiene putativi siti di legame per la proteina *target* da degradare (Stone et al. 2005). Ad esempio, in *Arabidopsis* la proteina COP1 ha sia un dominio di tipo RING nella parte N-terminale che un dominio WD-40 nella parte C-terminale che può legare diversi bersagli proteici (Osterlund et al. 2000). Il genotipo mutante WY3 di riso possiede una proteina GW2 tronca di 310 amino acidi. Analisi *in vitro* hanno dimostrato che questa proteina possiede ancora attività ligasi E3. Gli autori hanno ipotizzato che l'allele WY3 sia una mutante *loss-of-function* perché codifica per una proteina dove manca il dominio di legame con il substrato *target* per la degradazione al proteosoma 26S (Song et al. 2007). In frumento, attraverso l'analisi CODDLE, sono stati identificati due domini conservati per la proteina GW2-A ed un solo dominio per la proteina GW2-B. Entrambi condividono il dominio RING nella regione N-terminale, mentre solo la proteina GW2-A possiede anche un dominio conservato nella regione C-terminale che potrebbe essere implicato nel riconoscimento della proteina bersaglio. Inoltre, è stato dimostrato che le due proteine possiedono un *pattern* d'espressione diverso durante lo sviluppo della cariosside (Bednarek et al. 2012). Infine, il silenziamento di tutti e tre gli omeoalleli GW2 in frumento tenero, attraverso RNAi, ha portato ad una riduzione delle dimensioni della cariosside (Bednarek et al. 2012). Questi risultati, lasciano ipotizzare che in frumento vi sia una differente funzione tra le proteine omeologhe GW2-A e GW2-B. Mutanti *loss-of-function* dei geni GW2-A e GW2-B risultano di particolare interesse per la caratterizzazione funzionale delle singole proteine.

Identificazione delle regioni *target* del gene *GW2* per l'analisi TILLING ed applicazione dell'HRM per l'identificazione di SNP

Le regioni bersaglio per il TILLING sono state selezionate in base a diversi parametri in grado di fornire una stima della probabilità di identificare “SNP funzionali” nei geni di interesse. Sono considerati “SNP funzionali” le mutazioni in grado di determinare la perdita dell'espressione del gene *target* (mutazioni nonsense e sui siti di *splicing*) e le mutazioni missenso che provocano sostituzioni amminoacidiche predette deleterie per l'attività catalitica dell'enzima. Il programma CODDLE è stato utilizzato per l'identificazione delle posizioni amminoacidiche maggiormente conservate e considerate importanti per l'attività della proteina. Inoltre, l'analisi della sequenza genica ha evidenziato la presenza di una regione (esone V) di particolare interesse per l'elevata probabilità di generare mutazioni deleterie.

Nel presente lavoro di dottorato sono stati sottoposti ad analisi HRM frammenti di DNA omeoallele-specifici di dimensioni comprese tra 43 bp e 242 bp, ottenuti attraverso una strategia di Nested-PCR. I frammenti analizzati corrispondono ciascuno alla regione di un singolo esone. Sebbene il TILLING classico, basato sull'utilizzo dell'enzima *Cell*, consenta di analizzare frammenti di DNA dell'ordine di 1,5 Kb, questo metodo porta all'identificazione di numerose mutazioni localizzate nelle regioni non codificanti del gene *target* (Slade et al. 2005). L'utilizzo dell'HRM è risultato ideale per l'analisi dei geni *GW2*, che presentano esoni di piccole dimensioni separati da regioni introniche. Tale approccio infatti ha consentito di identificare, prevalentemente, SNP localizzati nella regione codificante del gene. Per l'allele *GW2-A* è stata calcolata una densità di mutazioni di 1 SNP ogni 61 Kb; mentre, per l'allele *GW2-B* di 1 SNP ogni 82 Kb. Questi valori sono risultati inferiori alla frequenza di mutazione, attribuita alla stessa popolazione, calcolata sulle analisi effettuate per i geni *SBEIIa* (1 SNP ogni 50,5 Kb; Bovina et al. 2014). Analogamente, nel lavoro di Uauy et al. 2009, la frequenza di mutazione identificata per il gene *SBEIIa-D* è stata di 1 SNP ogni 124 kb; mentre, per il gene *SBEIIa-A* è stata di 1 SNP ogni 49 kb. Queste differenze, in geni con un uguale contenuto G/C, potrebbero essere dovute all'efficienza dei primer utilizzati per le amplificazioni PCR.

Identificazione di nuova variabilità genetica nei geni *GW2* attraverso il TILLING

Nel presente lavoro, sono state generate nuove serie alleliche per ciascuno dei due loci *GW2*. L'analisi delle nuove varianti alleliche ha consentito di individuare diversi polimorfismi localizzati nel dominio conservato RING della proteina *GW2*. In particolare, per la proteina *GW2-A* è stata identificata una mutazione missenso (C82Y) che interessa una delle sette cisteine altamente conservate e coinvolte nel legame con lo ione metallico, necessario per la formazione del motivo a dita di zinco. Mentre, per *GW2-B* è stata identificata una mutazione missenso (P69L) che porta alla sostituzione di una prolina con una leucina sempre nel dominio RING. La disponibilità di genotipi caratterizzati da queste mutazioni rappresenta una risorsa d'interesse per studi funzionali volti a comprendere il ruolo del dominio RING (C5HC2), tipico delle *GW2*, che risulta ancora poco caratterizzato rispetto a quello classico (C3H2C3). Inoltre dato che tali mutazioni cadono in una regione della proteina altamente conservata nei cereali, potrebbero putativamente portare alla perdita di funzione del gene.

Per l'allele *GW2-B* è stata identificata una mutazione al 5' del sito di *splicing* del secondo esone. Mutazioni di questo genere hanno un effetto deleterio sulla funzionalità della proteina perché portano ad un processamento aberrante dell'RNA messaggero e alla conseguente traduzione di una proteina alterata o tronca (Greene et al. 2003). Nel lavoro di Slade et al. (2012) una mutazione al 5' del sito di *splicing* ha portato alla formazione di quattro differenti mRNA: tre aberranti, che portavano ad un codone di stop prematuro, ed uno corretto che poteva potenzialmente produrre la proteina funzionante. Come prospettiva futura, i mutanti identificati saranno caratterizzati sia a livello molecolare che biochimico per confermare la severità delle mutazioni identificate sulle attività delle proteine *GW2-A* e *GW2-B*.

Sviluppo di un marker AS-PCR associato all'aumento della dimensione dei semi

Al fine di aumentare la dimensione del seme in frumenti commerciali italiani, la varietà *Lankaodali* è stata incrociata con la cultivar di frumento duro *Svevo* e la varietà di frumento tenero *Rebelde*. Il disegno di un marcatore AS-PCR ha permesso di discriminare il polimorfismo *In/Del* nella progenie *F₁* dimostrandosi un valido strumento sia per la selezione delle progenie successive sia per introgredire l'allele *GW2-A* di *Lankaodali* in altre varietà commerciali. Poiché il miglioramento di caratteri quantitativi, come la grandezza della cariosside, risulta difficile utilizzando i metodi di selezione tradizionali, il disegno di marcatori molecolari è una strategia essenziale per facilitare la selezione di questi caratteri (Wang et al. 2011). Tra i diversi metodi che sono disponibili per la MAS, la AS-PCR ha il vantaggio di essere semplice, rapida e poco costosa (Hayashi et al. 2004).

6. Conclusioni

L'approccio TILLING è risultato efficiente per la produzione di mutanti *loss-of-function* caratterizzati dalla perdita dell'espressione dei geni *SBEIIa*. In totale, sono state generate 39 nuove varianti alleliche *SBEIIa-A* e sei *SBEIIa-B*. Sono stati identificati due mutanti *knock-out*, uno per l'omeologo *SBEIIa-A* ed uno per *SBEIIa-B*. Inoltre per l'allele *SBEIIa-A* è stata identificata la linea SVEMS_1433, particolarmente interessante perché presenta, in entrambi gli omeoalleli *SBEIIa*, la stessa mutazione deleteria. Questa mutazione è posizionata adiacente al 5' del sito di *splicing* e risulta interessante per studi atti a caratterizzare la regolazione del processamento dell'mRNA in pianta.

L'incrocio dei mutanti *knock-out* nei due alleli *SBEIIa* ha permesso di produrre linee sorelle *SBEIIa* doppio *nulli* in frumento duro. Inoltre, la linea SVEMS_1433 è stata incrociata con la linea *SBEIIa-B* allo scopo di studiare e caratterizzare la severità della mutazione predetta deleteria da *tool* bioinformatici.

Al fine di selezionare le mutazioni d'interesse all'interno di popolazioni segreganti è stato messo a punto un saggio di *genotyping* basato sull'utilizzo dell'HRM, che sarà utile anche in futuri programmi di miglioramento genetico per introdurre gli alleli mutati in altri genotipi di frumento duro.

La linea doppio *nulli* *SBEIIa-A-B* ha presentato una riduzione di espressione di entrambi gli alleli *SBEIIa*, dei granuli di amido deformati ed un contenuto di amilosio superiore del 178% rispetto alla linea controllo *nulli* segregante wt.

La linea SVEMS_1433 ha mostrato un fenotipo identico alla linea doppio *nulli*, con granuli di amido deformati ed un contenuto totale di amilosio del 55%. Questo fenotipo ha confermato che la sostituzione amminoacidica G364E, presente su entrambi gli omeoalleli di tale linea, ha un effetto deleterio sulla funzionalità delle proteine *SBEIIa*.

Nel presente lavoro di tesi, il confronto tra le sequenze amminoacidiche delle proteine GW2 di frumento e le sequenze dei rispettivi ortologhi nei principali cereali ha messo in evidenza che il motivo NES e il dominio RING, tipici di queste proteine, sono altamente conservati.

Dalla cultivar di frumento duro Svevo sono state isolate le sequenze parziali dei geni *GW2-A* e *GW2-B*, non disponibili in banca dati, e necessarie per l'analisi di nuove varianti alleliche attraverso il TILLING. Attraverso l'analisi HRM sono state identificate in totale 29 nuove varianti alleliche, di cui 16 per *GW2-A* e 13 per *GW2-B*. Nell'omeoallele *GW2-B* è stata identificata una mutazione al 5' del sito di *splicing* del secondo introne, che potenzialmente provoca la trascrizione di un mRNA aberrante e di conseguenza la traduzione di una proteina non funzionale. Per l'allele *GW2-A* è stata identificata una variante allelica, dove una mutazione missenso porta al cambiamento di una cisteina altamente conservata, implicata nella formazione del motivo a dita di zinco del dominio RING. La disponibilità di mutanti potenzialmente

loss-of-function per entrambi gli alleli *GW2* potrebbe rivelarsi interessante per lo studio funzionale delle singole proteine e per l'ottenimento di fenotipi d'interesse.

L'analisi della regione promotrice del gene *GW2-A* nella varietà a seme grande Lankaodali ha portato all'identificazione di un polimorfismo di tipo *In/Del* che comprende la regione della TATA box ed il sito di inizio della trascrizione. Tale varietà è stata incrociata con la cultivar di frumento duro Svevo e la varietà di frumento tenero Rebelde. Al fine di discriminare per la presenza o assenza della delezione identificata in Lankaodali è stato sviluppato un marcatore Allelic-Specific-PCR, utile in futuri programmi di *breeding*.

Per concludere, i risultati ottenuti hanno mostrato che la popolazione TILLING della cultivar Svevo, utilizzata nel presente lavoro di dottorato, rappresenta una valida risorsa per generare nuova variabilità genetica da utilizzare sia in programmi futuri di miglioramento genetico del frumento duro che in studi di genomica funzionale.

7. Bibliografia

- Acevedo E, Fereres E. (1993). Resistance to abiotic stress. In: Hayward MD, Bosemark NO, Romagoza I. (Eds.). *Plant Breeding Principles and Prospects*, London, Chapman & Hall, pp. 406-421.
- Akerberg A, Liljeberg H, Bjorck I. (1998). Effects of amylose/amylopectin ratio and baking conditions on resistant starch formation and glycaemic indices. *J Cereal Sci* 28: 71-80.
- Albert TK, Hanzawa H, Legtenberg YIA, De Ruwe MJ, Heuvel FAJVD, Collart MA, Boelens R, Timmers HThM. (2002). Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *EMBO J* 21: 355-364.
- Aldoori W, Giovannucci E, Rockett H, Sampson L, Rimm E, Willett W. (1998). A prospective study of dietary fiber types and symptomatic diverticular disease in men. *J Nutr* 128: 714-719.
- Alsaffar AA. (2011). Effect of food processing on the resistant starch content of cereals and cereal products. *Int J Food Sci Tech* 46: 455-462.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Anderson JW, Baird P, Davis RH, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, et al. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* 67: 188-205.
- Andralojc PJ, Keys AJ, Kossmann J, Parry MAJ. (2002). Elucidating the biosynthesis of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate through reduced expression of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphate phosphatase and radiotracer studies with $^{14}\text{CO}_2$. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4742-4747.
- Andralojc PJ, Keys AJ, Martindale W, Dawson GW, Parry MAJ. (1996). Conversion of D-hamamelose into 2-carboxy-D-arabinitol and 2-carboxy-D-arabinitol 1-phosphate in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *J Biol Chem* 271: 26803-26809.
- Ao Z, Jane JL. (2007). Characterization and modeling of the A-and B-granule starches of wheat, triticale, and barley. *Carbohydr Polym* 67: 46-55.
- Aravind N, Sissons M, Fellows CM, Blazek J, Gilbert EP. (2013). Optimisation of resistant starch II and III levels in durum wheat pasta to reduce in vitro digestibility while maintaining processing and sensory characteristics. *Food Chem* 136: 1100-1109.
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M. (2005). Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309: 741-745.
- Asp NG. (1992). Resistant starch. Proceedings from the second plenary meeting of EURESTA: European FLAIR-Concerted Action No 11 on the physiological implications of the consumption of resistant starch in man. *Eur J Clin Nutr* 46: S1.
- Båga M, Nair R B, Repellin A, Scoles GJ, Chibbar RN. (2000). Isolation of a cDNA encoding a granule-bound 152-kilodalton starch-branching enzyme in wheat. *Plant Physiol* 124: 253-264.
- Båga M, Glaze S, Mallard CS, Chibbar RN. (1999). A starch-branching enzyme gene in wheat produces alternatively spliced transcripts. *Plant Mol Biol* 40: 1019-1030.

- Bailey LB, Clark HE. (1976). Plasma amino acids and nitrogen retention of human subjects who consumed isonitrogenous diets containing rice and wheat or their constituent amino acids with and without additional lysine. *Am J Clin Nutr* 21: 827-835.
- Ball SG, Morell MK. (2003). From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* 54: 207-233.
- Balyan HS, Sreenivasulu N, Riera-Lizarazu O, Azhaguvel P, Kianian F. (2008). Mutagenesis and high-throughput functional genomics in cereal crops: Current status. *Adv in Agron* 98: 357-417.
- Bari RA. (2004). A novel approach for suppression of photorespiration in C3 plants by gene transfer. Ph.D. Dissertation, Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.
- Battisti DS, Naylor RL. (2009). Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science* 323: 240-244.
- Bednarek J1, Boulaflous A, Girousse C, Ravel C, Tassy C, Barret P, Bouzidi MF, Mouzeyar S. (2012). Down-regulation of the TaGW2 gene by RNA interference results in decreased grain size and weight in wheat. *J Exp Bot* 63: 5945-5955.
- Behm-Ansmant I, Kashima I, Rehwinkel J, Sauliere J, Wittkopp N, Izaurralde E. (2007). mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett* 581:2845-2853.
- Berry PM, Sylvester-Bradley R, Berry S. (2007). Ideotype design for lodging-resistant wheat. *Euphytica* 154: 165-179.
- Bertoft E. (1991). Investigation of the fine structure of alpha-dextrines derived from amylopectin and their relationship to the structure of waxy maize. *Carbohydr Res* 212: 229-244.
- Birt DF, Boylston T, Hendrich S, Jane JL, Hollis J, Li L, et al. (2013). Resistant starch: promise for improving human health. *Adv Nutr* 4: 587-601.
- Björck I, Östman E, Kristensen M, MateoAnson N, Price RK, Haenen GR, et al. (2012). Cereal grains for nutrition and health benefits: overview of results from in vitro, animal and human studies in the HEALTHGRAIN project. *Trends Food Sci Tech* 25: 87-100.
- Blanco A, Giorgi B, Perrino R, Simeone R. (1990). Risorse genetiche e miglioramento della qualità del frumento duro. *Agricoltura Ricerca* 114: 41-58.
- Blauth SL, Kim KN, Klucinec J, Shannon JC, Thompson D, Guiltinan M. (2002). Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (sbe1) in *Zea mays* L. *Plant Mol Biol* 48: 287-297.
- Blauth SL, Yao Y, Klucinec JD, Shannon JC, Thompson DB, Guiltinan MJ. (2001). Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn. *Plant Physiol* 125: 1396-1405.
- Blennow A, Jensen SL, Shaik SS, Skryhan K, Carciofi M, Holm PB, Hebelstrup KH, Tanackovic V. (2013). Future cereal starch bioengineering: Cereal ancestors encounter gene technology and designer enzymes. *Cereal Chem* 90: 274-287.
- Blomstedt CK, Gleadow RM, O'Donnell N, Naur P, Jensen K, Laursen T, et al. (2012). A combined biochemical screen and TILLING approach identifies mutations in *Sorghum bicolor* L. Moench resulting in acyanogenic forage production. *Plant Biotechnol J* 10: 54-66.

- Bodinhham CL, Frost GS, Robertson MD. (2010). Acute ingestion of resistant starch reduces food intake in healthy adults. *Br J Nutr* 103: 917-922.
- Borden KLB, Freemont PS. (1996). The RING finger domain: A recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struc Biol* 6: 395-401.
- Börner A, Schumann E, Fürste A, Cöster H, Leithold B, Röder MS, Weber WE. (2002). Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 105: 921-936.
- Borrelli GM, Troccoli A, Di Fonzo N, Fares C. (1999). Durum wheat lipoxygenase activity and other quality parameters that affect pasta colour. *Cereal Chem* 76: 335-340.
- Botticella E, Sestili F, Lafiandra D. (2012). Characterization of SBEIIa homoeologous genes in bread wheat. *Mol Genet Genom* 287: 515-524.
- Botticella E, Sestili F, Hernandez-Lopez A, Phillips A, Lafiandra D. (2011). High resolution melting analysis for the detection of EMS induced mutations in wheat SbeIIa genes. *BMC Plant Biol* 11: 156.
- Bovina R, Brunazzi A, Gasparini G, Sestili F, Palombieri S, Botticella E, Lafiandra D, Mantovani P, Massi A. (2014). Development of a TILLING resource in durum wheat for reverse- and forward-genetic analyses. *Crop Pasture Sci* 65: 112-124.
- Bozzini A. (1988). Origin, distribution, and production of durum wheat in the world. In: Fabriani C and Lintas C. (Eds.). *Durum Wheat: Chemistry and Technology*. Saint Paul, Minnesota, USA.
- Braun HJ, Atlin G, Payne T. (2010). Multi-location testing as a tool to identify plant response to global climate change. In: Reynolds MP. (Ed.). *Climate Change and Crop Production*, CABI Climate Change Series, Surrey, UK, pp. 115-138.
- Bresolin NS, Li Z, Kosar-Hashemi B, Tetlow IJ, Chatterjee M, Rahman S, Morell MK, Howitt CA. (2005). Characterisation of disproportionating enzyme from wheat endosperm. *Planta* 224: 20-31.
- Brown TA, Jones MK, Powell W, Allaby RG. (2009). The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent. *Trends Ecol Evol* 24: 103-109.
- Burton RA, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher GB, Hylton C, et al. (2002). Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J* 31: 97-112.
- Burton RA, Bewley JD, Smith AM, Bhattacharyya MK, Tatge H, Ring S, Bull V, Hamilton WDO, Martin C. (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *Plant J* 7: 3-15.
- Bustos R, Fahy B, Hylton CM, Seale R, Nebane NM, Edwards A, Martin C, Smith AM. (2004). Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2215-2220.
- Butardo VM, Daygon VD, Colgrave ML, Campbell PM, Resurreccion A, Cuevas RP, et al. (2012). Biomolecular analyses of starch and starch granule proteins in the highamylose rice mutant goami 2. *J Agr Food Chem* 60: 11576-11585.
- Calderini DF, Dreccer MF, Slafer GA. (1995). Genetic improvement in wheat yield and associated traits. A re-examination of previous results and the latest trends. *Plant Breed* 114: 108-112.

- Caldwell DG, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer GJ, Marshall DF, Waugh R. (2004). A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J* 40: 143-150.
- Campbell CA, Zentner RP, Basnyat P, DeJong R, Lemke R, Desjardins R, Reiter M. (2008). Nitrogen mineralization under summer fallow and continuous wheat in the semiarid Canadian prairie. *Can J Soil Sci* 88: 681-696.
- Campbell KG, Bergman CJ, Gualberto DG, Anderson JA, Giroux MJ, Hareland G, Fulcher RG, Sorrells ME, Finney PL. (1999). Quantitative trait loci associated with kernel traits in a soft x hard wheat cross. *Crop Sci* 39: 1184-1195.
- Campbell MR, Jane J, Pollak L, Blanco M, O'Brien A. (2007). Registration of maize germplasm line GEMS-0067. *J Plant Registr* 1: 60-61.
- Capron D, Mouzeyar S, Boulaflous A, Girousse C, Rustenholz C, Laugier C, Paux E, Bouzidi MF. (2012). Transcriptional profile analysis of E3 ligase and hormone-related genes expressed during wheat grain development. *BMC Plant Biol* 12: 35-53.
- Carciofi M, Blennow A, Jensen SL, Shaik SS, Henriksen A, Buléon A, Holm PB, Hebelstrup KH. (2012). Concerted suppression of all starch branching enzyme genes in barley produces amylose-only starch granules. *BMC Plant Biol* 12: 223.
- Chanvrier H, Appelqvist IAM, Bird AR, Gilbert E, Htoon A, Li Z, Lillford P J, Lopez-Rubi A, Morell M K, Topping DL. (2007). Processing of Novel Elevated Amylose Wheats: Functional Properties and Starch Digestibility of Extruded Products. *J Agr Food Chem* 55: 10248-10257.
- Chao S, Sharp PJ, Worland AJ, Warham EJ, Koebner RMD, Gale MD. (1989). RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet* 78: 495-504.
- Chapman V, Miller TE, Riley R. (1976). Equivalence of the A genome of bread wheat and that of *Triticum urartu*. *Genet Res* 27: 69-76.
- Chawade A, Sikora P, Brautigam M, Larsson M, Vivekanand V, Nakash MA, Chen T, Olsson O. (2010). Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and beta-glucan biosynthesis genes. *BMC Plant Biol* 10: 86.
- Chen L, Hao L, Parry MA, Phillips AL, Hu YG. (2014). Progress in TILLING as a tool for functional genomics and improvement of crops. *J Integr Plant Biol*. doi: 10.1111/jipb.12192.
- Chen L, Huang LZ, Min DH, Phillips A, Wang SQ, Madgwick PJ, Parry MAJ, Hu YG. (2012). Development and Characterization of a New TILLING Population of Common Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS ONE* 7: e41570.
- Chen L, Wang SQ, Hu YG. (2011). Detection of SNPs in the VRN-A1 gene of common wheat (*Triticum aestivum* L.) by a modified Ecotilling method using agarose gel electrophoresis. *Aust J Crop Sci* 5: 321-329.
- Chiotelli E, Le Meste M. (2002). Effect of small and large wheat starch granules on thermomechanical behavior of starch. *Cereal Chem* 79: 286-293.
- Chou LS, Lyon E, Wittwer CT. (2005). A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model. *Am J Clin Pathol* 124: 330-338.

- Chrastil J. (1987). Improved colourimetric determination of amylose in starches of flours. *Carbohydr Res* 159: 154-158.
- CIE (1986). 'Publication 15.2. Colorimetry.' 2nd edn CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) Central Bureau: Vienna.
- Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S. (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol* 126: 480-484.
- Colleoni C, Dauvillee D, Mouille G, Buleon A, Gallant D, Bouchet B, et al. (1999a). Genetic and biochemical evidence for the involvement of alpha-1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant Physiol* 120: 993-1003.
- Colleoni C, Dauvillee D, Mouille G, Morell M, Samuel M, Slomiany MC, Lienard L, Wattedled F, Dhulst C, Ball S. (1999b). Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol* 120: 1005-1013.
- Comai L, Henikoff S. (2006). TILLING: Practical single-nucleotide mutation discovery. *Plant J* 54: 684-694.
- Comai L, Young K, Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA. (2004). Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J* 37: 778-786.
- Copeland L, Blazek J, Salman H, Tang MC. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocoll* 23: 1527-1534.
- Coulter LR, Landree MA, Cooper TA. (1997). Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol Cell Biol* 17: 2143-2150.
- Craig J, Lloyd JR, Tomlinson K, Barber L, Edwards A, Wang TL, Martin C, Hedley CL, Smith AM. (1998). Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* 10: 413-426.
- Creech RG, McArdle FJ, Kramer HH. (1963). Genetic control of carbohydrate type and quantity in maize kernels. *Maize Genet Coop Newsl* 37: 111-120.
- Creech RG. (1965). Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics* 52: 1175-1186.
- Critchley JH, Zeeman SC, Takaha T, Smith AM, Smith SM. (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J* 26: 89-100.
- Cross MJ, Waters DLE, Lee LS, Henry R. (2008). Endonucleolytic Mutation Analysis by Internal Labeling (EMAIL). *Electrophoresis* 29: 1291-1301.
- D'Ovidio R, Porceddu E. (1996). PCR-based assay for detecting 1B-genes for low molecular weight glutenin subunits related to gluten quality properties in durum wheat. *Plant Breed* 115: 413-415.
- Datta KK, de Jong C. (2002). Adverse effect of waterlogging and soil salinity on crop and land productivity in northwest region of Haryana, India. *Agr Water Manage* 57: 223-238.
- Delatte T, Trevisan M, Parker ML, Zeeman SC. (2005). *Arabidopsis* mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J* 41: 815-30.

- Delgado E, Medrano H, Keys AJ, Parry MAJ. (1995). Species variation in Rubisco specificity factor. *J Exp Bot* 46: 1775-1777.
- Delvalle D, Dumez S, Wattebled F, Roldan I, Planchot V, Berbezy P, et al. (2005). Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J* 43: 398-412.
- Denyer K, Dunlap F, Thorbjornsen T, Keeling P, Smith AM. (1996). The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiol* 112: 779-785.
- Denyer K, Waite D, Motawia S, Moller BL, Smith AM. (1999a). Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochem J* 340: 183-191.
- Denyer K, Waite D, Edwards A, Martin C, Smith AM. (1999b). Interaction with amylopectin influences the ability of granule-bound starch synthase I to elongate malto-oligosaccharides. *Biochem J* 342: 647-653.
- Dewettinck K, Van Bockstaele F, Kühne B, Van de Walle D, Courtens T M, Gellynck X. (2008). Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *J Cereal Sci* 48: 243-257.
- Dexter JE, Marchylo BA. (2000). Recent trends in durum wheat milling and pasta processing: impact on durum wheat quality requirements. In: Feillet P. (Ed.). 'Proceedings International Workshop on Durum Wheat, Semolina and Pasta Quality: Recent Achievements and New Trends', Montpellier, France, pp. 77-101.
- Dholakia BB, Ammiraju JSS, Singh H, Lagu MD, Röder MS, Rao VS, Dhaliwal HS, Ranjekar PK, Gupta VS, Weber WE. (2003). Molecular marker analysis of kernel size and shape in bread wheat. *Plant Breed* 122: 392-395.
- Disch S, Anastasiou E, Sharma VK, Laux T, Fletcher JC, Lenhard M. (2006). The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls *Arabidopsis* organ size in a dosage-dependent manner. *Curr Biol* 16: 272-279.
- Dixon J, Braun HJ, Kosina P, Crouch J. (2009). Wheat Facts and Futures 2009. CIMMYT, Mexico, D.F.
- Doblin MS, Pettolino FA, Wilson SM, Campbell R, Burton RA, Fincher GB, Newbigin E, Bacic A. (2009). A barley cellulose synthase-like CSLH gene mediates (1,3;1,4)- β -D-glucan synthesis in transgenic *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5996-6001.
- Dong C, Dalton-Morgan J, Vincent K, Sharp P. (2009a). A Modified TILLING Method for Wheat Breeding. *Plant Gen* 2: 39.
- Dong C, Vincent K, Sharp P. (2009b). Simultaneous mutation detection of three homoeologous genes in wheat by High Resolution Melting analysis and Mutation Surveyor. *BMC Plant Biol* 9: 143.
- Donmez E, Sears RG, Shroyer JP, Paulsen GM. (2001). Genetic gain in yield attributes of winter wheat in the Great Plains. *Crop Sci* 41: 1412-1419.
- Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, O'Rourke K, Koeppen H, Dixit VM. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* 429: 86-92.
- Dorofeev VF. (1966). Geographic localization and gene centers of hexaploid wheats in Transcaucasia. *Genetika* 3: 16-33.
- Dubcovsky J, Dvorak J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316: 1862-1866.

- Dubcovsky J, Loukoianov A, Bonafede MD. (2007). Regulation of flowering time in wheat. In: Buck HT, et al. (Eds.). *Wheat Production in Stressed Environments*, Springer Netherlands, pp. 659-665.
- Dvorak J, Di Terlizzi P, Zhang HB, Resta P. (1993). The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21-31.
- Dvorak J, McGuire PE, Cassidy B. (1988). Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* 30: 680-689.
- Dvorak J, Zhang HB. (1990). Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9640-9644.
- Dvorak J. (1976). The relationship between the genome of *Triticum urartu* and the A and B genomes of *Triticum aestivum*. *Can J Genet Cytol* 18: 371-377.
- Easson DL, White EM, Pickles SJ. (1993). The effects of weather, seed rate and cultivar on lodging and yield in winter wheat. *J Agr Sci* 121: 145-156.
- Easterling W. (2007). Chapter 5: food, fibre, and forest products. In: Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, Linden PJVD, Hanson CE. (Eds.). *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, pp. 273-313.
- Edwards A, Vincken JP, Suurs L, Visser, RGF, Zeeman S, Smith A, Martin C. (2002). Discrete forms of amylose are synthesized by isoforms of GBSSI in pea. *Plant Cell* 14: 1767-1785.
- Elias R, Till BJ, Mba C, Al-Safadi B. (2009). Optimizing TILLING and Ecotilling techniques for potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Res Notes* 2: 141.
- Englyst HN, Cummings JH. (1985). Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *Am J Clin Nutr* 42: 778-787.
- Eslick RF, Ullrich SE. (1977). A characterization of three high lysine mutants in relation to their normal isotypes and their environmental response. *Barley Newsl* 20: 583-585.
- Faber K, Glatting KH, Mueller PJ, Risch A, Hotz-Wagenblatt A. (2011). Genome-wide prediction of splice-modifying SNPs in human genes using a new analysis pipeline called AASsites. *BMC Bioinformatics* 12: S2.
- Fairbrother WG, Holste D, Burge CB, Sharp PA. (2004). Single nucleotide polymorphism-based validation of exonic splicing enhancers. *PLoS Biol* 2: E268.
- Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. (2002). Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297: 1007-1013.
- Fan CC, Xing YZ, Mao HL, Lu TT, Han B, Xu CG, Li XH, Zhang QF. (2006). GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet* 112: 1164-1171.
- Feillet P, Autran JC, Icard-Verniere C. (2000). Pasta brownness: an assessment. *J of Cereal Sci* 32: 215-233.
- Feiz L, Martin JM, Giroux MJ. (2009). Creation and functional analysis of new Puroindoline alleles in *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet* 118: 247-257.

- Feldman M. (2001). Origin of cultivated wheat. In: Bonjean AP, Angus WJ. (Eds.). *The World Wheat Book*, Lavoisier Publishing, France, pp. 3-56.
- Ferguson V. (2001). High amylose and waxy corns. In: Hallauer AR. (Ed.). *Speciality Corns*, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 63-84.
- Ficco DBM, Mastrangelo AM, Trono D, Borrelli GM, De Vita P, Fares C, Beleggia R, Platani C, Papa R. (2014). The colours of durum wheat: A review. *Crop and Past Sci* 65: 1-15.
- Filichkin SA, Priest HD, Givan SA, Shen R, Bryant DW, Fox SE, Wong WK, Mockler TC. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* 20: 45-58.
- Fincher GB. (1989). Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 305-346.
- Fischer RA, Rees D, Sayre KD, Lu Z-M, Condon AG, Saavedra AL. (1998). Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate and cooler canopies. *Crop Sci* 38: 1467-1475.
- Fischer RA. (2009). Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *The Journal of Agricultural Science* 105 447.
- Fitzgerald TL, Kazan K, Li Z, Morell MK, Manners JM. (2010). A high-throughput method for the detection of homologous gene deletions in hexaploid wheat. *BMC Plant Biol* 10: 264.
- Flagella Z. (2006). Qualità nutrizionale e tecnologica del frumento. *Italian Journal of Agronomy* 1: 203-239.
- Flexas J, Bota J, Cifre J, Escalona JM, Galmés J, Guléas J, et al. (2004). Understanding downregulation of photosynthesis under water stress: future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. *Ann Appl Biol* 144: 273-283.
- Foulkes MJ, Slafer GA, Davies WJ, Berry PM, Sylvester-Bradley R, Martre P, Calderini DF, Griffiths S, Reynolds MP. (2011). Raising yield potential of wheat III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance. *J Exp Bot* 62: 469-486.
- Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J. (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64: 483-484.
- Fu D, Uauy C, Distelfeld A, Blechl A, Epstein L, Chen X, Sela H, Fahima T, Dubcovsky J. (2009). A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323: 1357-1360.
- Fujita N, Kubo A, Suh DS, Wong KS, Jane JL, Ozawa K, Takaiwa F, Inaba Y, Nakamura Y. (2003). Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm. *Plant Cell Physiol* 44: 607-618.
- Fujita N, Yoshida M, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y. (2006). Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol* 140: 1070-1084.
- Fuller DQ. (2007). Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: Recent archaeobotanical insights from the Old World. *Ann Bot-London* 100: 903-924.
- Gady AL, Hermans FW, Van de Wal MH, van Loo EN, Visser RG, Bachem CW. (2009). Implementation of two high through-put techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant populations. *Plant Methods* 5: 13.

- Gago F, Horváthová V, Ondáš V, Šturdík E. (2014). Assessment of waxy and non-waxy corn and wheat cultivars as starch substrates for ethanol fermentation. *Chem Pap* 68: 300-307.
- Gale MD, Youssefian S. (1985). Dwarfing genes in wheat. In: Russell GE. (Ed.). *Progress in Plant Breeding*, Butterworths, London, UK, pp. 1-35.
- Gallant DJ, Bouchet B, Baldwin PM. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr Polym* 32: 177-191.
- Galmés J, Flexas J, Keys AJ, Cifre J, Mitchell RAC, Madgwick PJ, Haslam RP, Medrano H, Parry MAJ. (2005). Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and with persistent leaves. *Plant Cell Environ* 28: 571-579.
- Galmés J, Ribas-Carbó M, Medrano H, Flexas J. (2011). Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. *J Exp Bot* 62: 653-665.
- Gao M, Fisher DK, Kim K-N, Shannon JC, Guiltinan MJ. (1997). Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb: Isolation and characterization of a Sbe2a cDNA. *Plant Physiology* 114: 69-78.
- Gao M, Wanat J, Stinard PS, James MG, Myers AM. (1998). Characterization of dull1, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell* 10: 399-412.
- Garnier J., Gibrat, J.-F., Robson, B. (1996). [32] GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Method Enzymol* 266: 540-553.
- Gegas VC, Nazari A, Griffiths S, Simmonds J, Fish L, Orford S, Sayers L, Doonan JH, Snape JW. (2010). A genetic framework for grain size and shape variation in wheat. *Plant Cell*, 22 (4), pp. 1046-1056.
- Genschel U, Abel G, Lorz H, Lutticke S. (2002). The sugary-type isoamylase in wheat: tissue distribution and subcellular localization. *Planta* 214: 813-820.
- Gianibelli MC, Sissons MJ, Batey IL. (2005). Effect of source and proportion of waxy starches on pasta cooking quality. *Cereal Chem* 82: 321-327.
- Gilchrist E, Haughn G. (2010). Reverse genetics techniques: engineering loss and gain of gene function in plants. *Brief Funct Genomics* 9: 103-110.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327:812-818.
- Gottwald S, Bauer P, Komatsuda T, Lundqvist U, Stein N. (2009). TILLING in the two-rowed barley cultivar 'Barke' reveals preferred sites of functional diversity in the gene HvHox1. *BMC Res Notes* 2: 258.
- Granfeldt Y, Drews A, Björck I. (1995). Arepas made from high amylose corn flour produce favorable low glucose and insulin responses in healthy humans. *J Nutr* 125: 459-465.
- Graybosch RA. (1998). Waxy wheats: Origin, properties, and prospects. *Trends Food Sci Tech* 9: 135-142.
- Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ. (2003). Spectrum of Chemically Induced Mutations From a Large-Scale Reverse-Genetic Screen in Arabidopsis. *Genetics* 164: 731-740.
- Groos C, Robert N, Bervas E, Charmet G. (2003). Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand kernel weight in bread wheat. *Theor Appl Genet* 106: 1032-1040.

- Gutteridge S, Parry MAJ, Burton S, Keys AJ, Mudd A, Feeney J, Servaites JC, Pierce J. (1986). A nocturnal inhibitor of carboxylation in leaves. *Nature* 324: 274-276.
- Hakata M, Kuroda M, Ohsumi A, Hirose T, Nakamura H, Muramatsu M, Ichikawa H, Yamakawa H. (2012). Overexpression of a rice tify gene increases grain size through enhanced accumulation of carbohydrates in the stem. *Biosci Biotech Bioch* 76: 2129-2134.
- Hallström E, Sestili F, Lafiandra D, Björck I, Östman E. (2011). A novel wheat variety with elevated content of amylose increases resistant starch formation and may beneficially influence glycaemia in healthy subjects. *Food Nutr Res* 55: 70-74.
- Harn C, Knight M, Ramakrishnan A, Guan HP, Keeling PL, Wasserman BP. (1998). Isolation and characterization of the zSSIIa and zSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Mol Biol* 37: 639-649.
- Hasjim J, Lee S-O, Hendrich S, Setiawan S, Ai Y, Jane J. (2010). Characterization of novel resistant-starch and its effects on postprandial plasma-glucose and insulin responses. *Cereal Chem* 87: 257-262.
- Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, Ashikawa I. (2004). Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. *Theor Appl Genet* 108: 1212-1220.
- Hazard B, Zhang X, Colasuonno P, Uauy C, Beckles DM, Dubcovsky J. (2012). Induced mutations in the Starch Branching Enzyme II (SBEII) genes increase amylose and resistant starch content in durum wheat *Crop Sci* 52: 1754-1766.
- Henry RJ. (2004). Genetic improvement of cereals. *Cereal Foods World* 49: 122.
- Hentschel V, Kranl K, Hollmann J, Lindhauer MG, Bhom V, Bitsch R. (2002). Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *J Agr Food Chem* 50: 6663-6668.
- Hermann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. (2007). Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem* 53: 1544-1548.
- Hermann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. (2006). Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* 52: 494-503.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. (1998). *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
- Hessler TG, Thomson MJ, Benscher D, Nachit MM, Sorrells ME. (2002). Association of a lipoxygenase locus, Lpx-B1, with variation in lipoxygenase activity in durum wheat seeds. *Crop Sci* 42: 1695-1700.
- Hibberd JM, Sheehy JE, Langdale JA. (2008). Using C4 photosynthesis to increase the yield of rice-rationale and feasibility. *Curr Opin Plant Biol* 11: 228-231.
- Hirose T, Terao T. (2004). A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice. (*Oryza sativa* L.). *Planta* 220: 9-16.
- Hizukuri S, Maehara Y. (1990). Fine structure of wheat amylopectin: the mode of A to B chainbinding. *Carbohydr Res.* 206: 145-159.
- Hofinger BJ, Jing HC, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K. (2009). High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley. *Theor Appl Genet* 119: 851-865.

- Hogg AC, Gause K, Hofer P, Martin JM, Graybosch RA, Hansen LE, Giroux MJ. (2013). Creation of a high-amylose durum wheat through mutagenesis of starch synthase II (SSIIa). *J Cereal Sci* 57: 377-383.
- Holm M, Hardtke CS, Gaudet R, Deng X-W. (2002). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of Arabidopsis COP1. *EMBO J* 20: 118-127.
- Howarth NC, Saltzman E, Roberts SB. (2001). Dietary fiber and weight regulation. *Nutr Rev* 59: 129-139.
- Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, et al. (2002). Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8133-8138.
- Huang X, Liu Z, Sun H, He S, Luo D, Xia G, Chu C, Li J, Fu X. (2009). Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet* 41: 494-497.
- Huang XQ, Cloutier S, Lycar L, Radovanovic N, Humphreys DG, Noll JS, Somers DJ, Brown PD. (2006). Molecular detection of QTLs for agronomic and quality traits in a doubled haploid population derived from two Canadian wheats (Triticum aestivum L.). *Theor Appl Genet* 113: 753-766.
- Huber KC, BeMiller JN. (2000). Channels of maize and sorghum starch granules *Carbohydr Polym* 41: 269-276.
- Hug-Iten S, Handschin S, Conde-Petit B, Escher F. (1999). Changes in starch microstructure on baking and staling of wheat bread. *Food Sci Tech* 32: 255-260.
- Imparl-Radosevich JM, Nichols DJ, Li P, McKean AL, Keeling PL, Guan HP. (1999). Analysis of purified maize starch synthases IIa and IIb: SS isoforms can be distinguished based on their kinetic properties. *Arch Biochem Biophys* 362: 131-138.
- James MG, Denyer K, Myers AM. (2003). Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 6: 215-222.
- James MG, Robertson DS, Myers AM. (1995). Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* 7: 417-429.
- Jiang H, Jane J-L, Acevedo D, Green A, Shinn G, Schrenker D, Srichuwong S, Campbell M, Wu Y. (2010). Variations in starch physicochemical properties from a generation-means analysis study using Amylomaize V and VII parents. *J Agr Food Chem* 58: 5633-5639.
- Jiang H, Dian W, Liu F, Wu P. (2004). Molecular cloning and expression analysis of three genes. encoding starch synthase II in rice. *Planta* 218: 1062-70.
- Jiao Y, Wang Y, Xue D, Wang J, Yan M, Liu G, Dong G, Zeng D, Lu Z, Zhu X, Qian Q, Li J. (2010). Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nat Genet* 42: 541-544.
- Jobling SA, Schwall GP, Westcott RJ, Sidebottom CM, Debet M, Gidley MJ, Jeffcoat R, Safford R. (1999). A minor form of starch branching enzyme in potato (Solanum tuberosum L) tubers has a major effect on starch structure: cloning and characterisation of multiple forms of SBE A. *Plant. J.* 18: 163-171.
- Johnson PE, Patron NJ, Bottrill AR, Dinges JR, Fahy BF, Parker ML, Waite DN. (2003). A low-starch barley mutant, Riso 16, lacking the cytosolic small subunit of ADP-glucose. pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform and the identity of the plastidial small subunit. *Plant Physiol* 131: 684-696.

- Kaan F, Regnier T, Macheix JJ, Souyris I. (1988). Recent advances for blackpoint resistance in durum wheat. In: Nachit MM, Baum M, Porceddu E, Monneveux P, Picard E. (Eds.). Proc. Of the SEWANA Durum Network Workshop, ICARDA, pp. 324-328.
- Kadaru SB, Yadav AS, Fjellstrom RG, Oard JH. (2006). Alternative ecotilling protocol for rapid, cost-effective single-nucleotide polymorphism discovery and genotyping in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Mol. Biol. Report. 24: 3-22.
- Kang HJ, Hwang IK, Kim KS, Choi HC. (2003). Comparative structure and physicochemical properties of Ipumbyeo, a high quality japonica rice, and its mutant, Suweon 464. J Agr Food Chem 51: 6598-6603.
- Kato K, Miura H, Sawada S. (2000). Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat. Theor Appl Genet 101: 1114-1121.
- Keenan MJ, Martin RJ, Raggio AM, McCutcheon KL, Brown IL, Birkett A, et al. (2012). High amylose resistant starch increases hormones and improves structure and function of the gastrointestinal tract: a microarray study. J Nutrigenet Nutrigenom 5: 26-44.
- Keys AJ, Major I, Parry MAJ. (1995). Is there another player in the game of Rubisco regulation? J Exp Bot 46: 1245-1251.
- Kihara H. (1966). Factors affecting the evolution of common wheat. Indian J Genet 26A: 14-28.
- Kihara H. (1944). Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare* (abstr) (in Japanese). Agric Hortic 19: 889-890.
- Kilian B, Özkan H, Deusch O, Effgen S, Brandolini A, Kohl J, et al. (2007a). Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. Mol Biol Evol 24: 217-227.
- Kilian B, Özkan H, Walther A, Kohl J, Dagan T, Salamini F, et al. (2007b). Molecular diversity at 18 loci in 321 wild and 92 domesticate lines reveal no reduction of nucleotide diversity during *Triticum monococcum* (Einkorn) domestication: implications for the origin of agriculture. Mol Biol Evol 24: 2657-2668.
- Klindworth DL, Klindworth MM, Williams ND. (1997). Telosomic mapping of four genetic markers in durum wheat. J Hered 88: 229-231.
- Kosarev P, Mayer KF, Hardtke CS. (2002). Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome. Genome Biol 3: research0016.1–research0016.12.
- Kossmann J, Lloyd J. (2000). Understanding and influencing starch biochemistry. Crit Rev Biochem Mol Biol 35: 141-196.
- Kubo A, Fujita N, Harada K, Matsuda T, Satoh H, Nakamura Y. (1999). The starch debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. Plant Physiol 121: 399-409.
- Kumar N, Kulwal PL, Gaur A, Tyagi AK, Khurana JP, Khurana P, Balyan HS, Gupta PK. (2006). QTL analysis for grain weight in common wheat. Euphytica 151: 135-144.
- Lababidi S, Mejlhede N, Rasmussen SK, Backes G, Al-Said W, Baum M, Jahoor A. (2009). Identification of barley mutants in the cultivar ‘Lux’ at the Dhn loci through TILLING. Plant Breeding 128: 332-336.
- Lafiandra D, Riccardi G, Shewry PR. (2014). Improving cereal grain carbohydrates for diet and health. J Cereal Sci 59: 312-326.

- Lafiandra D, Sestili F, D'Ovidio R, Janni M, Botticella E, Ferrazzano G, Silvestri M, Ranieri R, DeAmbrogio E. (2010). Approaches for modification of starch composition in durum wheat. *Cereal Chem* 87: 28-34.
- Leegood RC. (2002). C4 photosynthesis: principles of CO₂ concentration and prospects for its introduction into C3 plants. *J Exp Bot* 53: 581-590.
- Lefebvre S, Lawson T, Fryer M, Zakhleniuk OV, Lloyd JC, Raines CA. (2005). Increased Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. *Plant Physiol* 138: 451-460.
- Leterier M, Holappa LD, Broglie K E, Beckles DM. (2008). Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: Functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biol* 8: 98.
- Li Q, Li L, Yang X, Warburton M, Bai G, Dai J, Li J, Yan J. (2010). Relationship, evolutionary fate and function of two maize co-orthologs of rice GW2 associated with kernel size and weight. *BMC Plant Biol* 10: 143-158.
- Li SS, Ji JZ, Wei XY, Zhang XC, Li LZ, Chen HM, Fan YD, Sun HY, Zhao XH, Lei TD, Xu YF, Jiang FS, Wang HG, Li LH. (2007). A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat. *Mol Breed* 20: 167-178.
- Li ZY, Li D, Du X, Wang H, Larroque O, Jenkins CLD, Jobling SA, Morell MK. (2011). The barley amo1 locus is tightly linked to the starch synthase IIIa gene and negatively regulates expression of granule-bound starch synthetic genes. *J Exp Bot* 62: 5217-5231.
- Li ZY, Mouille G, Kosar-Hashemi B, Rahman S, Clarke B, Gale KR, Appels R, Morell MK. (2000). The structure and expression of the wheat starch synthase III gene. Motifs in the expressed gene define the lineage of the starch synthase III gene family. *Plant Physiol* 123: 613-624.
- Li ZY, Chu XS, Mouille G, Yan LL, Kosar-Hashemi B, Hey S, et al. (1999). The localization and expression of the class II starch synthases of wheat. *Plant Physiol* 120: 1147-1155.
- Lin Q, Huang B, Zhang M, Zhang X, Rivenbark J, Lappe RL, et al. (2012). Functional Interactions between Starch Synthase III and Isoamylase-Type Starch-Debranching Enzyme in Maize Endosperm. *Plant Physiol* 158: 679-692.
- Ling H-Q, Wang J, Zhao S, Liu D, Wang J, Sun H, et al. (2013). Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature* 496: 87-90.
- Liu HX, Zhang M, Krainer AR. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* 12: 1998-2012.
- Liu Q, Gu Z, Donner E, Tetlow I, Emes M. (2007). Investigation of digestibility in vitro and physicochemical properties of A-and B-type starch from soft and hard wheat flour. *Cereal Chem* 84: 15-21.
- Lobell DB, Burke MB, Tebaldi C, Mastrandrea MD, Falcon WP, Naylor RL. (2008). Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science* 319, 607-610.
- Long P, Zhu XG, Naidu SL, Ort DR. (2006). Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant Cell*
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11364-11369.
- Ma J, Jiang QT, Zhao QZ, Zhao S, Lan XJ, Dai SF, Lu ZX, Liu C, Wei YM, Zheng YL. (2013). Characterization and expression analysis of waxy alleles in barley accessions. *Genetica* 141: 227-238.

- Maliga P. (2004). Plastid transformation in higher plants. *Ann Rev Plant Biol* 55: 289-313.
- Mao H, Sun S, Yao J, Wang C, Yu S, Xu C, Li X, Zhang Q. (2010). Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 19579-19584.
- Matsuo RR, Dexter JE, Boudreau A, Daun JK. (1986). The role of lipids in determining spaghetti cooking quality. *Cereal Chem* 63: 484-489.
- Matsuoka Y. (2011). Evolution of Polyploid Triticum Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant Cell Physiol* 52: 750-764.
- Mazzucotelli E, Belloni S, Marone D, De Leonardis A, Guerra D, Di Fonzo N, Cattivelli L, Mastrangelo AM. (2006). The E3 ubiquitin ligase gene family in plants: Regulation by degradation. *Curr Genomics* 7: 509-522.
- Mba C. (2013). Induced Mutations Unleash the Potentials of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. *Agronomy* 3: 200-231.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. (2000a). Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol* 18: 455-457.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. (2000b). Targeting induced local lesions in genomes. (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* 123: 439-442.
- McCartney CA, Somers DJ, Humphreys DG, Lukow O, Ames N, Noll J, Cloutier S, McCallum BD. (2005). Mapping quantitative trait loci controlling agronomic traits in the spring wheat cross RL4452 x 'AC Domain. *Genome* 48: 870-883.
- McFadden ES, Sears ER. (1944). The artificial synthesis of Triticum spelta. *Rec Genet Soc Am* 13: 26-27.
- McMaugh SJ, Thistleton JL, Anschaw E, Luo J, Konik-Rose C, Wang H, et al. (2014). Suppression of starch synthase I expression affects the granule morphology and granule size and fine structure of starch in wheat endosperm. *J Exp Bot* 65: 2189-2201.
- Medrano H, Parry MAJ, Socias X, Lawlor DW. (1997). Long-term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Ann Appl Biol* 131: 491-501.
- Merritt NR. (1967). A new strain of barley with starch of high amylase content. *J Inst Brew* 73: 583-585.
- Mikkelsen R, Baunsgaard L, Blennow A. (2004). Functional characterization of alpha-glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem J* 377: 525-32.
- Miller HE, Rigelhof F, Marquart L. (2000). Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J Am Coll Nutr* 19: 312S-319S.
- Mir RR, Kumar N, Jaiswal V, Girdharwal N, Prasad M, Balyan HS, Gupta PK. (2012). Genetic dissection of grain weight in bread wheat through quantitative trait locus interval and association mapping. *Mol Breed* 29: 963-972.
- Miralles DJ, Slafer GA. (1999). Wheat development. In: Satorre EH, Slafer GA. (Eds.). *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination*. Food Products Press, Binghamton, New York.
- Miura H, Tanii S, Nakamura T, Watanabe N. (1994). Genetic control of amylose content in wheat endosperm starch and differential effects of three Wx genes. *Theor Appl Genet* 89: 276-280.

- Miura H, Tanii S, Nakamura T, Watanabe N. (1994). Genetic control of amylose content in wheat endosperm starch and differential effects of three Wx genes. *Theor Appl Genet* 89: 276-280.
- Miura K, Ashikari M, Matsuoka M. (2011). The role of QTLs in the breeding of high-yielding rice. *Trends Plant Sci* 16: 319-326.
- Miura K, Ikeda M, Matsubara A, Song XJ, Ito M, Asano K, Matsuoka M, Kitano H, Ashikari M. (2010). OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nat Genet* 42: 545-549.
- Mizuno K, Kawasaki T, Shimada H, Satoh H, Kobayashi E, Okumura S, Arai Y, Baba T. (1993). Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice. *J Biol Chem* 268: 19084-19091.
- Mohammadkhani A, Stoddard FL, Marshall DR. (1998). Survey of amylose content in *Secale cereale*, *Triticum monococcum*, *T. turgidum* and *T. tauschii*. *J Cereal Sci* 28: 273-280.
- Monneveux P, Zaharieva M, Rekika D. (2000). The utilisation of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat. In: Royo C, Nachit MM, Di Fonzo N, Araus JL. (Eds.). *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges*. CIHEAM, Centre UdL-IRTA, ICARDA, CIMMYT, Zaragoza. Options Méditerranéennes, Series A, 40: 71-83.
- Morell MK, Kosar-Hashemi B, Cmiel M, Samuel MS, Chandler P, Rahman S, Buleon A, Batey IL, Li ZY. (2003a). Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant J* 34: 172-184.
- Morell MK, Mukai Y, Rahman S. (2003b). The starch branching enzyme I locus from *Aegilops tauschii*, the donor of the D genome to wheat. *Funct Integr Genom* 3: 69-75.
- Morell MK, Blennow A, Kosar-Hashemi B, Samuel MS. (1997). Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. *Plant Physiol* 113: 201-208.
- Morita N, Maeda T, Miyazaki M, Yamamori M, Miura H, Ohtsuka I. (2002). Dough and baking properties of high-amylose and waxy wheat flours. *Cereal Chem* 79: 491-495.
- Mouille G, Maddelein ML, Ball S. (1996). Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell* 8: 1353-1366.
- Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG. (2000). Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* 122: 989-997.
- Nair RB, Baga M, Scoles GJ, Kartha KK, Chibbar RN. (1997). Isolation, characterization and expression analysis of a starch branching enzyme II cDNA from wheat. *Plant Sci* 122: 153-163.
- Nakamura T, Vrinten P, Hayakawa K, Ikeda J. (1998). Characterization of a granule-bound starch synthase isoform found in the pericarp of wheat. *Plant Physiol* 118: 451-459.
- Nemeth C, Freeman J, Jones HD, Sparks C, Pellny TK, Wilkinson MD, et al. (2010). Down-regulation of the CSLF6 gene results in decreased (1,3;1,4)- β -D-glucan in endosperm of wheat. *Plant Physiol* 152: 1209-1218.
- Ng PC, Henikoff S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31: 3812-3814.

- Nieto C, Piron F, Dalmais M, Marco CF, Moriones E, Gomez-Guillamon ML, et al. (2007). EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biol* 7: 34.
- Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H. (2001). Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiol* 127: 459-472.
- Noda K, Ge K. (1989). Structural differentiation of chromosomes between *Triticum dicoccoides* Körn. and *T. araraticum* Jakubz., showing high meiotic pairing homology. *Jpn J Genet* 64: 191-198.
- Nugent AP. (2005). Health properties of resistant starch. *Nutr Bulletin* 30: 27-54.
- Nuss ET, Tanumihardjo SA. (2011). Quality Protein Maize for Africa: Closing the Protein Inadequacy Gap in Vulnerable Populations. *Adv Nutr* 2: 217-224.
- Ogihara Y, Tsunewaki K. (1988). Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. *Theor Appl Genet* 76: 321-332.
- Okabe Y, Ariizumi T, Ezura H. (2013). Updating the Micro-Tom TILLING platform. *Breed Sci* 63: 42-48.
- Okita TW, Nakata PA, Anderson JM, Sowokinos J, Morell M, Preiss J. (1990). The subunit structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol* 93: 785-790.
- Okita TW. (1992). Is there an alternative pathway for starch synthesis? *Plant Physiol* 100: 560-564.
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405: 462-466.
- Panfili G, Fratianni A, Irano M. (2004). Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *J Agr Food Chem* 52: 6373-6377.
- Park SH, Wilson JD, Chung OK, Seib PA. (2004). Size distribution and properties of wheat starch granules in relation to crumb grain score of pup-loaf bread. *Cereal Chem* 81: 699-704.
- Parry MAJ, Madgwick PJ, Bayon C, Tearall K, Lopez AH, Baudom, Rakszegi M, Hamada W, Al-Yassin A, Ouabbou H, Labhilili H, Phillips A. (2009). Mutation discovery for crop improvement. *J Exp Bot* 60: 2817-2825.
- Parry MAJ, Keys AJ, Madgwick PJ, Carmo-Silva AE, Andralojc PJ. (2008). Rubisco regulation: A role for inhibitors. *J Exp Bot* 59: 1569-1580.
- Parry MAJ, Madgwick PJ, Carvalho JFC, Andralojc PJ. (2007). Prospects for increasing photosynthesis by overcoming the limitations of Rubisco. *J Agr Sci* 145: 31-43.
- Parry MAJ, Flexas J, Medrano H. (2005). Prospects for crop production under drought. *Ann Appl Biol* 147: 211-278.
- Parry MAJ, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Madgwick PJ, Keys AJ. (2003). Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J Exp Bot* 54: 1321-1333.
- Parry MAJ, Schmidt CNG, Cornelius MJ, Millard BN, Burton S, Gutteridge S, Dyer TA, Keys AJ. (1987). Variations in properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from various species related to differences in amino acid sequences. *J Exp Bot* 38: 1260-1271.

- Pastori GM, Wilkinson MD, Steele SH, Sparks CA, Jones HD, Parry MAJ. (2001). Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *J Exp Bot* 52: 857-863.
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, et al. (2009). The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551-556.
- Peat S, Whelan WJ, Thomas GJ. (1952). Evidence of multiple branching in waxy maize starch. *J Chem Soc* 4: 4546-4548.
- Peng JH, Ronin Y, Fahima T, Roder MS, Li YC, Nevo E, Korol A (2003) Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2489-2494.
- Peng M, Gao M, Baga M, Hucl P, Chibbar RN. (2000). Starch-branching enzymes preferentially associated with A-type starch granules in wheat endosperm. *Plant Physiol* 124: 265-72.
- Pereira MA, Ludwig DS. (2001). Dietary fiber and body-weight regulation. Observations and mechanisms. *Pediatric Clin N Am* 48: 969-980.
- Pickart CM. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-533.
- Pogna NE, Lafiandra D, Feillet D, Autran JC. (1988). Evidence for direct casual effect of low molecular weight subunits of glutenin of gluten viscoelasticity in durum wheats. *J Cereal Sci* 7: 211-214.
- Poli A, Marangoni F, Paoletti R, Mannarino E, Lupattelli G, Notarbartolo A, et al. (2008). Non-pharmacological control of plasma cholesterol levels. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis* 18: S1-S16.
- Qin L, Hao C, Hou L, Wang Y, Li T, Wang L, Ma Z, Zhang X. (2014). Homoeologous haplotypes, expression, genetic effects and geographic distribution of the wheat yield gene *TaGW2*. *BMC Plant Biol* 14: 107.
- Raghavan C, Naredo MEB, Wang HH, Atienza G, Liu B, Qiu FL, McNally KL, Leung H. (2007). Rapid method for detecting SNPs on agarose gels and its application in candidate gene mapping. *Mol Breed* 19: 87-101.
- Rahman S, Nakamura Y, Li Z, Clarke B, Fujita N, Mukai Y, et al. (2003). The sugary-type isoamylase gene from rice and *Aegilops tauschii*: Characterization and comparison with maize and *Arabidopsis*. *Genome* 46: 496-506.
- Rahman S, Regina A, Li Z, Mukai Y, Yamamoto M, Kosar-Hashemi B, Abrahams S, Morell MK. (2001). Comparison of starch-branching enzyme genes reveals evolutionary relationships among isoforms. Characterization of a gene for starch-branching enzyme IIa from the wheat genome donor *Aegilops tauschii*. *Plant Physiol*. 125: 1314-24.
- Rahman S, Li Z, Batey I, Cochrane MP, Appels R, Morell M. (2000). Genetic alteration of starch functionality in wheat. *J Cereal Sci* 31: 91-110.
- Rahman S, Kosar-Hashemi B, Samuel MS, Mili A, Abbott DC, Skerritt JH, Preiss J, Appels R, Morell M. (1995). The major proteins of wheat endosperm starch granules. *Aust J Plant Physiol* 22: 793-803.
- Ral J-P, Bowerman AF, Li Z, Sirault X, Furbank R, Pritchard JR, Bloemsma M, Cavanagh CR, Howitt CA, Morell MK. (2012). Down-regulation of Glucan, Water-Dikinase activity in wheat endosperm increases vegetative biomass and yield. *Plant Biotech J* 10: 871-882.
- Rawat N, Sehgal SK, Joshi A, Rothe N, Wilson DL, McGraw N, Vadlani PV, Li W, Gill BS. (2012). A diploid wheat TILLING resource for wheat functional genomics. *BMC Plant Biol* 12: 205.

- Reddy I, Seib PA. (2000). Modified waxy wheat starch compared to modified waxy corn starch. *J Cereal Sci* 31: 25-39.
- Reed GH, Wittwer CT. (2004). Sensitivity and specificity of single nucleotide polymorphisms scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 50: 1748-1754.
- Regina A, Bird A, Topping D, Freeman S, Barsby T, Kosar-Hashemi B, Rahman S, Morell M. (2006). High-amylose wheats generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3546-3551.
- Regina A, Kosar-Hashemi B, Li, Pedler A, Mukai Y, Yamamoto M, Gale K, Sharp PJ, Morell MK, Rahman S. (2005). Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-syntenic locus. *Planta* 222: 899-909.
- Regina A, Kosar-Hashemi B, Li Z, Rampling L, Cmiel M, Gianibelli MC, Konik-Rose C, Larroque O, Rahman S, Morell MK. (2004). Multiple Isoforms of Starch Branching Enzyme-I in Wheat: Lack of the Major Sbe-I Isoform Does Not Alter Starch Phenotype. *Funct Plant Biol* 31: 591-601.
- Reynolds M, Foulkes J, Furbank R, Griffiths S, King J, Murchie E, Parry M, Slafer G. (2012). Achieving yield gains in wheat. *Plant Cell Physiol* 35: 1799-1823.
- Reynolds M, Bonnett D, Chapman SC, Furbank RT, Manes Y, Mather DE, Parry M. (2011). Raising yield potential in wheat. I. Overview of a consortium approach and breeding strategies. *J Exp Bot* 62: 439-452.
- Reynolds M, Foulkes MJ, Slafer GA, Berry P, Parry MAJ, Snape JW, Angus WJ. (2009a). Raising yield potential in wheat. *J Exp Bot* 60: 1899-1918.
- Reynolds MP, Manes Y, Izanloo A, Langridge P. (2009b). Phenotyping for physiological breeding and gene discovery in wheat. *Ann Appl Biol* 155: 309-320.
- Reynolds MP, Rajaram S, Sayre KD. (1999). Physiological and genetic changes of irrigated wheat in the post-green revolution period and approaches for meeting projected global demand. *Crop Sci* 39: 1611-1621.
- Riccardi G, Aggett P, Brighenti F, Delzenne N, Frayn K, Nieuwenhuizen A, Pannemans D, Theis S, Tuijelaars S, Vessby B. (2004). PASSCLAIM¹ – Body weight regulation, insulin sensitivity and diabetes risk. *Eur J Nutr* 43: II/7-II/46.
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M. (2002). The starch related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7166-7171.
- Röder MS, Huang X, Börner A. (2008). Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight. *Funct Integr Genomics* 8: 79-86.
- Roldán I, Lucas MM, Delvalle D, Planchot V, Jimenez S, Perez R, Ball S, D'Hulst C, Mérida A. (2007). The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J* 49: 492-504.
- Rosegrant MW, Agcaoili M. (2010). Global Food Demand, Supply, and Price Prospects to 2010. International Food Policy Research Institute, Washington, DC, USA.
- Rozen S, Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 132: 365-86.

- Sadanandom A, Bailey M, Ewan R, Lee J, Nelis S. (2012). The ubiquitin-proteasome system: Central modifier of plant signaling. *New Phytol* 196: 13-28.
- Sahlstrom S, Baevre AB, Brathen E. (2003). Impact of starch properties on hearth bread characteristics II Purified A-and B-granule fractions. *J Cereal Sci* 37: 285-293.
- Saijo Y, Sullivan JA, Wang H, Yang J, Shen Y, Rubio V, Ma L, Hoecker U, Deng XW. (2003). The COP1–SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev* 17: 2642-2647.
- Saito M, Nakamura T. (2005). Two point mutations identified in emmer wheat generate null Wx-A1 alleles. *Theor Appl Genet* 110: 276–282.
- Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. (2006). Resistant Starch: A Review. *Comprehensive Rev In Food Sci Food Safety* 5: 5-17.
- Salamini F, Özkan H, Brandolini A, Schäfer-Pregl R, Martin W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. *Nat Rev Genet* 3: 429-441.
- Salvucci ME, Osteryoung KW, Crafts-Brandner SJ, Vierling E. (2001). Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation in vitro and in vivo. *Plant Physiol* 127: 1053-1064.
- Sano Y. (1984). Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor Applied Genet* 68: 467-473.
- Sarkar P, Stebbins GL. (1956). Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Am J Bot* 43: 297-304.
- Satoh H, Nishi A, Yamashita K, Takemoto Y, Tanaka Y, Hosaka Y, Sakurai A., Fujita N, Nakamura Y. (2003) Starch-Branching Enzyme I-Deficient Mutation Specifically Affects the Structure and Properties of Starch in Rice Endosperm. *Plant Physiol* 133:1111-1121.
- Sayre KD, Rajaram S, Fischer RA. (1997). Yield potential progress in short bread wheats in northwest Mexico. *Crop*
- Sayre KD, Rajaram S, Fischer RA. (1997). Yield potential progress in short bread wheats in northwest Mexico. *Crop Sci* 37: 36-42.
- Schaal TD, Maniatis T. (1999). Selection and characterization of premRNA splicing enhancers: Identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol Cell Biol* 19: 1705-1719.
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, et al. (2009). The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326: 1112-1115.
- Schulte D, Close TJ, Graner A, Langridge P, Matsumoto T, Muehlbauer G, et al. (2009). The International Barley Sequencing Consortium - At the Threshold of Efficient Access to the Barley Genome. *Plant Physiol* 49: 142-147.
- Schupp N, Ziegler P. (2004). The Relation of Starch Phosphorylases to Starch Metabolism in Wheat. *Plant Cell Physiol* 45: 1471-1484.
- Sears ER, Sears LMS. (1978). The telocentric chromosomes of common wheat. In: Ramanujams S. (Ed.). *Proc. 5th Int. Wheat Genetics Symp*, New Delhi, Indian Agricultural Research Institute, pp. 389-407.

- Sestili F, Paoletti F, Botticella E, Masci S, Saletti R, Muccilli V, Lafiandra D. (2013). Comparative proteomic analysis of kernel proteins of two high amylose transgenic durum wheat lines obtained by biolistic and Agrobacterium-mediated transformations. *J Cereal Sci* 58: 15-22.
- Sestili F, Botticella E, Proietti G, Janni M, D'Ovidio R, Lafiandra D. (2012). Amylose content is not affected by overexpression of the Wx-B1 gene in durum wheat. *Plant Breeding* 131: 700-706.
- Sestili F, Botticella E, Bedo Z, Phillips A, Lafiandra D. (2010a). Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis. *Mol Breed* 25: 145-154.
- Sestili F, Janni M, Doherty A, Botticella E, D'Ovidio R, Masci S, Jones HD, Lafiandra D. (2010b). Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the SBEIIa genes. *BMC Plant Biol* 10: 144.
- Shands H, Kimber G. (1973). Reallocation of the genomes of *Triticum timopheevii* Zhuk. In: Sears ER, Sears LMS. (Eds.). *Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium*, Missouri Agricultural Experimental Station, University of Missouri, Columbia, pp. 101-108.
- Sharma A, Yadav BS, Ritika. (2008). Resistant starch: Physiological roles and food applications. *Food Rev Int* 24: 193-234.
- Shearman VJ, Sylvester-Bradley R, Scott RK, Foulkes MJ. (2005). Physiological processes associated with Wheat Yield Progress in the UK. *Crop Sci* 45: 175-185.
- Sheehy J, Mitchell AK, Hardy B. (2007). Reconfiguring the Rice Plant's Photosynthetic Pathway. IRRI, Philippines.
- Shewry PR, Ward JL. (2012). Exploiting genetic variation to improve wheat composition for the prevention of chronic diseases. *Food and Energy Security* 1: 47-60.
- Shewry PR, Charmet G, Branlard G, Lafiandra D, Gergely S, Salgó A, Saulnier L, Bedo Z, Mills ENC, Ward JL. (2012). Developing new types of wheat with enhanced health benefits. *Trends Food Sci Tech* 25: 70-77.
- Shewry PR. (2009). Wheat. *J Exp Bot.* 60: 1537-1553.
- Shewry PR, Jones HD. (2005). Transgenic wheat: Where do we stand after the first 12 years? *Ann Appl Biol* 147: 1-14
- Shewry PR, Halford NG. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot* 53: 947-958.
- Shitsukawa N, Kinjo H, Takumi S, Murai K. (2009). Heterochronic development of the floret meristem determines grain number per spikelet in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Ann Bot-London* 104: 243-251.
- Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M. (2008). Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat Genet* 40: 1023–1028.
- Sikka VK, Choi SB, Kavakli IH, Sakulsingharoj C, Gupta S, Ito H, Okita TW. (2001). Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose.pyrophosphorylase. *Plant Sci* 161: 461-468
- Sikora P, Chawade A, Larsson M, Olsson J, Olsson O. (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *Int J Plant Genomics* doi:10.1155/2011/314829.

- Singh RP, Huerta-Espino J, Rajaram S, Crossa J. (1998). Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7AG and 1BL.1RS in spring wheat. *Crop Sci* 38: 27-33.
- Slade AJ, McGuire C, Loeffler D, Mullenberg J, Skinner W, Fazio G, Holm A, Brandt KM, Steine MN, Goodstal JF, Knauf VC. (2012). Development of high amylose wheat through TILLING. *BMC Plant Biology* 12: 69
- Slade AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, Steine MN, Facciotti D. (2005). A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat Biotechnol* 23: 75-81.
- Slafer GA. (2003). Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann Appl Biol* 142: 117-128.
- Slageren M, (1994). Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae). ICARDA / Wageningen Agricultural University Papers 94(7): i-xiv, 1-512.
- Slavin J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5: 1417-1435.
- Slavin J, Green H. (2007). Dietary fibre and satiety. *Nutr Bull* 32: 32-42.
- Slavin J. (2004). Dietary fiber and the prevention of cancer. In: Remacle C, Reusens B. (Eds.). *Functional foods, ageing and degenerative disease*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp. 628-644.
- Smith AM. (2008). Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *Plant J* 54: 546-558.
- Snape JW, Foulkes MJ, Simmonds J, Leverington M, Fish LJ, Wang Y, Ciavarrella M. (2007). Dissecting gene x environmental effects on wheat yields via QTL and physiological analysis. *Euphytica* 154: 401-408.
- Soh HN, Sisson MJ, Turner M. (2006). Effect of starch granule size distribution and elevated amylose content on durum dough rheology and spaghetti cooking quality. *Cereal Chem* 83: 513-519.
- Song XJ, Huang W, Shi M, Zhu MZ, Lin HX. (2007). A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nature Genet* 39: 623-630.
- Southgate DAT (1991). *Determination of Food Carbohydrates*. Elsevier Applied Science London 109-112.
- Spielmeyer W, Richards RA. (2004). Comparative mapping of wheat chromosome 1AS which contains the tiller inhibition gene (tin) with rice chromosome 5S. *Theor Appl Genet* 109: 1303-1310.
- Stadler LJ. (1929). Chromosome number and the mutation rate in *Avena* and *Triticum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 15: 876-881.
- Stahl Y, Coates S, Bryce JH, Morris PC. (2004). Antisense downregulation of the barley limit dextrinase inhibitor modulates starch granule size distribution, starch composition and amylopectin structure. *Plant J* 39: 599-611.
- Starch-Branching Enzyme I-Deficient Mutation Specifically Affects the Structure and Properties of Starch in Rice Endosperm. *Plant Physiol* 133: 1111-1121.
- Stinard PS, Robertson DS, Schnable PS. (1993). Genetic isolation, cloning, and analysis of a mutator-induced, dominant antimorph of the maize amylose extender1 locus. *Plant Cell* 5: 1555-1566.
- Stoddard FL. (2003). Genetics of starch granule size distribution in tetraploid and hexaploid wheats. *Aust J Agr Res* 54: 637-648.

- Stoddard FL, Sarker R. (2000). Characterization of starch in *Aegilops* species. *Cereal Chem* 77: 445-447.
- Stone B, Morell MK. (2009). Carbohydrates. In: Khan K and Shewry PR. (Eds.). *Wheat: Chemistry and Technology*, fourth ed. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, pp. 299-362.
- Stone SL, Hauksdóttir H, Troy A, Herschleb J, Kraft E, Callis J. (2005). Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137: 13-30.
- Su Z, Hao C, Wang L, Dong Y, Zhang X. (2011). Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 122: 211-223.
- Sugawara T, Miyazawa T. (2001). Beneficial effect of dietary wheat glycolipids on cecum short-chain fatty acid and secondary bile acid profiles in mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 47: 299-305.
- Sun SSM, Liu Q. (2004). Transgenic approaches to improve the nutritional quality of plant proteins. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 155-162.
- Sun XY, Wu K, Zhao Y, Kong FM, Han GZ, Jiang HM, Huang XJ, Li RJ, Wang HG, Li SS. (2009). QTL analysis of kernel shape and weight using recombinant inbred lines in wheat. *Euphytica* 165: 615-624.
- Sun Y, He Z, Ma W, Xia X. (2011). Alternative splicing in the coding region of Ppo-A1 directly influences the polyphenol oxidase activity in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct Integr Genomics* 1: 1-9.
- Surget A, Barron C. (2005). Histologie du grain de blé. *Industries des Céréales* 145: 3-7.
- Suzuki T, Eiguchi M, Kumamaru T, Satoh H, Matsusaka H, Moriguchi K, Nagato Y, Kurata N. (2008). MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol Genet Genomics* 279: 213-223.
- Tadele Z, MBA C, Till BJ. (2009). TILLING for mutations in model plants and crops. In: Mohan Jain S and Brar DS. (Eds.). *Molecular Techniques in Crop Improvement*, Springer Netherlands, pp. 307-332.
- Talame V, Bovina R, Sanguineti MC, Tuberosa R, Lundqvist U, Salvi S. (2008). TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. *Plant Biotechnol J* 6: 477-485.
- Taniguchi Y, Ohkawa H, Masumoto C, Fukuda T, Tamai T, Lee K, et al. (2008). Overproduction of C4 photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C4 like pathway into rice. *J Exp Bot* 59: 1799-1809.
- Taylor NE, Greene EA. (2003). PARSESNP: a tool for the analysis of nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 31: 3808-3811.
- Tester RF. (1997). Starch: the polysaccharide fractions In: Frazier PJ, Donald AM, Richmond P. (Eds.). *Starch: Structure and Functionality*, The Royal Society of Chemistry, London, UK, pp. 163-171.
- Tetlow IJ. (2011). Starch biosynthesis in developing seeds. *Seed Sci Res* 21: 5-32.
- Tetlow IJ, Beisel KG, Cameron S, Makhmoudova A, Liu F, Bresolin NS, Wait R, Morell MK, Emes MJ. (2008). Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol* 146: 1878-1891.
- Tetlow IJ, Wait R, Lu Z, Akkasaeng R, Bowsher C G, Esposito S, Kosar-Hashemi B, Morell MK, Emes MJ. (2004). Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell*. 16: 694-708.

- Thompson DB. (2000). Strategies for the manufacture of resistant starch. *Trends Food Sci Tech* 11: 245-253.
- Thorbjornsen T, Villand P, Denyer K, Olsen O A, Smith A M. (1996). Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Sci* 161: 461-468.
- Tian H, Kole R. (1995). Selection of novel exon recognition elements from a pool of random sequences. *Mol Cell Biol* 15: 6291-6298.
- Till BJ, Cooper J, Tai TH, Colowit P, Greene EA, Henikoff S, Comai L. (2007). Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol* 7: 19.
- Till BJ, Reynolds SH, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E, Codomo CA, Enns LC, Odden AR, Greene EA, Comai L, Henikoff S. (2004). Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol* 4: 12.
- Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Young K, Taylor NE, Henikoff JG, Comai L, Henikoff S. (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res* 13: 524-530.
- Topping DL, Bajka BH, Bird AR, Clarke JM, Cobiack L, Conlon MA, Morell MK, Toden S. (2008). Resistant starches as a vehicle for delivering health benefits to the human large bowel. *Microb Ecol Health Dis* 20: 103-108.
- Topping DL. (2007). Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. *Trends Food Sci Tech* 46: 220-229.
- Topping DL, Clifton PM. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81: 1031-1064.
- Triques K, Piednoir E, Dalmais M, Schmidt J, Le Signor C, Sharkey M, Caboche M, Sturbois B, Bendahmane A. (2008). Mutation detection using ENDO1: application to disease diagnostics in humans and TILLING and Eco-TILLING in plants. *BMC Mol Biol* 9: 42.
- Troccoli A, Borrelli GM, De Vita P, Fares C, Di Fonzo N. (2000). Durum wheat quality: A multidisciplinary concept. *J Cereal Sci* 32: 99-113.
- Trono D, Pastore D, Di Fonzo N. (1999). Carotenoid dependent inhibition of durum wheat lipoxygenase. *J Cereal Sci* 29: 99-102.
- Tsai CY, Nelson OE. (1966). Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science* 151: 341-343.
- Tsunewaki K. (2009). Plasmon analysis in the Triticum-Aegilops complex. *Breed Sci* 59: 455-470.
- Uauy C, Paraiso F, Colasuonno P, Tran RK, Tsai H, Berardi S, Comai L, Dubcovsky J. (2009). A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC Plant Biol* 9: 115.
- Umemoto T, Aoki N. (2005). Single-nucleotide polymorphisms in rice starch synthase IIa that alter starch gelatinisation and starch association of the enzyme. *Funct Plant Biol* 32: 763-768.
- Umemoto T, Aoki N, Lin H, Nakamura Y, Inouchi N, Sato Y, Yano M, Hirabayashi H, Maruyama S. (2004). Natural variation in rice starch synthase IIa affects enzyme and starch properties. *Funct Plant Biol* 31: 671-684.

- Umemoto T, Yano M, Satoh H, Shomura A, Nakamura Y. (2002). Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. *Theor Appl Genet* 104: 1-8.
- Vignaux N, Doeblert DC, Elias EM, McMullen MS, Grant LA, Kianian SF. (2005). Quality of spaghetti made from full and partial waxy durum wheat. *Cereal Chem* 82: 93-100.
- Vineyard ML, Bear RP. (1952). Amylose content. *Maize Genet Coop Newsl* 26: 5.
- von Caemmerer S. (2003). C4 photosynthesis in a single C3 cell is theoretically inefficient but may ameliorate internal CO₂ diffusion limitations of C3 leaves. *Plant Cell Environ* 26: 1191-1197.
- Voskarides K, Deltas C. (2009). Screening for mutations in kidney-related genes using SURVEYOR nuclease for cleavage at heteroduplex mismatches. *J Mol Diagn* 11: 311-318.
- Wang S, Wu K, Yuan Q, Liu X, Liu Z, Lin X, et al. (2012). Control of grain size, shape and quality by OsSPL16 in rice. *Nat Genet* 44: 950-954.
- Wang SW, Yang JH, Zhang MF. (2011). Developments of functional markers for Fom-2-mediated fusarium wilt resistance based on single nucleotide polymorphism in melon (*Cucumis melo* L.). *Mol Breed* 27: 385-393.
- Wang J, Sun J, Liu D, Yang W, Wang D, Tong Y, Zhang A. (2008a). Analysis of Pina and Pinb alleles in the micro-core collections of Chinese wheat germplasm by Ecotilling and identification of a novel Pinb allele. In: Appels R, Eastwood R, Lagudah E, Langridge P, Mackay M, McIntyre L, Sharp P. (Eds.). *The 11th International Wheat Genetics Symposium proceedings*, Sydney University Press, pp. 322-325.
- Wang E, Wang J, Zhu X, Hao W, Wang L, Li Q, et al. (2008b). Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nat Genet* 40: 1370-1374.
- Wang LF, Balfourier F, Exbrayat-Vinson F, Hao CY, Dong YS, Zhang XY. (2007). Comparison of genetic diversity level between European and East-Asian wheat collections using SSR markers. *Sci Agric Sin* 40: 2667-2678.
- Ward JL, Poutanen K, Gebruers K, Pironen V, Lampi AM, Nyström L, et al. (2008). The HEALTHGRAIN cereal diversity screen: concept, results, and prospects. *J Agr Food Chem* 56: 9699-9709.
- Watanabe N, Sugiyama K, Yamagishi Y, Sakata Y. (2002). Comparative telosomic mapping of homoeologous genes for brittle rachis in tetraploid and hexaploid wheats. *Hereditas* 137: 180-185.
- Wattebled F, Dong Y, Dumez S, Delvalle D, Planchot R, et al. (2005). Mutants of *Arabidopsis* Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulate Phytoglycogen and an Abnormal Form of Amylopectin. *Plant Physiol* 138: 184-195.
- Weil CF. (2009). TILLING in grass species. *Plant Physiol* 149: 158-164.
- Weng JF, Gu SH, Wan XY, Gao H, Guo T, Su N, et al. (2008). Isolation and initial characterization of GW5, a major QTL associated with rice grain width and weight. *Cell Res* 18: 1199-1209.
- Witt T, Douth J, Gilbert EP, Gilbert RG. (2012). Relations between molecular, crystalline, and lamellar structures of amylopectin. *Biomacromolecules* 13: 4273-4282.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 49: 853-860.

- Wu JL, Wu C, Lei C, Baraoidan M, Bordeos A, Madamba MR, et al. (2008). MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol Genet Genomics* 279: 213-223.
- Xin Z, Wang ML, Barkley NA, Burow G, Franks C, Pederson G, Burke J. (2008). Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biol* 8: 103.
- Yamamori M. (2009). Amylose content and starch properties generated by five variant Wx alleles for granule-bound starch synthase in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 165: 607-614.
- Yamamori M, Kato M, Yui M, Kawasaki M. (2006). Resistant starch and starch pasting properties of a starch synthase IIa-deficient wheat with apparent high amylose. *Aust J Agric Res*. 57: 531-535
- Yamamori M, Fujita S, Hayakawa K, Matsuki J, Yasui T. (2000). Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose. *Theor Appl Genet* 101: 21-29.
- Yamamori M, Nakamura T, Endo T R, Nagamine T. (1994). Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theor Appl Genet* 89: 179-184.
- Yamamori M, Nakamura T, Kuroda A. (1992). Variations in the content of starch-granule bound protein among several Japanese cultivars of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 64: 215-219.
- Yamamori M, Endo TR. (1996). Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat. *Theor Appl Genet* 93: 275-281.
- Yamanouchi H, Nakamura Y. (1992). Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme. (Q-enzyme). in rice. *Plant Cell Physiol*. 33: 985-991.
- Yan S, Zou G, Li S, Wang H, Liu H, Zhai G, Guo P, Song H, Yan C, Tao Y. (2011). Seed size is determined by the combinations of the genes controlling different seed characteristics in rice. *Theor Appl Genet* 123: 1173-1181.
- Yang CZ, Shu XL, Zhang LL, Wang XY, Zhao HJ, Ma CX, Wu DX. (2006). Starch properties of mutant rice high in resistant starch. *J Agr Food Chem* 54: 523-528.
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Liu L, Zhu Q. (2003). Post anthesis Water Deficits Enhance Grain Filling in Two-Line Hybrid Rice. *Crop Sci* 43: 2099-2108.
- Yang Z, Bai Z, Li X, Wang P, Wu Q, Yang L, Li L, Li X. (2012). SNP identification and allelic-specific PCR markers development for TaGW2, a gene linked to wheat kernel weight. *Theor Appl Genet* 125:1057-1068.
- Yano M, Okuno K, Kawakami J, Satoh H, Omura T. (1985). High amylose mutants of rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet* 69: 253-257.
- Yao Y, Thompson DB, Guiltinan MJ. (2004). Maize starch-branching enzyme isoforms and amylopectin structure In the absence of starch-branching enzyme IIb, the further absence of starch branching enzyme Ia leads to increased branching. *Plant Physiol* 136: 3515-23.
- Yoo SH, Jane JL. (2002a). Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors. *Carbohydr Polym* 49: 307-314.
- Yoo SH, Jane JL. (2002b). Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. *Carbohydr Polym* 49: 297-305.

- Yu S, Liao F, Wang F, Wen W, Li J, Mei H, Luo L. (2012). Identification of rice transcription factors associated with drought tolerance using the ecotilling method. *PLoS ONE* 7: e30765.
- Yue P, Waring S. (1998). Functionality of resistant starch in food applications. *Food Aust* 50: 615-21.
- Yun S, Matheson NK. (1993). Structures of the amylopectins of waxy, normal, amylose-extender, and wx:ae genotypes and of the phytoglycogen of maize. *Carbohydr Res* 243: 307-321.
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. In: Merchant S, Briggs WR, Ort D. (Eds.). *Annu Rev Plant Biol* 61: 209-234.
- Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Auyeung P, Martin C, Smith A M, Chen J. (1998). A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* 10: 1699-1711.
- Zeng J, Gao H, Li G. (2014). Functional properties of wheat starch with different particle size distribution. *J Sci Food Agric* 94: 57-62.
- Zeng M, Morris CF, Batey I L, Wrigley CW. (1997). Sources of Variation for Starch Gelatinization, Pasting, and Gelation Properties in Wheat. *Cereal Chem* 74: 63-71.
- Zhang X, Chen J, Shi C, Chen J, Zheng F, Tian J. (2013). Function of TaGW2-6A and its effect on grain weight in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 192: 347-357.
- Zhang X, Colleoni C, Ratushna V, Sirghie-Colleoni M, James MG, Myers AM. (2004). Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Mol Biol* 54: 865-79.
- Zhang X, Wang J, Huang J, Lan H, Wang C, Yin C, Wu Y, Tang H, Qian Q, Li J, Zhang H. (2012). Rare allele of *OsPPKL1* associated with grain length causes extra-large grain and a significant yield increase in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 21534-21539.
- Zhao XC, Sharp PJ. (1996). An improved 1-D SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat waxy proteins. *J. Cereal Sci.*, 23: 191-193.
- Zhu XG, Long SP, Ort DR. (2010). Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annu Rev Plant Biol* 61: 235-261.
- Zhu XG, Ort DR, Whitmarsh J, Long SP. (2004) The slow reversibility of photosystem II thermal energy dissipation on transfer from high to low light may cause large losses in carbon gain by crop canopies: A theoretical analysis. *J Exp Bot* 55: 1167-1175.
- Zhu Y, Li Y, Chen Y, Li H, Liang H, Yue S, Zhang A, Zhang X, Wang D, Jia X (2005). Generation and characterization of a high molecular weight glutenin 1Bx14 deficient mutant in common wheat. *Plant Breed* 124: 421-427.

Sitografia

ClustalW2: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

CODDLE, PARSESNP: <http://blocks.fhcrc.org/proweb/input/>

FAO-IAEA: Mutant Variety Database 2013:<http://mvgs.iaea.org/AboutMutantVarieties.aspx>

FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/>

G20: <http://www.g20.org/en>

Geneious: <http://www.geneious.com/>

GOR IV: <http://npsa-pbil.ibcp.fr/>

International Wheat Genome Sequencing Consortium: <http://www.wheatgenome.org>

ISMEA: <http://www.ismea.it>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Piattaforma TILLING ABI SOLID: <http://tilling.fhcrc.org/>

Piattaforma TILLING Solexa: (<http://genome.purdue.edu/maizetilling/>

Piattaforma TILLING UC Davis: http://tilling.ucdavis.edu/index.php/Main_Page

Primer 3: <http://frodo.wi.mit.edu>

USDA: <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>

Wheat initiative: <http://www.wheatinitiative.org/>

Ringraziamenti

Con l'esperienza del dottorato si conclude un percorso di studi iniziato otto anni fa all'Università degli Studi della Tuscia. Durante questo periodo, ho avuto la possibilità di incontrare e conoscere persone scientificamente molto valide e di grandi valori umani che hanno reso questa esperienza importante non solo dal punto di vista formativo ma anche dal punto di vista umano ed affettivo.

Vorrei ringraziare principalmente il Prof. Lafiandra che mi ha seguita durante il Dottorato e mi ha sempre, a suo modo, incoraggiato con preziosi consigli scientifici e cercando di farmi capire i miei errori.

Vorrei Ringraziare la Prof.ssa Masci per i suoi consigli, la sua professionalità e soprattutto per la sua grande umanità.

Vorrei ringraziare Francesco e Linda per il loro immenso aiuto, i preziosi consigli, per la loro collaborazione in tutto e soprattutto per la loro amicizia.

Vorrei ringraziare tutti i ragazzi che con me hanno condiviso questa esperienza, tutte le persone che negli anni hanno frequentato il laboratorio perché tutte, a loro modo, mi hanno insegnato moltissimo. In particolare, per la collaborazione e l'affetto che negli anni si è instaurato vorrei ringraziare: Diego Edda, Eleonara, Davide, Lola e Lina.

Vorrei ringraziare i ragazzi del gruppo della Prof.ssa Ceoloni per il loro aiuto con gli esperimenti di incrocio e soprattutto vorrei ringraziare Paola per la forza, il coraggio e l'allegria che sempre riesce a trasmettermi.

Vorrei ringraziare: il progetto AGER per aver cofinanziato il mio progetto di Dottorato, la PSB per la collaborazione nello sviluppo della popolazione TILLING, il Dottore Rowan Mitchell e il Dottore Andy Phillips per avermi ospitato ed accolto presso i laboratori di Rothamsted Research.

Ringrazio la mia mamma, il mio papà e la mia dolce sorellina per l'amore e la forza che ogni giorno mi regalano.

Un ringraziamento speciale va a Fabrizio per l'amore con cui mi ha sempre sostenuta ed aiutata in questi anni.