



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XX CICLO.

AGR-07

Manipolazione genetica della composizione dell'amido

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Masci

Firma

Tutor: Prof. Domenico Lafiandra

Firma.....

Dottorando Francesco Sestili

Firma

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	7
1.1	Il frumento	7
1.1.1	Origine e filogenesi del genere <i>Triticum</i>	9
1.1.2	Composizione della cariosside	11
1.2	L'amido.....	13
1.2.1	Struttura dell'amido.....	14
1.2.2	Proteine, lipidi e fosfati	16
1.2.3	Struttura dei granuli.....	17
1.2.4	Fattori che influenzano la funzionalità dell'amido	18
1.2.5	Struttura dell'amido in relazione alla gelatinizzazione, al rigonfiamento, alla viscosità dell'impasto ed alla retrogradazione	20
1.2.5.1	Rapid Visco Analyser (RVA)	20
1.3	Sintesi dell'amido in frumento.....	22
1.3.1	ADPGlucosio pirofosforilasi.....	23
1.3.2	Ruolo dei trasportatori dell'ADPG negli amiloplasti.....	25
1.3.3	Sintesi dell'amilosio: Granule Bound Starch Synthase (GBSS)	25
1.3.4	Sintesi dell'amilopectina	27
1.3.4.1	Le amido sintasi di classe I (SSI)	28
1.3.4.2	Le amido sintasi di classe II (SSII)	29
1.3.4.3	Le amido sintasi di classe III (SSIII).....	31
1.3.4.4	Le amido sintasi di classe IV.....	31
1.3.4.5	Gli enzimi di ramificazione di classe I (BEI).....	31
1.3.4.6	Gli enzimi di ramificazione di classe II (BEIIa e BEIIb).....	32
1.3.4.7	Gli enzimi di deramificazione	34
1.3.4.8	Il ruolo di altri geni nella sintesi dell'amido	36
1.3.5	Regolazione della biosintesi dell'amido.....	36
1.3.6	Proteine legate ai granuli di amido.....	37
1.4	Applicazioni dell'amido	38
1.4.1	Applicazioni e usi dell'amido nell'industria alimentare	38
1.4.1.1	Effetto della distribuzione delle dimensioni dei granuli e del contenuto di amilosio sulle proprietà reologiche della farina di frumento duro e sulla qualità di cottura della pasta	41
1.4.2	Applicazioni ed usi dell'amido nell'industrie non alimentari	42

1.5 Miglioramento genetico	44
1.5.1 Miglioramento genetico convenzionale.....	44
1.5.1.1 Tilling (Targeting Induced Local Lesion IN Genome).....	45
1.5.2 Biotecnologie non convenzionali (Ingegneria genetica)	46
1.5.2.1 Metodo biolistico.....	47
1.5.2.2 Trasformazione con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
1.5.2.3 RNA <i>interference</i> (RNAi)	51
1.5.3 Stato dell'arte sulle manipolazioni genetiche della composizione dell'amido mediante tecniche convenzionali	52
1.5.4 Stato dell'arte sulle manipolazioni genetiche mediante tecniche di trasformazione genetica.....	54
2 FINALITA' DELLA TESI.....	59
3 MATERIALI E METODI	63
3.1 Materiale Vegetale	63
3.1.1 Linee quasi isogeniche per le proteine waxy in frumento tenero e duro	63
3.1.2 Produzione di linee quasi isogeniche per le SGP-1 in frumento tenero e duro	63
3.1.3 Tecnica di incrocio impiegata per la produzione delle linee quasi isogeniche.....	64
3.2 Estrazione acidi nucleici	64
3.2.1 Estrazione DNA genomico	64
3.2.2 Estrazione e purificazione di DNA plasmidico	65
3.2.3 Estrazione RNA totale dalle cariossidi	66
3.3 Metodi separazione acidi nucleici	67
3.3.1 Elettroforesi su gel di agarosio	67
3.3.2 Elettroforesi su gel di agarosio contenente formaldeide.....	67
3.4 Tecniche di clonaggio	67
3.4.1 Amplificazione PCR.....	67
3.4.2 RT-PCR semiquantitativa.....	68
3.4.3 Estrazione e purificazione dei frammenti di DNA da gel di agarosio	69
3.4.4 Digestione con enzimi di restrizione e ligazione in un vettore di interesse.....	70
3.4.5 Determinazione delle sequenze nucleotidiche.....	70
3.4.6 Preparazione delle cellule competenti per la trasformazione chimica di <i>E. coli</i>	70
3.4.7 Trasformazione delle cellule competenti di <i>E.coli</i>	71
3.4.8 Preparazione delle cellule competenti per la trasformazione mediante elettroporazione di <i>A. tumefaciens</i>	71
3.4.9 Trasformazione mediante elettroporazione delle cellule elettrocompetenti	72

3.5 Southern blotting.....	72
3.5.1 Ibridazioni molecolari	73
3.5.2 Marcatura della sonda	74
3.6 Screening per identificare mutanti indotti mediante la tecnica del TILLING	75
3.6.1 PCR (Primer Mix e Master Mix).....	75
3.6.2 Formazione degli eteroduplex, digestione e purificazione.....	76
3.7 Produzione di piante transgeniche mediante metodo biolistico	77
3.7.1 Terreni di coltura.....	77
3.7.2 Espianti, bombardamento e rigenerazione delle piante.....	79
3.8 Produzione piante transgeniche attraverso trasformazione con l'Agrobatterio	81
3.8.1 Terreni di coltura.....	81
3.8.2 Preparazione del materiale donatore	81
3.8.3 Preparazione dell'agrobatterio	83
3.8.4 Inoculazione e co-coltivazione.....	84
3.8.5 Controllo dell'Agrobatterio, rigenerazione e selezione.....	84
3.9 Controllo e crescita delle piante transgeniche.....	86
3.10 Analisi delle proteine legate ai granuli d'amido.....	87
3.10.1 Isolamento dei granuli d'amido	87
3.10.2 Estrazione delle proteine legate ai granuli d'amido.....	88
3.10.3 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS.....	88
3.11 Analisi RVA (Rapid Visco Analyser).....	89
3.12 Determinazione contenuto d'amilosio	89
3.12.1 Preparazione solventi	90
3.12.2 Pre-trattamento dell'amido.....	90
3.12.3 Precipitazione dell'amilopectina e determinazione del contenuto di amilosio	91
3.12.4 Determinazione dell'amido totale	91
4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	95
4.1 Produzione di linee di frumento a basso contenuto di amilosio.....	95
4.1.1 Determinazione del contenuto di amilosio in linee quasi isogeniche per le proteine waxy di frumento duro e tenero	98
4.1.2 Caratterizzazione del set di linee <i>waxy</i> di frumento duro.....	99
4.1.3 Proprietà degli sfarinati di linee quasi isogeniche <i>waxy</i> in frumento tenero	101
4.1.4 Proprietà degli sfarinati delle linee quasi isogeniche <i>waxy</i> di frumento duro	103
4.2.1a Produzione di linee quasi isogeniche per le proteine Sgp-1 in frumento tenero	106
4.2.1b Produzione di linee quasi isogeniche per le proteine Sgp-1 in frumento duro.....	108

4.2.1.1 Determinazione del contenuto di amilosio in linee nulle per le proteine Sgp-1 di frumento tenero e duro	109
4.2.1.2 Proprietà degli sfarinati delle linee nulli per le proteine Sgp-1 di frumento duro e tenero	111
4.2.2 Identificazione di mutanti indotti <i>Sgp-1</i>	113
4.2.2.1 Identificazione di mutanti indotti e nuove varianti alleliche nei geni <i>Sgp-1</i> mediante screening con la tecnica TILLING	113
4.2.2.2 Identificazione di mutanti nulli per i geni <i>Sgp-1</i> mediante screening con gel SDS-PAGE.....	121
4.2.3 Sovraespressione del gene <i>Wx-B1</i>	122
4.2.3.1 Isolamento e clonaggio del gene <i>Wx-B1</i>	122
4.2.3.2 Produzione delle piante transgeniche	125
4.2.3.3 Selezione delle piante transgeniche.....	125
4.2.3.4 Caratterizzazione delle piante transgeniche ottenute dal genotipo Svevo.....	127
4.2.3.5 Caratterizzazione delle piante transgeniche ottenute dal genotipo Svevo <i>waxy</i>	129
4.2.4 Silenziamento dei geni che codificano per enzimi di ramificazione di classe IIa mediante RNA interference.....	133
4.2.4.1 Trasformazione genetica del frumento duro mediante metodo biolistico	133
4.2.4.1.1 Preparazione del costrutto	133
4.2.4.1.2 Trasformazione genetica	135
4.2.4.1.3 Analisi SDS-PAGE delle piante transgeniche	137
4.2.4.2 Trasformazione mediante <i>A. tumefaciens</i>	138
4.2.4.2.1 Preparazione del costrutto	138
4.2.4.2.2 Produzione delle piante transgeniche.....	139
5 CONCLUSIONI.....	143
6 BIBLIOGRAFIA.....	149

ABSTRACT

Wheat plays an important role in the food industry where is used for the production of a vast array of foods which are a regular part of human diet, as bread, pasta, noodles, biscuits, rolls, breakfast cereals, cookies and cakes.

Starch, which accounts for 65-75% of wheat grain dry weight, is the major constituent of flour and semolina and strongly affects their functionality. Reserve starch is composed of two types of polymers, amylose and amylopectin. Amylose is a linear polymer that constitutes about 30% of total starch, whereas amylopectin has a branched structure and constitutes the remaining starch.

A class of starch synthase (Granule Bound Starch Synthase: GBSSI) is involved in amylose synthesis, while the amylopectin is produced by the concerted action of starch synthases (SSI, SSII, SSIII), branching (BEs IIa, BEs IIb and BEs I) and debranching enzymes (DBEs).

The possibility to manipulate starch composition in cereals, and in wheat in particular, is receiving an increased attention, due to the recognition of its important role in food and non food applications.

Starch can be used as a basic material for the production of non-food products in paper, plastic, adhesive, textile, medical and pharmaceutical industry.

At present the researchers are focusing on high amylose starches because derived foods have an increased amount of resistant starch, which has been shown to have beneficial effects on human health. The nutritionists believe that the resistant starch has a role similar to dietary fibre inside the intestine, protecting against diseases as colon cancer, type II diabetes, obesity and osteoporosis.

Moreover, pasta produced with semolina containing higher amylose content shows good cooking resistance and firmness, satisfying consumer preferences.

Low amylose starches can be used for the production of higher quality noodles and frozen foods, additionally, they have positive impact on food shelf life.

In this work different approaches in order to modify starch composition have been undertaken.

In particular, a set of partial and complete waxy mutants of durum and bread wheat has been characterized by evaluating the effect of the single waxy genes on amylose synthesis, starch structure, composition and flour qualitative characteristics. *Wx-B1* allele has resulted to be the most powerful gene controlling the amylose synthesis; moreover, a compensation mechanism seems to be present in partial waxy durum lines, with the functional waxy gene compensating for the lack of other allele.

In order to obtain high amylose lines of bread and durum wheat, different strategies have been used.

The first approach has been the identification and utilization of natural or induced mutants in the genes encoding the starch synthases SSII (also known as *Sgp-1*). Several mutations in *Sgp-1* genes have been identified by TILLING and SDS-PAGE analysis on a mutagenized population of bread wheat.

The second strategy has consisted in the production of durum wheat lines overexpressing a waxy gene and the silencing of genes encoding branching enzymes of class IIa (BEIIa) using transgenic approaches. The overexpression of Wx-B1 gene doesn't affect amylose content and starch properties. SBEIIa genes have been silenced by RNA interference in two different durum wheat cultivar (Svevo e Ofanto), using the biolistic and agrobacterium approaches.

RIASSUNTO

In campo alimentare il frumento riveste un ruolo fondamentale dato che è alla base della dieta di milioni di persone nel mondo, ed è, infatti, utilizzato per la produzione di prodotti alimentari di uso comune come pasta, pane, noodles, cous cous e biscotti.

L'amido, che costituisce circa il 70% in peso della cariosside di frumento, è il principale componente della farina e della semola e ne influenza le caratteristiche qualitative e funzionali. Tale componente è costituito da due tipi di polimeri in stretta associazione: amilosio ed amilopectina, che hanno la stessa struttura di base ma differiscono nella lunghezza e nel grado di ramificazione. L'amilosio, che corrisponde circa al 30% dell'amido, è essenzialmente lineare mentre l'amilopectina presenta numerose ramificazioni.

Nella sintesi dell'amilosio è coinvolta una sola classe di amido sintasi (GBSSI o waxy), mentre l'amilopectina è sintetizzata dall'azione concertata di diverse classi di amido sintasi, di enzimi di ramificazione (BE) e di enzimi di deramificazione (DBE).

Oltre ad essere un componente essenziale di molti alimenti, l'amido riveste un ruolo importante come additivo o materia prima nell'industria tessile, medico-farmaceutica, della carta, della plastica e degli adesivi.

Attualmente l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sugli amidi ad alto contenuto di amilosio, in quanto i nutrizionisti ritengono che tali amidi svolgano un ruolo analogo alla fibre alimentari con effetti benefici sulla salute umana, prevenendo e curando molte malattie tra cui il tumore al colon, l'obesità, il diabete di tipo II e l'osteoporosi. Inoltre è stato osservato che semole con elevato contenuto di amilosio producono pasta di qualità superiore mostrando un miglior nervo dopo la cottura.

L'amido a basso contenuto in amilosio è utilizzato, soprattutto, per la produzione di prodotti da forno e surgelati, in quanto i prodotti che lo contengono risultano avere maggiore consistenza e conservabilità.

In questo lavoro di Tesi vengono descritti approcci per modificare la composizione dell'amido di frumenti duri e teneri attraverso manipolazioni genetiche delle vie biosintetiche.

In particolare, un set di mutanti parziali e completi di frumento duro e tenero waxy è stato caratterizzato valutando l'effetto dei singoli geni waxy sulla sintesi dell'amilosio, sulla composizione e struttura dell'amido e sulle caratteristiche qualitative degli impasti. Dalle nostre analisi è risultato che il gene *Wx-B1* ha un ruolo predominante nella sintesi di amilosio. Inoltre, nei mutanti parziali waxy di frumento duro sembra esistere un meccanismo di compensazione, con l'assenza di un'isoforma in parte compensata dalla presenza dell'altro enzima.

Allo scopo di ottenere linee di frumento duro e tenero con elevato contenuto di amilosio sono state usate diverse strategie. Un primo approccio è consistito nella identificazione ed utilizzazione di mutanti naturali o indotti nei geni che codificano per le amido sintasi SSII (note anche come Sgp-1).

Attraverso le analisi TILLING ed uno screening con SDS-PAGE è stato possibile identificare numerose mutazioni nei geni *Sgp-I*. Una seconda strategia utilizzata ha previsto la produzione di linee di frumento duro che sovraesprimono il gene *waxy* ed il silenziamento dei geni che codificano per gli enzimi di ramificazione di classe IIa (BEIIa) mediante metodologie di ingegneria genetica.

La sovraespressione del gene *Wx-B1* non ha prodotto variazioni nel contenuto di amilosio e nelle proprietà chimico-fisiche dell'amido. Il silenziamento dei gene *BEIIa* è stato effettuato con la tecnica del RNA *interference*, trasformando due differenti cultivar di frumento duro (Svevo e Ofanto) con metodo biolistico e agrobatterio.

INTRODUZIONE

1 INTRODUZIONE

1.1 Il frumento

Il frumento rappresenta fin dall'antichità, soprattutto nelle zone temperate, la principale fonte di cibo per l'uomo. Non è utilizzato, comunque, solo per l'alimentazione umana (65%) ed animale (21%), ma anche nelle industrie tessili, nella preparazione di sciroppi di glucosio, nella produzione di adesivi e di plastica biodegradabile (Orth e Shellenberger, 1988).

Il frumento è un prodotto largamente coltivato negli Stati Uniti, in Canada, Argentina, Europa, Russia, Nord Africa e Asia (Fig. 1); la FAO nell'anno 2006-2007 ha stimato la produzione mondiale di questo cereale a 616,8 milioni di tonnellate, in calo dell'1,6% rispetto alla coltivazione del 2005-2006 (Tabella 1.1).

Tabella 1.1 Produzione mondiale di frumento (tratto dal sito www.fao.org).

	2004/05	2005/06	2006/07	Cambiamento: 2006/07 rispetto a 2005/06
	<i>milioni di tonnellate</i>			%
BILANCIO MONDIALE				
Produzione	632.1	626.8	616.8	-1.6
Commercio	110.3	109.7	110.0	0.3
Utilizzazione totale	619.5	625.3	627.0	0.3
Alimentazione umana	437.8	441.9	445.8	0.9
Alimentazione animale	111.2	113.7	111.8	-1.6
Altri usi	70.5	69.7	69.4	-0.4
Riserve rimanenti	173.5	170.4	160.0	-6.1

L'Italia produce annualmente più di 8 milioni di tonnellate di frumento su 23267 milioni di tonnellate di cereali complessivi; mentre in Europa i maggiori produttori sono la Francia (10 milioni di tonnellate), la Germania (4,5 milioni), la Spagna (4,2 milioni), l'Inghilterra (2,8 milioni), la Romania

(2,4 milioni) ed il Portogallo (2,1 milioni). I risultati produttivi sono strettamente influenzati dalle pratiche colturali, ma si tratta di una specie molto sensibile anche alle condizioni ambientali. La sua diffusione dipende dall'elevata capacità di adattamento alle diverse condizioni ambientali, dalla facilità di conservazione del prodotto secco, dalla sua elevata digeribilità (70%), dalla possibilità di essere facilmente trasformato in numerosi prodotti, dalla bassa richiesta di manodopera e dalla possibilità di meccanizzazione della coltura stessa.

In molti paesi, il frumento è il componente principale della dieta della popolazione, fornendo circa i due terzi dell'apporto calorico giornaliero; questo grazie alle sue caratteristiche, quali facilità di conservazione e trasporto, un buon profilo nutrizionale ed una grande versatilità (Ranhotra, 1995). Infatti, a differenza del mais e del riso, che di solito vengono consumati senza subire particolari lavorazioni, il frumento viene trasformato in una vastissima gamma di prodotti come pane, pasta, noodles, cous-cous e prodotti da forno con moltissime varianti.

La capacità del frumento di essere trasformato in una così ampia gamma di prodotti dipende in larga parte dalle proteine del glutine che gli conferiscono proprietà viscoelastiche uniche. Tuttavia, studi recenti (Zeng *et al.*, 1997; Yasui *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Merita *et al.*, 2002; Bhattacharya *et al.*, 2002) hanno dimostrato che anche altre componenti, come ad esempio l'amido, influenzano le caratteristiche qualitative ed i possibili usi finali della farina di frumento.

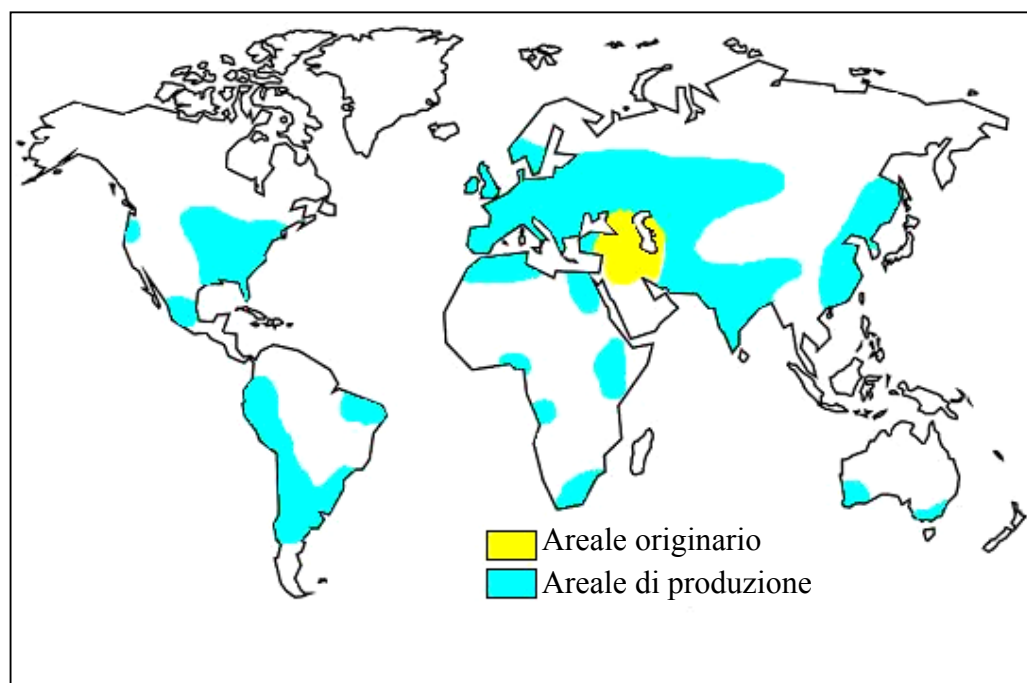


Figura 1.1 Area di origine e diffusione del frumento

1.1.1 Origine e filogenesi del genere *Triticum*

Tassonomicamente il frumento appartiene al genere *Triticum*, sottotribù *Triticinae*, tribù *Triticeae*, famiglia *Graminaceae*.

Il suo centro di origine e differenziazione corrisponde alla zona del Medio Oriente, compresa tra la costa del Mediterraneo e la pianura del Tigri e dell'Eufrate (Fig. 1.1), dove, da studi effettuati su cariossidi, ritrovate durante scavi archeologici, ebbe inizio la coltivazione del frumento (*T. monococcum* e *T. dicoccum*) circa 10000 anni fa.

Il frumento (*Triticum* ssp.), come altri cereali, ha avuto un ruolo basilare nello sviluppo delle prime civiltà indoeuropee; nell'Italia preistorica ne erano coltivati già diversi tipi e dal periodo pre-romano il frumento divenne uno dei più importanti fattori di sviluppo socio-economico.

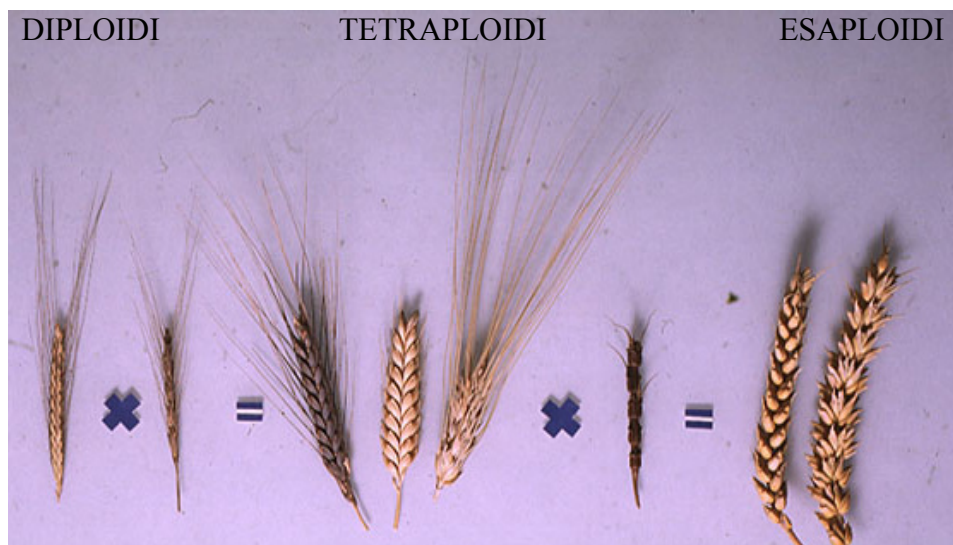
Il frumento coltivato comprende varie specie, a diverso livello di ploidia (diploidi, tetraploidi, esaploidi, con numero cromosomico di base $x=7$), che hanno avuto origine da specie selvatiche. La classificazione dei frumenti è stata, ed è tuttora, oggetto di numerose dispute e di continue revisioni; tali difficoltà derivano principalmente dal vasto numero di specie, sia selvatiche che coltivate e dall'elevata capacità di incrocio interspecifico. Numerosi studi sono stati condotti per identificare i progenitori selvatici delle specie coltivate e per definirne una loro classificazione.

I primi tentativi risalgono all'epoca romana ad opera di Columella, ma è solamente a metà del XVIII secolo che Linneo ha attribuito al genere *Triticum* dapprima cinque e poi sette specie, basandosi essenzialmente su caratteri morfologici. Nel 1913 Schultz, sempre sulla base della morfologia delle piante, ha proposto la suddivisione in tre gruppi. Questa suddivisione è stata ben presto avvalorata dagli studi citogenetici di Sakamura (1918) che ha determinato il corredo cromosomico di alcuni frumenti ed elaborato una classificazione basata sulla ploidia delle singole specie di frumento in relazione al numero cromosomico di base. In seguito, analizzando l'appaiamento cromosomico alla meiosi in ibridi di specie ritenute più o meno affini, il giapponese Kihara (1924) ha identificato diversi tipi di genomi e raggruppato i frumenti in diploidi ($2n=2x=14$) con genoma designato AA, tetraploidi ($2n=4x=28$) con genoma AABB ed esaploidi ($2n=6x=42$) con genoma AABBDD.

Molti studi sono stati dedicati ai frumenti diploidi, considerati i progenitori degli attuali frumenti coltivati, ovvero *T. aestivum* (*T. aestivum* ssp. *aestivum*), esaploide con genoma AABBDD, e *T. durum* (*T. turgidum* ssp. *durum*), tetraploide con genoma AABB.

Nella figura 1.2 è schematizzata l'evoluzione dei frumenti poliploidi. I frumenti diploidi selvatici con genoma AA sono suddivisi nelle specie *T. monococcum* ssp. *boeoticum* e *T. urartu*. Queste due specie sono distinguibili sulla base di differenze morfologiche, citogenetiche, isoenzimatiche e per le proteine di riserva. Il *T. monococcum* ssp. *monococcum* è verosimilmente derivato dal *T. monococcum* ssp. *boeoticum*, in seguito alla domesticazione operata dall'uomo.

A



B

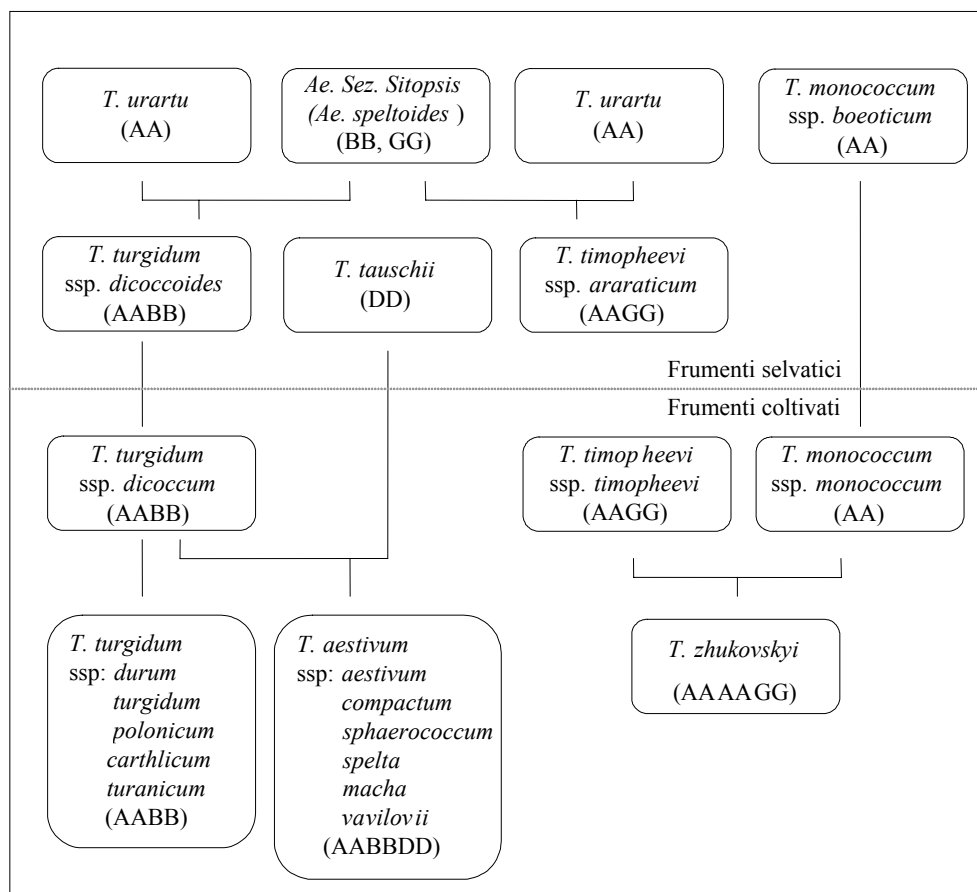


Figura 1.2 A-Schema degli incroci che hanno dato origine ai frumenti poliploidi. B-Evoluzione del genere *Triticum*.

I frumenti tetraploidi vengono divisi in due gruppi:

quelli con genoma AABB, comprendenti diverse sottospecie del *T. turgidum* e quelli con genoma AAGG, comprendenti alcune sottospecie del *T. timopheevi*. Entrambi i gruppi presentano forme selvatiche, rispettivamente *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, da cui si sono evoluti il frumento duro ed il farro, e *T. timopheevi* ssp. *araraticum*. I frumenti esaploidi comprendono due specie: *T. aestivum* (AABBDD) con diverse sottospecie e *T. zhukovskyi* (AAAAGG). Non sono note specie di frumento tenero selvatiche. Per lungo tempo *T. monococcum* ssp. *boeoticum* è stato considerato il donatore del genoma A dei frumenti tetraploidi ed esaploidi coltivati: in seguito, grazie alle analisi con marcatori biochimici e molecolari (Konarev, 1983; Lafiandra *et al.*, 1993; Dvorak *et al.*, 1993), si è potuto meglio delineare la filogenesi dei frumenti coltivati, ed ora si ritiene che il genoma A derivi dalla specie selvatica diploide *T. urartu*. Più complessa è l'origine dei genomi B e G, tuttora oggetto di numerosi studi. Una delle ipotesi più accreditate individua il donatore del genoma B in una delle cinque specie della sezione *Sitopsis*. Relativamente al genoma G, Miller (1987) ha dimostrato la possibilità che tale genoma sia stato donato da *Aegilops speltoides*.

Per quanto riguarda il genoma D dei frumenti esaploidi coltivati, con corredo genetico AABBDD, è ormai accertato che tale genoma sia stato donato dalla specie selvatica *Aegilops squarrosa* (Zohary *et al.*, 1969).

Le specie attualmente coltivate, di rilevante importanza economica, appartenenti al genere *Triticum*, sono *T. aestivum* L. (esaploide $2n = 6x = 42$), *T. turgidum* L. (tetraploide $2n = 4x = 28$), *T. timopheevi* Zhuk. (tetraploide $2n = 4x = 28$) e *T. monococcum* L. (diploide $2n = 2x = 14$). *T. aestivum*, che comprende i frumenti teneri, e *T. turgidum* che comprende i frumenti duri, sono le specie maggiormente coltivate perché usate per la produzione, rispettivamente, di pane e pasta.

1.1.2 Composizione della cariosside

Quello che comunemente viene indicato come seme, in realtà è un frutto secco indeiscente denominato cariosside.

La cariosside matura è costituita da due organi geneticamente differenti, l'endosperma e l'embrione.

La cariosside (Fig. 1.3) presenta un pericarpo sottile ed impermeabile strettamente unito al seme. Internamente si trovano i tegumenti del seme vero e proprio, concresciuti con il pericarpo che costituiscono lo spermoderma. Procedendo verso l'interno del seme si trova l'aleurone composto da un singolo strato di cellule parenchimatiche che costituisce la parte più esterna dell'endosperma con funzione protettiva oltre che trofica dell'embrione. Le sue cellule, spesse e senza spazi intercellulari, sono ricche di proteine enzimatiche confinate nei granuli aleuronici ed a maturità, costituiscono l'unico

tessuto vitale. Internamente allo strato aleuronico si trovano le cellule endospermiche ricche di granuli d'amido (60-70% del peso secco) immersi in una matrice proteica.

Nei cereali il seme è la sede di accumulo dei prodotti della fotosintesi e del metabolismo dell'azoto; esso infatti contiene una limitata quantità di proteine (7-15%) e di grassi (2-9%) ed un elevato contenuto di carboidrati (65-75%) principalmente sotto forma di amido. Una prima classificazione delle proteine dell'endosperma, realizzata da Osborne (1924), le ha divise in quattro gruppi, in base alla loro solubilità: albumine (acqua), globuline (soluzioni saline), prolamine (soluzioni alcoliche) e gluteline (alcali o acidi diluiti).

Il glutine è ciò che rimane dopo aver allontanato, mediante lavaggi con acqua, l'amido da un impasto; è costituito per il 70% da proteine ed il restante 30% da amido, non allontanato in precedenza, lipidi ed altri componenti.

Il glutine prodotto in questo modo forma una massa coesiva le cui proprietà viscoelastiche sono alla base dei processi di trasformazione di semole e farine.

Il glutine è diviso classicamente in frazione solubile in alcool (gliadine) ed insolubile (glutenine), separabili mediante elettroforesi. Le gliadine si presentano in forma essenzialmente monomerica mentre le glutenine sono polimeriche, stabilizzate da legami disolfuro intercatena.

A lungo si è ritenuto che le frazioni gliadiniche e gluteniniche comprendessero differenti tipi di proteine che corrispondevano, rispettivamente, alle prolammine e gluteline, in base alla classificazione di Osborne. Questa classificazione, utilizzata per molti anni, non è in realtà applicabile in maniera così rigorosa, poiché studi genetici, biochimici e molecolari hanno dimostrato che tutte le proteine del glutine sono correlate dal punto di vista strutturale ed evolutivo e possono essere definite prolammine (proteine solubili in soluzioni alcoliche) sia le proteine monomeriche (gliadine) che le subunità ridotte (glutenine) (Shewry *et al.*, 2003). Per questo motivo si è passati ad un nuovo sistema di descrizione delle classi proteiche mantenendo la definizione di idrosolubili per albumine e globuline e differenziando le altre due classi (gliadine e glutenine) in base al tenore di amminoacidi solforati, alla sequenza amminoacidica N-terminale ed al carattere aggregativo (monomerico e polimerico) (Shewry *et al.*, 1986).

Albumine e globuline sono enzimi coinvolti in attività metaboliche, mentre gliadine e glutenine sono proteine di riserva. Funzionalmente le glutenine sono responsabili dell'elasticità dell'impasto mentre le gliadine della viscosità.

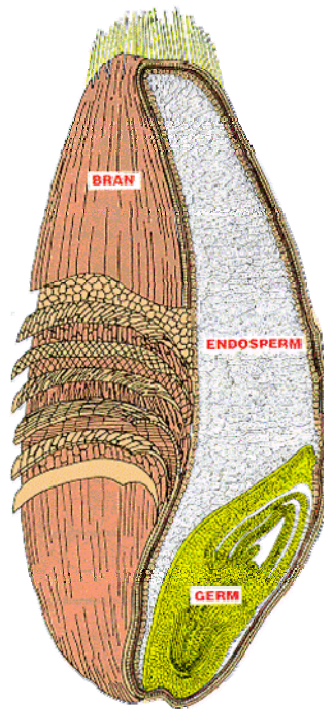


Figura 1.3 Struttura della cariosside di frumento.

1.2 L'amido

L'amido è il più abbondante carboidrato di riserva per le piante e la più importante fonte di energia per la dieta umana, rappresentando fino all'80% delle calorie giornaliere ingerite dalla popolazione mondiale. L'amido di riserva prodotto nell'endosperma dei cereali costituisce più del 90% del mercato mondiale. La maggior parte dell'amido viene estratto dal mais ed è prodotto negli USA.

Nelle piante superiori l'amido è sintetizzato all'interno dei plastidi, viene accumulato in diversi organi sotto forma di granuli, la cui morfologia, dimensione e quantità dipendono dalla diversa origine botanica. La sua funzione è in relazione al tipo di tessuto dal quale esso deriva. L'amido primario o anche detto transiente, sintetizzato nelle foglie durante il giorno attraverso la fotosintesi, viene degradato durante la notte e trasportato attraverso la via floematica nelle cellule dell'endosperma nel caso dei cereali o in quelle del tubero per la patata. Qui viene trasformato in amido secondario o di riserva, composto principalmente da amilosio e amilopectina, ed utilizzato come fonte di carbonio per il metabolismo non fotosintetico (Fig. 1.4).

L'amido è un materiale naturale, rinnovabile ed a basso costo, le cui diverse strutture lo rendono utilizzabile non solo nel settore alimentare ma in numerosi settori industriali e come fonte di energia

dopo la sua conversione ad etanolo, rendendolo una materia prima versatile e vantaggiosa (Roper, 2002). Molte delle desiderate proprietà chimico-fisiche, necessarie per i differenti usi degli amidi, possono essere prodotte ed alterate attraverso modificazioni chimiche ed enzimatiche, e (o) attraverso trattamenti fisici (Wurzburg, 1986).

Circa i due terzi dell'amido che viene prodotto in occidente sono impiegati nell'industria alimentare. Le principali specie coltivate a questo scopo sono riso, mais, frumento e patata; la restante parte dell'amido viene utilizzata per usi non alimentari (Bligh, 1999).

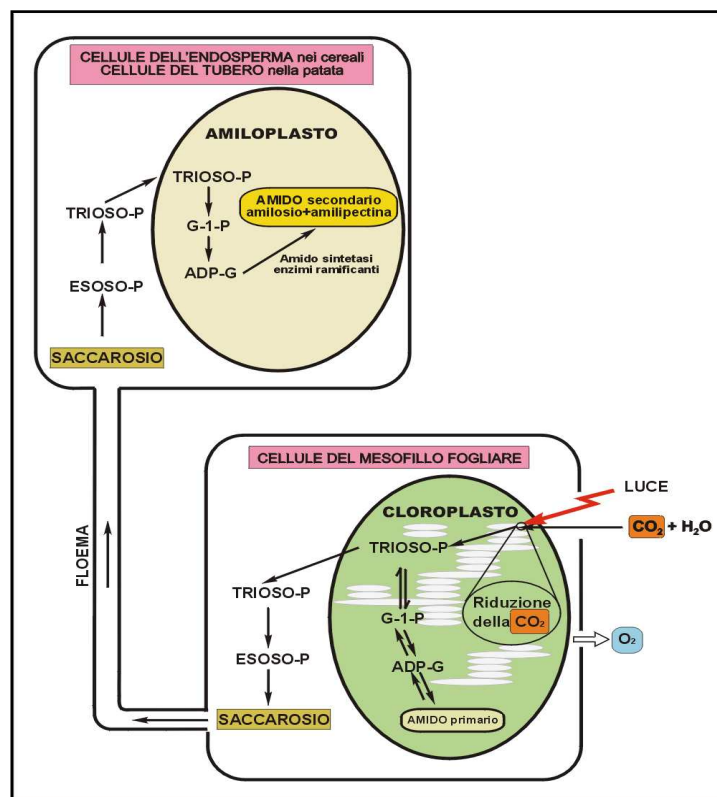


Figura 1.4 Schema della biosintesi dell'amido primario e secondario.

1.2.1 Struttura dell'amido

L'amido è il componente principale della cariosside di frumento: corrisponde al 65-70% del suo peso secco ed è costituito solo da unità di D-glucosio, legate mediante legami α -1,4 a formare catene lineari e mediante legami α -1,6 a formare punti di ramificazioni. L'amido di riserva è costituito da due tipi di

polimeri, l'amilosio e l'amilopectina, che sono assemblati nell'endosperma all'interno di strutture insolubili in acqua, tridimensionali e semicristalline, chiamate granuli. L'amilopectina è un fattore chiave per la formazione delle regioni cristalline e per la struttura dei granuli di amido.

L'amilosio e l'amilopectina differiscono principalmente nel grado di polimerizzazione e nella frequenza delle ramificazioni. L'amilopectina è una molecola molto grande con un grado di polimerizzazione che va da 10^5 a 10^7 e contiene punti di ramificazione frequenti (una ramificazione ogni 15-20 U di glucosio). L'amilosio ha un grado di polimerizzazione più basso (10^3 - 10^4) e contiene pochi punti di ramificazione. Queste differenze tra amilosio ed amilopectina sono funzionalmente importanti e sono riflesse nella varietà di applicazioni che questi polimeri trovano nell'industria alimentare e non. Nei frumenti commerciali (teneri e duri), landraces e progenitori il *range* di contenuto di amilosio varia tra il 18 e 35%, quello di amilopectina tra il 65 e 82% (Zeng *et al.*, 1997; Mohammadkhani *et al.*, 1998; Stoddard e Sarker, 2000). Le proprietà chimico-fisiche dell'amido sono fortemente regolate dalle proporzioni relative di amilosio ed amilopectina. Oltre a tale rapporto anche il grado di polimerizzazione delle catene di glucosio, sia nell'amilosio che nell'amilopectina, influenza notevolmente funzionalità ed applicazioni dell'amido.

Diversi modelli (Gallant *et al.*, 1997, Buléon *et al.*, 1998) della struttura dell'amilopectina descrivono catene corte lineari di circa 10-20 unità, avvolte a formare una doppia elica, organizzate in gruppi (catene "A" e "B"), legate a catene più lunghe (B) che vanno da un gruppo all'altro. Numerosi studi sono stati effettuati, usando diverse combinazioni di enzimi, per cercare di comprendere la distribuzione delle catene "A" (catene che partecipano nei legami α -1,6 solo attraverso il gruppo riducente), "B" (catene che partecipano nei legami α -1,6 attraverso il gruppo riducente, ma contengono anche una o più catene di ramificazione legate attraverso un legame α -1,6) e "C" (catene con un gruppo riducente libero). Le catene di tipo "B" sono state ulteriormente suddivise a seconda della presenza di catene "A" ("B1") e "B" ("B2") (Thompson, 2000). Questa organizzazione delle catene dell'amilopectina determinerebbe la cristallinità dei granuli d'amido e la tipica struttura osservata in tutto il regno vegetale, in cui strati concentrici di materiale cristallino sono alternati a strati di materiale amorfo con una periodicità di 9-10 nm (Martin e Smith, 1995; Ball *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 2000). Le molecole di amilopectina sarebbero disposte radialmente e formerebbero gli strati continui di materiale cristallino tra cui sarebbero disposti strati di materiale amorfo composti da molecole di amilopectina ed amilosio (Buléon *et al.*, 1998) (Fig. 1.5).

Numerosi studi hanno dimostrato, inoltre, la presenza di canali radiali dentro i granuli di amido che hanno un ruolo importante per il rigonfiamento del granulo, per la digestione enzimatica e per le modificazioni chimiche (Gallant *et al.*, 1997; Huber e BeMiller, 2000). In frumento questi canali sono raggruppati intorno alla regione di crescita equatoriale (Fannon *et al.*, 1993; Gallant *et al.*, 1997) e potrebbero favorire un meccanismo che accelera la digestione dei granuli durante la germinazione.

L'eliminazione di enzimi chiave nella biosintesi dell'amido, come l'amido sintasi di classe III (SSIII), causa grossi cambiamenti nella crescita degli anelli concentrici (Pilling e Smith, 2003). In frumento, inoltre, il confronto tra 3 linee con differenti concentrazioni di amilosio ha permesso di dimostrare una relazione diretta tra il contenuto di amilosio e lo spessore degli anelli dell'amido (Yuryev *et al.*, 2004).

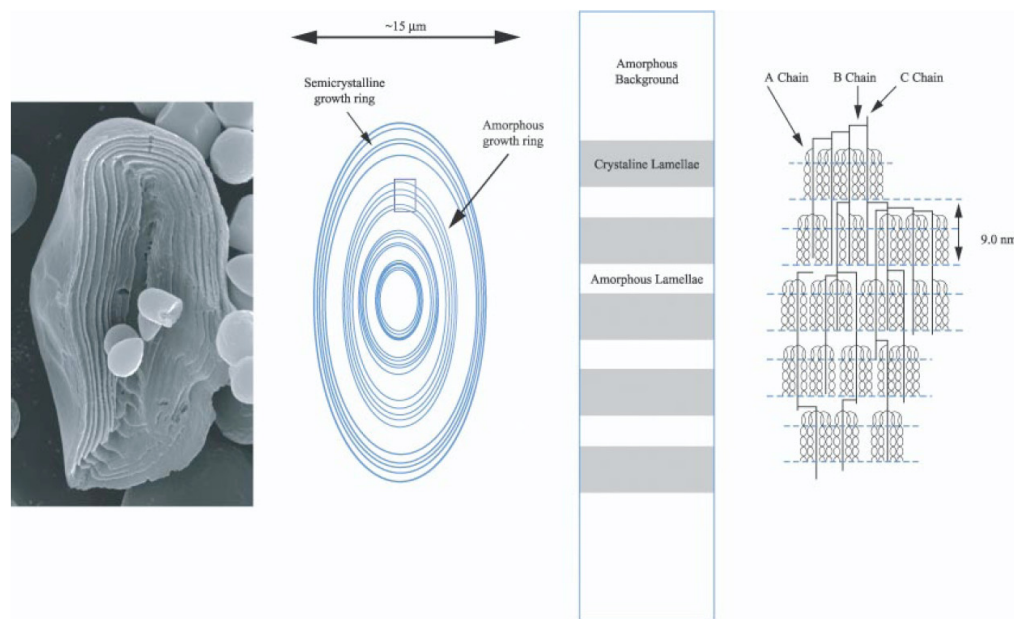


Figura 1.5 Rappresentazione schematica delle strutture dei granuli di amido e della distribuzione delle catene di amilopectina. I granuli di amido hanno un ordine interno costituito da un ilo centrale circondato da depositi di amido in anelli di crescita concentrici. Gli anelli di crescita hanno uno spessore che va da 0.1 a 1 μm e rappresentano quelle regioni dell'amido che sono, rispettivamente, più resistenti e più suscettibili all'attacco degli enzimi di degradazione (Ball e Morell, 2003).

1.2.2 Proteine, lipidi e fosfati

I granuli di amido di frumento contengono una serie di proteine localizzate internamente al granulo, tra cui le GBSS ("granule-bound starch synthase"), le SSI ("starch synthase I"), le BEIIa e BEIIb ("branching enzyme") e le SSIIa ("starch synthase IIa"). In frumento, è stata trovata legata ai granuli un'isoforma BEI ad alto peso molecolare (Peng *et al.*, 2000), che non è stata individuata in altre specie. Oltre a queste proteine i granuli di amido dei cereali contengono altri componenti minori, il cui ruolo nella sintesi dell'amido resta tuttavia sconosciuto (Boren *et al.*, 2004). I granuli di amido, estratti

da seme maturo, sono associati con gruppi di proteine localizzate sulla superficie, che si legano quando la maturazione e disseccamento del seme porta alla distruzione degli amiloplasti. Fra queste proteine troviamo, principalmente, le puroindoline, le friabiline e le GSP (grain softness proteins) (Greenwell e Scholfield, 1986; Darlington *et al.*, 2000; Baldwin, 2001). L'amido di frumento contiene, anche, un basso livello di fosfati covalentemente legati alle posizioni C-3 e C-6 del glucosio. Il maggior contributo di fosfati nei granuli deriva dai lipofosfolipidi, che sono principalmente legati all'amilosio (Morrison e Gadan, 1987).

1.2.3 Struttura dei granuli

Nelle piante superiori l'amido è impacchettato all'interno dei granuli che sono caratterizzati dalla loro densità ($1.5-1.6 \text{ g/cm}^3$) e dalla loro natura semicristallina. Nel frumento maturo sono predominanti due tipi di granuli: il tipo "A" di dimensione più grande ed il tipo "B" di dimensione più piccola (Parker, 1985; Fig. 1.6). I granuli di tipo A hanno un diametro variabile tra 15 e 30 μm , mentre quelli di tipo B hanno un diametro al di sotto dei 10 μm . Inoltre, i primi sono lenticolari e presentano un solco equatoriale, mentre i granuli di tipo B sono di forma sferica. I granuli di tipo B sono più numerosi, e rappresentano circa l'80% del numero totale di granuli nel seme maturo. La porzione relativa dei due tipi di granuli si pensa possa influenzare la gelatinizzazione dell'amido e le proprietà dell'impasto. La formazione di complessi tra amilosio e grassi, quali mono e digliceridi, può influenzare alcune caratteristiche dell'amido quali:

- 1)-la temperatura di gelatinizzazione, ovvero la temperatura alla quale, in presenza di acqua, si ha la rottura dei legami idrogeno, il rigonfiamento dei granuli d'amido e la conseguente perdita della struttura cristallina;
- 2)-la viscosità dell'impasto;
- 3)-la retrogradazione, ovvero il processo durante il quale, a seguito di raffreddamento, si riformano i legami idrogeno, tra le molecole di amilosio, dando origine ad un gel più o meno idratato.

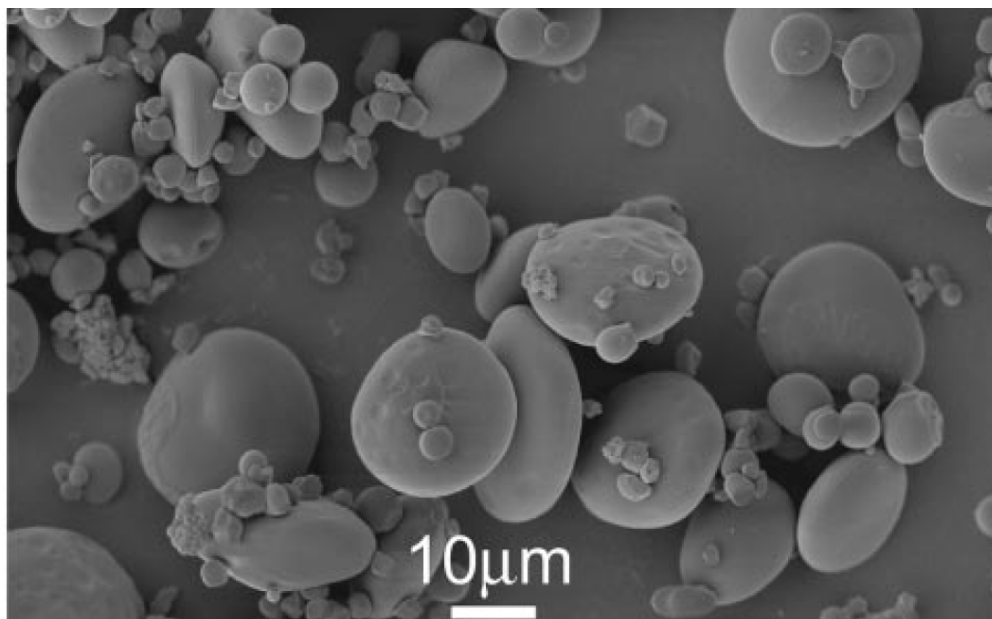


Figura 1.6 Distribuzione bimodale dei granuli di amido in frumento (Regina *et al.*, 2006). Nell'immagine si possono distinguere i granuli di tipo "A", più grandi e di forma ellissoidale, e i granuli di tipo "B", più piccoli e di forma sferica.

La concentrazione dei lipidi nell'amido è positivamente correlata con il contenuto di amilosio; infatti gli amidi dei mutanti waxy hanno un contenuto di lipidi più basso, mentre gli amidi di mais ad alto contenuto di amilosio hanno un contenuto lipidico superiore (Morrison, 1995).

Gli eventi molecolari precisi che sono necessari per la formazione dei granuli di amido rimangono oscuri. Nel frumento tale processo avviene in due fasi: nel periodo che va da 3-7 giorni dopo l'antesi si iniziano a formare i granuli di tipo "A"; poi tale processo sembra cessare fino alla metà dello sviluppo dell'endosperma, quando un secondo periodo molto più prolifico porta allo sviluppo di granuli più piccoli (tipo "B") (Peng *et al.*, 2000).

1.2.4 Fattori che influenzano la funzionalità dell'amido

Le proprietà e la funzionalità dell'amido di frumento non sono controllate soltanto dalla natura e composizione dei granuli, ma sono influenzate, anche, dalla natura del materiale endospermico nel quale il granulo è assemblato all'interno della cariosside matura. I principali fattori che hanno un ruolo importante per i possibili usi finali sono il contenuto di amido, la durezza delle cariossidi (*hardness*), la distribuzione e forma dei granuli, la presenza di lipidi endogeni e la struttura dell'amilopectina. Questi fattori definiscono i modi in cui l'amido risponde al trattamento termico ed all'acqua durante il

suo utilizzo nella preparazione dei diversi prodotti e possono essere modificati attraverso manipolazioni genetico-molecolari (Rahman *et al.*, 2000). L'*hardness* delle cariossidi di frumento è un importante fattore nel determinare gli impieghi finali della farina. Infatti, la durezza del seme influenza il livello di amido danneggiato durante la molitura ed ha un forte effetto sul livello di assorbimento di acqua da parte della farina. Di conseguenza ci sono grosse differenze tra i frumenti cosiddetti "hard" e "soft": le cariossidi "hard" si fratturano maggiormente durante la molitura e ciò comporta un maggior assorbimento di acqua quando questa è aggiunta alla farina. I frumenti "hard" vengono utilizzati quindi per la produzione di pane e "noodle" (spaghetti giapponesi), mentre quelli "soft" per la produzione di biscotti. Il fattore principale che controlla la durezza della cariosside è il locus *Ha*, sito sul cromosoma 5D in frumento (Symes, 1965; Symes, 1969; Mattern *et al.*, 1973). Tre differenti peptidi di circa 15 KDa, chiamati puroindoline a, b e GSP-1 (*Grain Softness Protein*) sono codificate da 3 geni localizzati nel locus *Ha* presente sul cromosoma 5D (Jolly *et al.*, 1993; Jolly *et al.*, 1996; Soundille *et al.*, 1996; Dubreil *et al.*, 1997). Nel caso delle proteine GSP-1, recentemente, sono stati identificati altri 2 geni localizzati, rispettivamente, sui cromosomi 5A e 5B (Gollan *et al.*, 2007). Le puroindoline riducono la durezza delle cariossidi e sono responsabili del fenotipo *soft*, mentre il ruolo delle GSP-1 nell'influenzare l'*hardness* rimane ambiguo (Bhave e Morris, 2008).

A causa della mancanza di biodiversità nel germoplasma di frumento in riferimento alla forma e distribuzione dei granuli, ci sono pochi lavori sull'impatto di questi fattori sul processamento e sulle rese dell'amido nella produzione. L'impatto delle dimensioni dei granuli sulle proprietà reologiche della farina è stato esaminato attraverso sistemi di ricostituzione, in cui l'amido di frumento è stato sostituito con amidi provenienti da differenti specie o con differenti distribuzioni dei granuli A e B. Kulp (1973) ha notato che gli amidi composti dai granuli piccoli assorbono meglio l'acqua ed ha concluso che hanno qualità panificatorie inferiori rispetto agli amidi non frazionati. In studi effettuati per comprendere l'effetto della distribuzione delle dimensioni dei granuli sull'estensibilità della farina è risultato che i granuli B aumentano l'estensibilità, mentre i granuli grandi aumentano la resistenza (Larsson *et al.*, 1997).

Non è chiaro quali fattori influenzano la forma del granulo, ma è noto che variando la sua composizione viene alterata anche la sua forma. Ad esempio, nelle linee "high amylose" di frumento *Sgp-1* in cui l'amilopectina è alterata, i granuli di amido risultano essere fortemente deformati (Yamamori *et al.*, 1998).

Il contenuto lipidico nei cereali è basso (tra 1 e il 2.5%), ma influisce sulle caratteristiche di viscosità e, di conseguenza, sulla qualità degli amidi (Morrison *et al.*, 1988). I lipidi presenti nei granuli di amido di frumento possono essere divisi in tre classi: *non-starch*, superficiali ed interni. I lipidi interni consistono, interamente, di lipofosfolipidi, che interagiscono con l'amilosio formando dei complessi, che si oppongono al rigonfiamento dei granuli di amido durante l'assorbimento di acqua, in seguito a

riscaldamento. Due geni, *flp-1* e *flp-2*, controllano il contenuto di lipidi nell'amido ed è stato dimostrato che sono strettamente legati al locus *Ha* localizzato sul braccio corto del cromosoma 5D (Law *et al.*, 1978). Questo lascia ipotizzare che i lipidi polari legati ai granuli sono, probabilmente, coinvolti nelle interazioni tra le puroindoline e la superficie dei granuli di amido (Greenblatt *et al.*, 1995).

1.2.5 Struttura dell'amido in relazione alla gelatinizzazione, al rigonfiamento, alla viscosità dell'impasto ed alla retrogradazione

La gelatinizzazione dei granuli di amido è quel processo dovuto alla trasformazione dei granuli di amido immersi in acqua da uno stato ordinato ad uno disordinato in seguito a riscaldamento. Durante il riscaldamento i granuli di amido cominciano ad assorbire acqua, si rigonfiano, perdono la caratteristica birifrangenza e la viscosità dell'impasto aumenta notevolmente. La viscosità aumenta fino al raggiungimento di un picco, dopo il quale i granuli di amido collassano e si rompono rilasciando l'amilosio in soluzione: in seguito al collasso si ha una drastica diminuzione della viscosità (Rahman *et al.*, 2000). Il processo di gelatinizzazione è simile sia nei granuli normali che in quelli dei mutanti *waxy* (privi di amilosio), suggerendo che le proprietà dell'amilopectina sono più critiche rispetto all'amilosio nel controllare la gelatinizzazione ed il rigonfiamento negli amidi dei cereali. Morrison *et al.* (1993) hanno dimostrato che l'amilosio è in grado di formare dei legami con i lipidi producendo dei complessi che riducono la mobilità dell'acqua e si oppongono al rigonfiamento. Da numerosi studi è risultato che aumentando il peso molecolare e le ramificazioni dell'amilopectina è possibile incrementare la viscosità dell'amido; altri studi hanno suggerito che piccoli cambiamenti ai polimeri di amilopectina possono portare a cambiamenti significativi nelle caratteristiche fisiche dell'amido (Dintzis e Bagley, 1995). Durante il raffreddamento i polimeri lineari di amilosio, rimasti liberi nella soluzione, interagiscono tra di loro formando dei complessi a doppia elica. Questo fenomeno è definito retrogradazione ed è quello che normalmente avviene durante il processo di invecchiamento di prodotti da forno.

1.2.5.1 Rapid Visco Analyser (RVA)

Il Rapid Visco Analyser è uno strumento che è in grado di monitorare i cambiamenti di viscosità dell'amido o di uno sfarinato di cereali, immersi in una soluzione acquosa ed in agitazione meccanica costante, al variare della temperatura. I cambiamenti di viscosità, prodotti dal riscaldamento dell'amido in acqua, forniscono una curva caratteristica quando vengono analizzati mediante l'RVA

che dipende, principalmente, dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'amido analizzato (Fig. 1.7). Nella fase iniziale dell'analisi la temperatura è inferiore a quella di gelatinizzazione dell'amido e la viscosità è bassa. Quando viene raggiunta la temperatura di gelatinizzazione, i granuli d'amido iniziano a rigonfiarsi e la viscosità dell'impasto aumenta. Questo processo è irreversibile. La temperatura all'inizio di questo aumento di viscosità è detta *pasting temperature*.

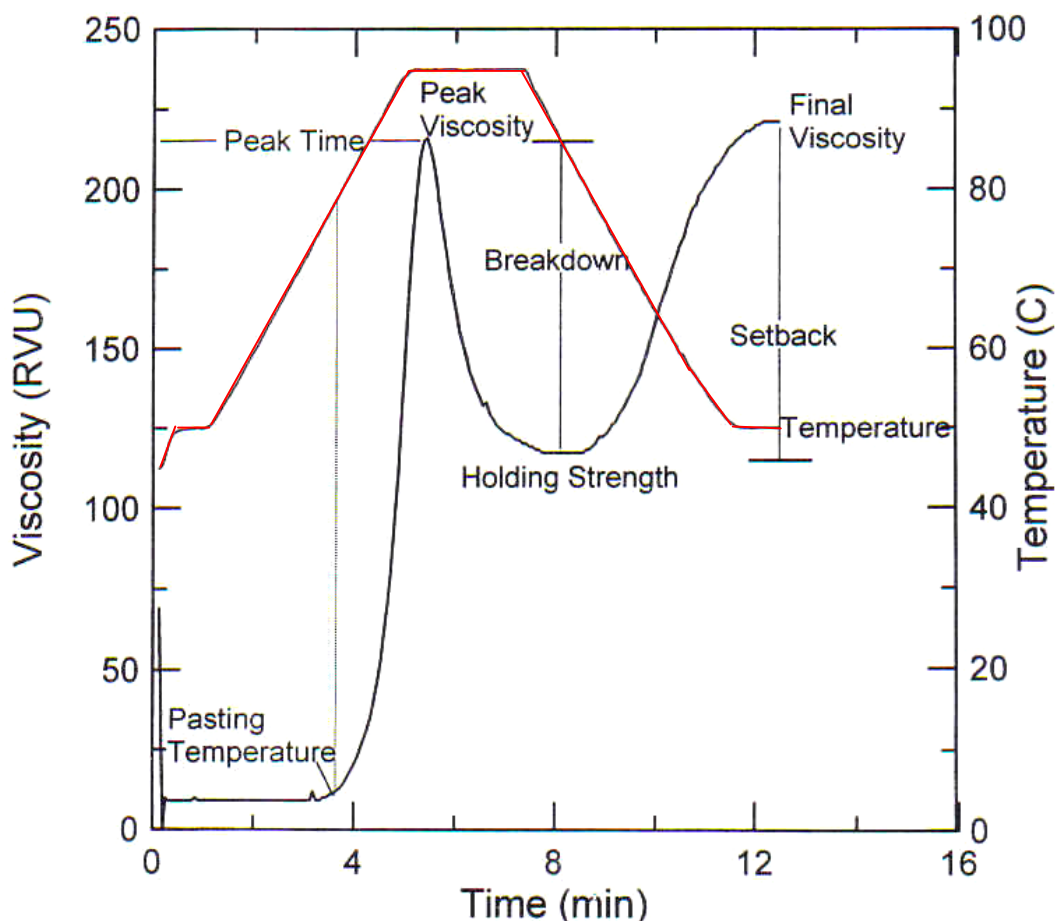


Figura 1.7 Profilo RVA: sono riportati tutti i parametri misurati durante le analisi

Quando un numero sufficiente di granuli è rigonfio, si osserva un rapido aumento della viscosità. Se la temperatura aumenta ancora, i granuli si rompono e la maggior parte dell'amilosio solubile fuoriesce nella soluzione, seguito, in alcuni casi, dall'amilopectina. La rottura dei granuli e la conseguente linearizzazione del polimero, dovuta al mescolamento meccanico, provocano la riduzione della viscosità dell'impasto. Questa combinazione di processi, che segue la gelatinizzazione, è definita *pasting*.

Il picco di viscosità si ha nel punto di equilibrio tra il rigonfiamento e la fuoriuscita del polimero, che causano l'aumento della viscosità, e la rottura dei granuli e la linearizzazione del polimero, che ne provocano la diminuzione. Di solito si misurano anche il picco della temperatura e del tempo in cui l'impasto raggiunge la massima viscosità.

Il picco di viscosità indica la capacità dell'amido di legarsi all'acqua. È spesso correlato con la qualità del prodotto finale e fornisce anche un'indicazione del carico viscoso durante il riscaldamento.

L'alta temperatura (di solito 95 °C) e lo stress meccanico, ai quali è sottoposto il campione nella fase centrale dell'analisi, causano il collasso dei granuli. Questo periodo è di solito accompagnato da un crollo della viscosità che raggiunge i valori minimi ed è definito come viscosità dell'impasto caldo o picco minimo. La velocità con cui la viscosità diminuisce dipende dalla temperatura, dal grado di mescolamento applicati alla miscela e dalla natura del materiale stesso. L'abilità del campione di resistere al riscaldamento ed allo stress meccanico è un fattore importante in molti processi.

Se la miscela viene raffreddata, le molecole d'amido, specialmente l'amilosio, si riassociano. Questo di solito provoca la formazione di un gel e l'aumento della viscosità. Nella curva questa fase viene misurata con il *setback* e coinvolge la retrogradazione delle molecole di amido.

Il *setback* corrisponde alla differenza tra la viscosità finale ed il punto di minimo della viscosità ed è correlato con la consistenza dei vari prodotti. Un alto *setback* è, inoltre, associato con la sineresi o sgocciolamento durante il ciclo di congelamento/scongelamento. Alcune volte il *setback* può essere calcolato come differenza tra la viscosità finale ed il picco di viscosità (per esempio nel riso), piuttosto che come differenza tra la viscosità finale ed il picco minimo di viscosità. La viscosità finale può o non può avere un *plateau*, dipende dall'amido e dalle condizioni del test.

La viscosità finale è il parametro più comunemente usato per definire una particolare qualità del campione, per esempio, la capacità dei materiali di formare un impasto viscoso o un gel dopo il riscaldamento ed il raffreddamento.

1.3 Sintesi dell'amido in frumento

La fonte primaria di substrati per la sintesi dell'amido in frumento è il saccarosio che arriva alla cariosside attraverso il floema come risultato della fotosintesi o attraverso la mobilitazione di carboidrati di riserva. Il saccarosio si muove all'interno dell'endosperma verso i siti dove viene utilizzato come substrato mediante un gradiente di densità. La sintesi e l'assemblaggio dei granuli di amido nei plastidi e negli amiloplasti è un complesso processo che implica l'azione concertata di una serie di enzimi. Le attività enzimatiche coinvolte nella sintesi dei granuli di amido includono l'ADP

glucosio pirofosforilasi (AGPasi), le amido sintasi (SS e GBSS), gli enzimi di ramificazione (BE) e quelli di deramificazione (DBE) (Fig. 1.8).

Il primo *step* per la sintesi dell'amido nell'endosperma è la formazione dell'ADP-glucosio (ADPG) a partire dalla reazione catalizzata dall'AGPasi tra glucosio 1-fosfato ed ATP. L'ADPG è il substrato comune per la sintesi di amilosio ed amilopectina. In seguito, il glucosio viene trasferito dall'ADPG all'estremità non riducente di una catena glucosidica mediante un legame α -1,4 (reazione catalizzata dall'azione di diverse classi di amido sintasi, specifiche per la sintesi di amilosio e di amilopectina). Il polimero di amido esteso è, poi, ramificato mediante la formazione di legami α -1,6 dall'azione degli enzimi di ramificazione (BE) e ci sono forti evidenze per il coinvolgimento degli enzimi di deramificazione nel formare la struttura finale dell'amilopectina (Rahman *et al.*, 2000).

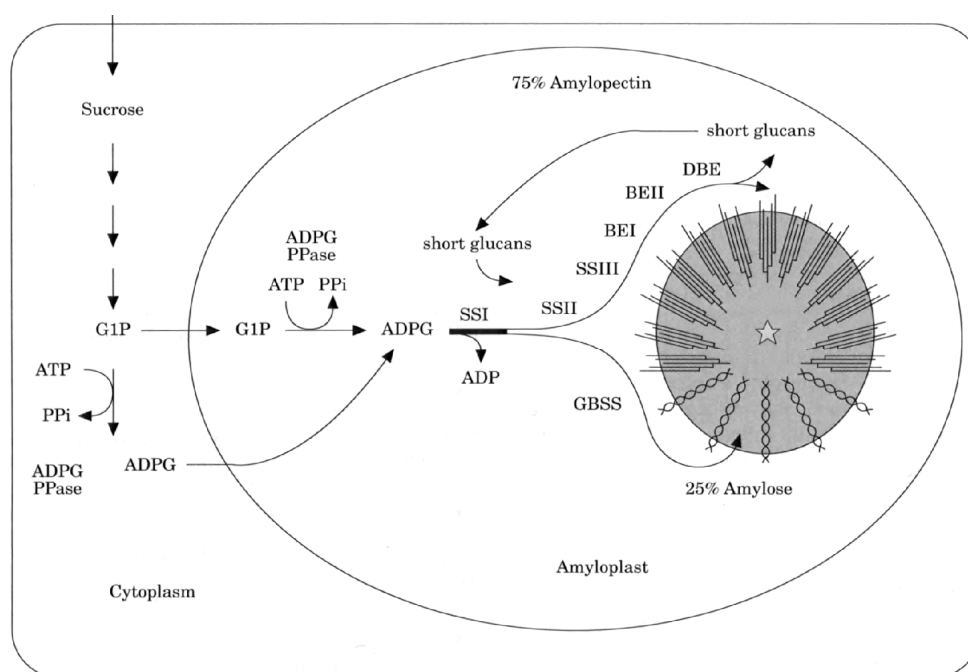


Figura 1.8 Schema generale della biosintesi dell'amido all'interno di una cellula dell'endosperma dei cereali (da Rahman *et al.*, 2000).

1.3.1 ADPGlucosio pirofosforilasi

In tutte le piante in grado di sintetizzare l'amido, l'adenosina 5' difosfoglucosio pirofosforilasi (AGPasi) è l'enzima responsabile per la produzione di ADPG, che è il precursore solubile e substrato per la sintesi dell'amido. La reazione catalizzata dalla AGPasi rappresenta il primo step della sintesi dell'amido sia per quanto riguarda l'amido primario che per quello di riserva ed è soggetta a diversi

meccanismi di regolazione post-traduzionale. L'AGPasi delle piante superiori è un'isoforma tetramerica, che consiste di due subunità catalitiche grandi (AGP-L) e due piccole (AGP-S) codificate almeno da due differenti geni (Preiss e Sivak 1996). Inoltre, le analisi chimiche e genetiche hanno messo in evidenza che oltre alla subunità plastidiale (presente in tutti i tessuti sintetizzanti l'amido) esiste una AGPasi citosolica che ha un ruolo fondamentale nella sintesi dell'amido nell'endosperma di mais (Denyer *et al.*, 1996b), riso (Sikka *et al.*, 2001), orzo (Thorbjornsen *et al.*, 1996a) e frumento (Tetlow *et al.*, 2003). Nell'endosperma dei cereali l'isoforma citosolica costituisce dal 65 al 95% dell'attività AGPasica totale.

Le piante posseggono geni multipli codificanti le subunità AGP-L e/o AGP-S, che sono differenzialmente espressi nei diversi organi della pianta. Questo significa che la composizione delle AGPasi può variare nei differenti tessuti della stessa pianta. I geni multipli codificanti le subunità AGP-L mostrano un'alta specificità nella loro espressione: possono essere presenti solo in foglia, radice o endosperma e possono essere indotti sotto specifiche condizioni, come aumentando il livello di saccarosio o di glucosio (Muller-Rober *et al.*, 1990; Duwening *et al.*, 1997). Nell'endosperma dei cereali, si pensa che la localizzazione subcellulare sia regolata da uno *splicing* differenziale dei geni che codificano per le AGPasi; infatti, da studi sull'orzo è risultato che l'mRNA citosolico e plastidiale della subunità AGP-S sono prodotti da un singolo gene attraverso l'uso di due primi esoni alternativi. Le attività catalitiche delle isoforme AGPasi sono, a vario grado, soggette a regolazione allosterica: generalmente risultano essere stimulate dal 3-fosfoglicerato (3-PGA) ed inibite dall'ortofosfato inorganico (Pi).

I mutanti *bt2* e *sh2*, non esprimenti le subunità citoplasmatiche ma con le subunità plastidiali inalterate, presentano un basso contenuto di amido, suggerendo che un ruolo primario per la sintesi dell'amido è svolto dall'AGPasi citosolica (Tsai e Nelson 1966; Dickinson e Preiss 1969). Questa conclusione è stata confermata dall'analisi del mutante di orzo *Ris^s 16*, privo anch'esso della subunità citosolica piccola, ma con l'attività inalterata della subunità plastidiale (Johnson *et al.*, 2003).

In frumento non ci sono molti dati sul ruolo delle differenti subunità, in quanto l'identificazione di mutanti è resa difficile dalla natura poliploide del genoma.

L'AGPasi catalizza lo step limitante nella biosintesi dell'amido ed esercita un elevato grado di controllo sul flusso di carbonio in questo *pathway*. Così l'attenzione di molti ricercatori si è focalizzata sulla modulazione dell'attività di questo enzima chiave per incrementare la resa di amido nelle piante da raccolto. Questo approccio è particolarmente importante ed interessante se adottato per compensare la perdita di resa associata a particolari genotipi usati per produrre amidi funzionali (per esempio, amidi ad alto contenuto di amilosio). Smidansky *et al.* (2002) hanno trasformato con successo piante di frumento con una subunità AGPasica grande (*Shrunken2*) di mais che non è soggetta a regolazione allosterica, incrementando notevolmente la resa di amido.

1.3.2 Ruolo dei trasportatori dell'ADPG negli amiloplasti

L'identificazione del mutante *Brittle-1* in mais ha confermato che un ruolo importante nella sintesi dell'amido è svolto da un trasportatore di glucosio; infatti, il mutante *Brittle-1* ha bassi livelli di amido e tende ad accumulare ADPglucosio. Queste osservazioni hanno messo in risalto il ruolo critico di un trasportatore di ADPG localizzato sulle membrane degli amiloplasti. Il ruolo della proteina Brittle-1 come trasportatore di ADPG è stato confermato da una serie di studi biochimici (Shannon *et al.*, 1998).

In frumento, la presenza di un trasportatore di ADPG omologo a Brittle-1 è stata confermata da Balmer *et al.* (2006), suggerendo che potrebbe essere regolato da un sistema redox mediato dalla tioredoxina, che coordinerebbe la regolazione dell'attività dell'AGPasi con il trasporto di ADPG.

1.3.3 Sintesi dell'amilosio: Granule Bound Starch Synthase (GBSS)

L'amilosio viene sintetizzato all'interno dei granuli da una reazione catalizzata dall'amido sintasi GBSS (Granule Bound Starch Synthase), anche se, recentemente, è stato riportato che questo enzima è presente anche nella frazione solubile (Kosar-Hasnemi *et al.*, 2007). Altri enzimi potrebbero svolgere un ruolo nella sintesi dell'amilosio ma da studi effettuati su diversi organismi, dalle alghe alle piante superiori, è chiaro che la GBSS ha un ruolo predominante. Infatti nei mutanti *waxy*, privi di questo enzima, è stato riscontrato un drastico crollo nel contenuto di amilosio.

Sia le piante monocotiledoni che dicotiledoni hanno due isoforme GBSS, un'isoforma espressa nell'endosperma (GBSSI) ed un'altra espressa negli altri tessuti (GBSSII) (Nakamura *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2002).

In frumento l'amido sintasi GBSSI è responsabile della sintesi dell'amilosio nell'endosperma: l'eliminazione delle tre isoforme del gene porta ad un fenotipo facilmente riconoscibile per l'aspetto ceroso delle cariossidi e contenuto di amilosio quasi prossimo a zero (Fig. 1.9).

Nel frumento tenero esaploide sono presenti tre isoforme GBSSI, di circa 58-60 kDa, denominate Wx-A1, Wx-D1 e Wx-B1 codificate da 3 geni *Wx-A1*, *Wx-D1* e *Wx-B1*, localizzati rispettivamente sui bracci corti dei cromosomi 7A e 7D e sul braccio lungo del cromosoma 4A (in seguito ad una traslocazione dal braccio corto del cromosoma 7B) (Chao *et al.*, 1989; Miura *et al.*, 1994; Yamamori *et al.*, 1994). Nel frumento duro tetraploide sono presenti solo le due proteine waxy Wx-A1 e Wx-B1 che in SDS-PAGE presentano un peso molecolare uguale a quelle corrispondenti di frumento tenero (Fig. 1.13).

In frumento sono state ottenute piante "parzialmente waxy" con un contenuto di amilosio compreso tra il 12.5% e il 28%, aventi un amido con particolari caratteristiche di cristallizzazione e gelatinizzazione

(Yamamori *et al.*, 1992; Urbano *et al.*, 2002); i genotipi waxy o “parzialmente waxy” (in cui non tutti gli alleli sono funzionali) mostrano un impasto con bassa viscosità e bassa temperatura di gelatinizzazione (Rodriguez-Quijano *et al.*, 2002). Sebbene in molti casi l’obiettivo iniziale era quello di produrre linee con contenuto di amilosio zero, ben presto si è capito che linee waxy parziali (singolo o doppio nulli per i geni GBSSI) posseggono amidi con caratteristiche chimico fisiche particolari e con un contenuto di amilosio intermedio (tra 12 e 28%). Queste caratteristiche li rendono direttamente impiegabili in campo industriale, evitando le modificazioni chimiche che normalmente vengono eseguite dopo l’estrazione.

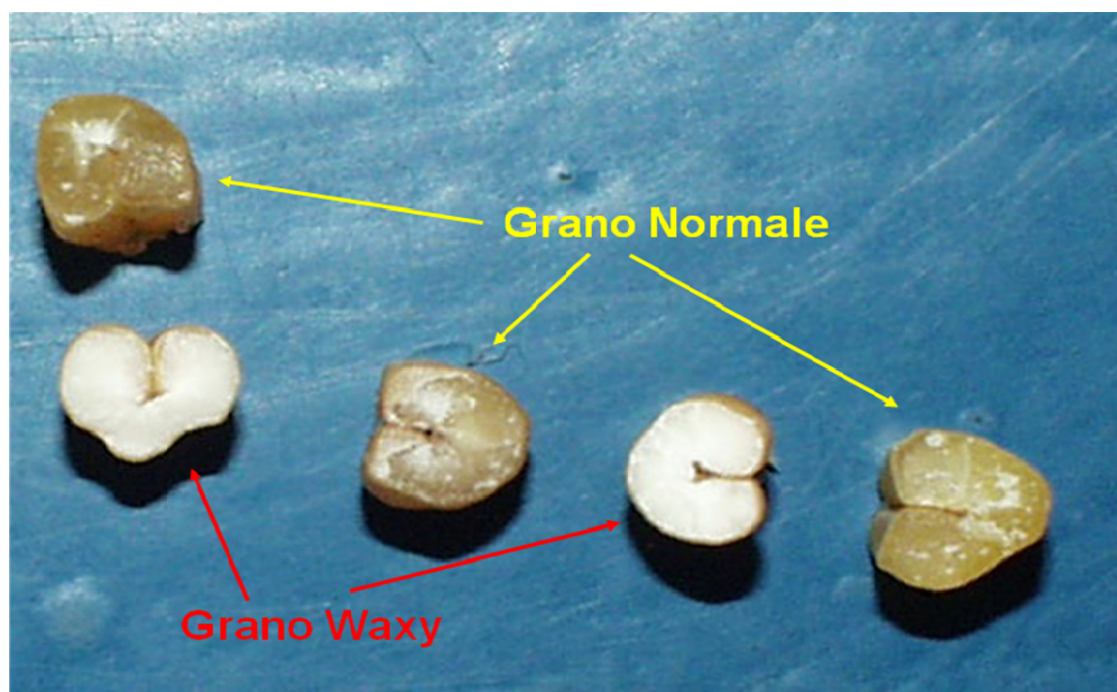


Figura 1.9 Cariossidi di frumento normali e waxy. Quelle waxy sono facilmente riconoscibili per il tipico aspetto ceroso.

Studi biochimici sulla GBSS hanno dimostrato che l’enzima 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.*, 1999). Si pensa 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.*, 1999). È stato anche riportato che l'amilopectina può stimolare l'attività delle GBSS suggerendo, quindi, che le isoforme sono influenzate anche dalla matrice in cui sono incluse (Denyer *et al.*, 1999). 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 (Denyer *et al.*, 1999).

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.

1.3.4 Sintesi dell'amilopectina

Da studi genetici e biochimici si evince facilmente che la sintesi dell'amilopectina è più complessa rispetto alla sintesi dell'amilosio. Infatti, sono richieste almeno tre forme di amido sintasi (SSI, SSII, SSIII) e due tipi di enzimi di ramificazione (BEI, BEII). In più, la sintesi richiede la presenza di almeno un enzima di deramificazione (isoamilasi). Questa situazione è resa più complessa dalla presenza di forme multiple in alcune classi di questi geni e dalla presenza di differenti isoforme per lo stesso enzima su ogni genoma in organismi poliploidi come il frumento.

Ruolo delle cinque classi di amido sintasi nella sintesi dell'amilopectina

Molti autori ritengono che esistono cinque classi di amido sintasi, come discusso nelle sezioni precedenti. Alcune specie come il riso sembrano avere ulteriori duplicazioni dentro queste classi ed i membri di queste famiglie geniche classe-specifiche sono differenzialmente espressi nei diversi tessuti (Dian *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2004; Dian *et al.*, 2005). La prima classe contiene due membri, GBSSI e GBSSII, che differiscono nella loro specificità di espressione nei diversi tessuti, ma sono entrambi essenzialmente implicati nella sintesi dell'amilosio. Dalla caratterizzazione degli amidi waxy è stato, tuttavia, proposto un ruolo per le isoforme GBSS nella sintesi delle catene molto lunghe dell'amilopectina che legano "cluster" multipli, incrementando così la massa molecolare (Yoo e Jane, 2002a; Yoo e Jane, 2002b).

Le classi rimanenti di amido sintasi sono coinvolte nella sintesi dell'amilopectina. La soppressione del gene *SSI* provoca piccoli cambiamenti nel contenuto di amido, ma profondi cambiamenti nella struttura dell'amilopectina, con diminuzione delle catene corte. Quindi, sulla base di recenti lavori (Delvalle *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2006) si può ipotizzare che le amido sintasi SSI hanno, probabilmente, un ruolo nella sintesi delle catene A e B1 dell'amilopectina. Per quanto riguarda il

contenuto di amido, le proteine SSIIa sembrano essere gli enzimi più importanti nell'endosperma dei cereali, poiché la soppressione di queste proteine 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. Nessun ruolo per ora è stato ben definito per le amido sintasi SSIV.

1.3.4.1 Le amido sintasi di classe I (SSI)

Attraverso studi biochimici sulle amido sintasi legate ai granuli (Sgp) presenti nell'endosperma di mais sono state identificate due attività amido sintasiche, ora conosciute come SSI e SSII e presenti, anche, nell'endosperma delle cariossidi di frumento in via di sviluppo (Denyer *et al.*, 1995). In frumento la proteina Sgp-3 è codificata dal gene *SSI*, che è localizzato sul braccio corto del cromosoma 7. Un singolo locus omeologo è presente in ciascun genoma (Li *et al.*, 1999). Il profilo di espressione in frumento mostra che l'espressione del gene *SSI* inizia 3 giorni dopo la fioritura (DAF), raggiunge il picco a 10 DAF e declina a bassi livelli da 20 DAF (Li *et al.*, 1999).

Nonostante la presenza universale del gene *SSI* in un grosso *range* di organismi, nessun mutante *SSI* è stato identificato attraverso approcci di genetica classica. Due pubblicazioni recenti hanno contribuito a comprendere meglio il ruolo di questo enzima nella sintesi dell'amido attraverso la descrizione fenotipica dei mutanti *SSI* identificati con approcci di genetica inversa rispettivamente in *Arabidopsis* (Delvalle *et al.*, 2005) e in riso (Fujita *et al.*, 2006). Delvalle *et al.* (2005) hanno dimostrato che la proteina SSI ha un ruolo nella sintesi delle catene corte durante l'allungamento dell'amilopectina nelle foglie di *Arabidopsis*. Questa funzione è stata confermata osservando la distribuzione delle catene nei mutanti *SSI* di riso, dove è stato riscontrato un decremento delle catene corte (DP tra 8 e 12) ed un aumento delle catene intermedie (DP tra 16 e 19) (Fujita *et al.*, 2006). La temperatura di gelatinizzazione dell'amido risulta incrementata nei mutanti *SSI* (Fujita *et al.*, 2006). L'assenza del gene *SSI* non ha, invece, nessun effetto sulle dimensioni e forma dei semi, ciò spiega perchè non sono stati individuati mutanti con approcci di genetica classica.

1.3.4.2 Le amido sintasi di classe II (SSII)

Dall'analisi del genoma di riso risulta che tre distinti geni appartengono alle amido sintasi di classe II (Jiang *et al.*, 2004; Hirose and Terao, 2004) e che i tre geni *SSII* hanno differenti *pattern* di espressione a seconda dello stadio di sviluppo e del tessuto. In mais sono state identificate due proteine SSII: l'*SSIIa* che ha un'alta espressione nell'endosperma e l'*SSIIb* che è espressa in foglia (Harn *et al.*, 1998; Imparl-Radosevich *et al.*, 1999). In frumento è stato dimostrato che tre proteine associate ai granuli di amido, precedentemente identificate e descritte come Sgp-1 (Yamamori e Endo 1996), sono delle amido sintasi di classe II (SSII), codificate da geni che hanno alta omologia con l'*SSIIa* di mais (Li *et al.*, 1999).

La proteina *SSIIa* di frumento si trova sia nella frazione solubile che legata ai granuli nei primi stadi di sviluppo della cariosside, ma è principalmente localizzata nel granulo nei successivi stati di maturazione della cariosside (Li *et al.*, 1999). In frumento esistono tre proteine Sgp-1, rispettivamente chiamate Sgp-A1, Sgp-B1 e Sgp-D1, codificate da tre diversi geni, 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, in cui il gene *SSIIa* è stato silenziato, è stato riscontrato una diminuzione nel contenuto di amido, un incremento nel contenuto di amilosio e morfologia dei granuli e struttura dell'amilopectina alterata (Craig *et al.*, 1998).

In frumento sono state identificate e caratterizzate delle linee prive, rispettivamente, di una delle tre proteine Sgp-1 (Yamamori, 1998; 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; Fig. 1.10).

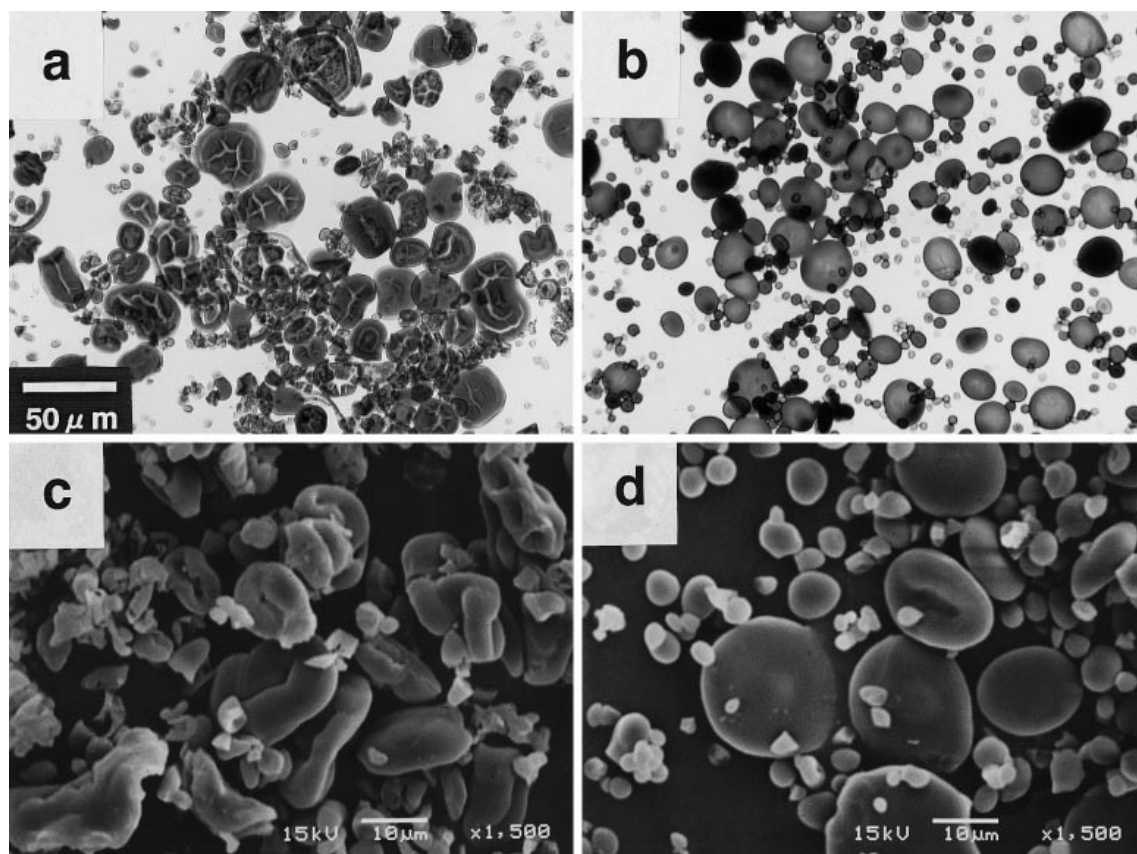


Figura 1.10 Morfologia dei granuli. I granuli di amido isolati dall'endosperma delle linee *Sgp-1* nulli (a) e Chinese Spring (b) sono stati colorati con una soluzione di KI/I_2 ed osservati al microscopio. I granuli di amido estratti dai mutanti *Sgp-1* nulli (c) e da Chinese Spring (d) sono stati ricoperti di oro e osservati al microscopio elettronico a scansione (da Yamamori *et al.*, 2000).

Le basi molecolari, che hanno permesso di individuare i siti catalitici e siti di legame ai granuli, sono state esplorate in riso (Unemoto *et al.*, 2004; Unemoto 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 *SSIIa*, chiamato *sex6*, mostra un contenuto di amilosio elevato (superiore al 70%) con basse rese di amido e con caratteristiche simile al mutante *rug5* di pisello (Morell *et al.*, 2003). Anche in mais il mutante *sugary-2*, che ha una lesione nel gene *SSIIa*, mostra alto contenuto di amilosio, temperatura di gelatinizzazione ridotta, morfologia dei granuli e distribuzione della lunghezza delle catene di amilopectina alterate (Zhang *et al.*, 2004).

1.3.4.3 Le amido sintasi di classe III (SSIII)

Il genoma di riso contiene due geni *SSIII*, *OsSSIII-1* e *OsSSIII-2*, espressi, rispettivamente, in foglia e nell'endosperma (Jiang *et al.*, 2004; Dian *et al.*, 2005). Il legame tra le proteine SSIII e la sua funzione nell'endosperma dei cereali è stata trovata grazie all'identificazione dei mutanti che non esprimono questa proteina, come il mutante *dull* di mais (Gao *et al.*, 1998). Precedenti lavori su piante transgeniche di patata, in cui il gene *SSIII* è stato silenziato da solo o in combinazione con *SSII* mediante la tecnologia dell'antisense, 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.

Anche in frumento i geni *SSIII* sono stati clonati e caratterizzati (Li *et al.*, 2000). Come nelle altre specie, il gene *SSIII* codifica per una proteina che ha un dominio catalitico C-terminale ed una lunga estensione N-terminale che ha funzione sconosciuta. I geni sono localizzati in loci omeologhi sul cromosoma 1, consistono di 16 esoni ed hanno una lunghezza di circa 10 kb. Per comprendere meglio il ruolo del gene *SSIII* nella sintesi dell'amido e la sua funzione in frumento sono necessari ulteriori studi.

1.3.4.4 Le amido sintasi di classe IV

In riso sono stati identificati due geni che codificano amido sintasi di classe IV, *SSIV-1* e *SSIV-2*, espressi rispettivamente nell'endosperma ed in foglia (Hirose e Terao, 2004; Dian *et al.*, 2005). Il ruolo del gene *SSIV* non è stato ancora definito in nessun sistema vegetale e l'impatto della manipolazione di questo gene sulla sintesi o proprietà dell'amido di frumento deve ancora essere chiarito.

1.3.4.5 Gli enzimi di ramificazione di classe I (BEI)

Gli enzimi di ramificazione dell'amido (BEs=branching enzymes) sono delle transglicosilasi coinvolte nella sintesi dell'amilopectina. Tali enzimi sono responsabili della formazione delle catene di ramificazione, in quanto tagliano legami interni α -1,4 e generano legami α -1,6 trasferendo l'estremità riducente sul carbonio 6 (C6). In base alla sequenza amminoacidica terminale ed alla caratterizzazione immunologica, gli enzimi di ramificazione BE possono essere divisi in due classi, BEI e BEII (Burton *et al.*, 1995).

Nelle monocotiledoni la classe BEII include due geni, chiamati rispettivamente *BEIIa* e *BEIIb*.

In frumento i loci omologhi dei geni *BEI* sono localizzati sull'estremità distale del cromosoma 7A, 7B e 7D. Il locus *BEI* in *Aegilops tauschii* è complesso, in quanto contiene un gene attivo e parecchi pseudogeni (Rahman *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2003).

In frumento le proteine codificate dai geni *BEI* 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, ci sono due prodotti del genoma D ed uno ciascuno dal genoma A e B (Morell *et al.*, 1997). I trascritti dei geni *BEI* sono soggetti a meccanismi di *splicing* alternativo del mRNA (Båga *et al.*, 1999a) e non è chiaro se i due prodotti del genoma D derivano da differenti geni o se sono sequenze generate da *splicing* alternativo. Inoltre Peng *et al.* (2000) hanno descritto gli enzimi di ramificazione di tipo BEI ad alto peso molecolare preferenzialmente legati ai granuli di tipo A, chiamati Sgp-140 e -145 (Peng *et al.*, 2000; Båga *et al.*, 2000).

I mutanti *BEI* 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 nessun fenotipo 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 che ha un ridotto livello di BEI (inferiore all'1%); ma non è stato riscontrato nessun cambiamento nella struttura o nella funzionalità dell'amido nella linea triplo nulli rispetto al genotipo selvatico (Regina *et al.*, 2004).

Durante la biosintesi dell'amilopectina nell'endosperma di mais la funzione di BEIIb è predominante rispetto a BEIa e BEIIa (i mutanti in questi geni in presenza di BEIIb non mostrano grosse differenze rispetto al *wild type*). In assenza di SBEIIb, l'ulteriore silenziamento di SBEIa porta ad una riduzione delle ramificazioni lunghe; ciò ha lasciato ipotizzare un ruolo per questa proteina nella sintesi delle catene lunghe nell'amilopectina (Yao *et al.*, 2004).

1.3.4.6 Gli enzimi di ramificazione di classe II (BEIIa e BEIIb)

I ruoli dei geni *BEIIa* e *BEIIb* sono stati caratterizzati in maniera estensiva in mais, riso e frumento. In mais il mutante *ae* (*amylose extender*) ha una lesione nel gene *BEIIb* e mostra un fenotipo con un elevato contenuto di amilosio (>50%) (Stinard *et al.*, 1993); mentre una mutazione sul gene *BEIIa* 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 associato con mutazioni negli omologhi dei geni *BEIIb* (Mizuno *et al.*, 1993; Nishi *et al.*, 2001).

In frumento i geni *BEIIa* e *BEIIb* sono stati caratterizzati ed è stato dimostrato che sono localizzati sul braccio corto del cromosoma 2 (Nair *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 2001; Regina *et al.*, 2005). Questa localizzazione non è sintenica rispetto ad altre specie, nelle quali i geni *BEIIa* e *BEIIb* sono presenti in cromosomi differenti. In riso il gene *BEIIa* si trova sul cromosoma 4 (sintenico al cromosoma 2 di frumento) ed il gene *BEIIb* sul 2 (sintenico al cromosoma 6 di frumento); in mais i due geni sono localizzati, rispettivamente, sul cromosoma 8 e 5. Da queste analisi risulta che il gene *BEIIa* di frumento è localizzato in una posizione sintenica, mentre l'*BEIIb* non è sintenico rispetto agli altri cereali (Regina *et al.*, 2005). Inoltre, in frumento ci sono anche notevoli differenze nell'espressione dei geni *BEIIa* e *BEIIb* rispetto agli altri cereali. In mais (Gao *et al.*, 1997) e riso (Yamanouchi and Nakamura, 1992) il gene *BEIIb* è l'isoforma predominante nell'endosperma, mentre in frumento il gene *BEIIa* è espresso a livelli 3-4 volte superiori rispetto al *BEIIb*.

Il ruolo dei due geni nell'endosperma di frumento è stato investigato mediante la tecnologia dell'RNA *interference* (RNAi) (Regina *et al.*, 2006). Differentemente da quanto osservato nell'endosperma di altri cereali, la soppressione del gene *BEIIb* non ha effetti significativi sul contenuto di amilosio e sulla morfologia dei granuli (Fig. 1.11).

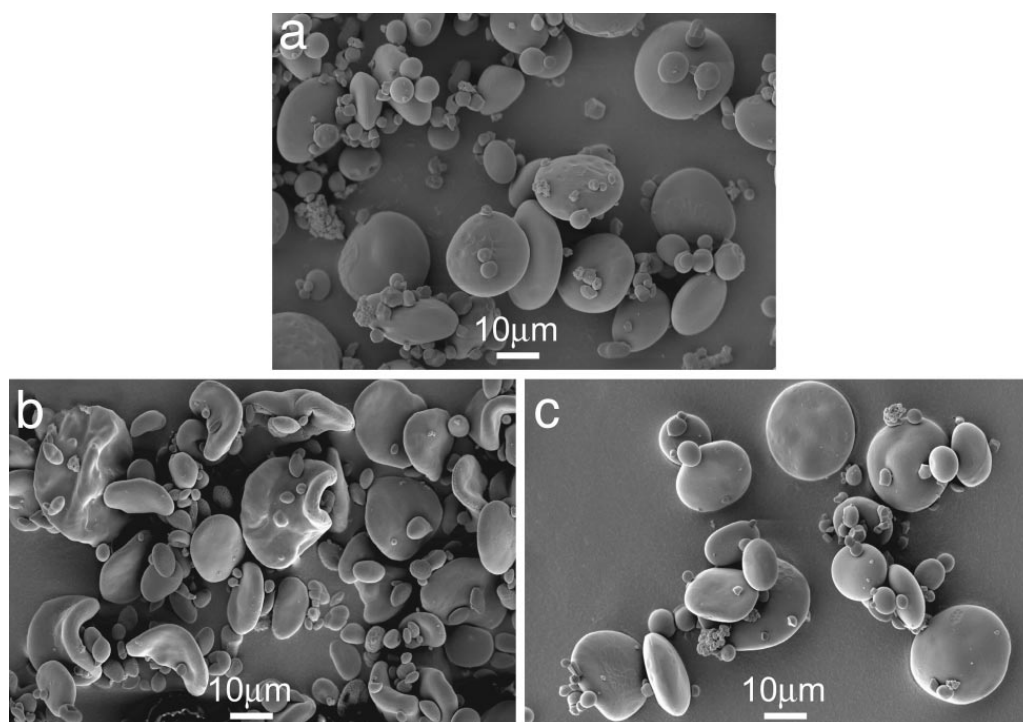


Figura 1.11 Granuli di amido estratti dall'endosperma di frumento tenero *wild type* (a), transgenico in cui il gene *BEIIa* è silenziato (b) e transgenico in cui il gene *BEIIb* è silenziato (c) (da Regina *et al.*, 2006).

Al contrario, la soppressione del gene *BEIIa* porta ad un fenotipo con alto contenuto di amilosio (>70%). Regina *et al.* (2006) hanno osservato che in tutte le piante transgeniche ottenute con la tecnologia dell'RNA *interference* il silenziamento del gene *BEIIa* provoca, anche, la perdita di espressione del gene *BEIIb*. Le analisi dei messaggeri hanno mostrato che l'mRNA dei geni *BEIIa* era fortemente ridotto, mentre l'espressione del gene *BEIIb* non variava, indicando che la soppressione dell'attività di *BEIIb* avviene, probabilmente, attraverso un meccanismo di regolazione post-trascrizionale (Regina *et al.*, 2006).

Concludendo si può affermare che i geni *BEIIa* e *BEIIb* hanno funzioni sovrapposte nella biosintesi dell'amido, differendo soltanto per l'espressione differenziale nei diversi cereali.

1.3.4.7 Gli enzimi di deramificazione

La sintesi dell'amido coinvolge, oltre agli enzimi SS e BE, anche enzimi di deramificazione (DBE). 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 che gli enzimi di deramificazione di tipo isoamilasi sono coinvolte nella sintesi dell'amido è avvenuta grazie all'identificazione del mutante *sugary-1* di mais, ottenuto mediante un approccio di silenziamento con trasposoni (James *et al.*, 1995). Nel fenotipo *sugary-1* la sintesi dell'amilopectina è ridotta e sostituita da un polimero non cristallino altamente ramificato, noto come fitoglicogeno.

La necessità della presenza delle isoamilasi per la sintesi di amido è stata in seguito confermata in un ampio range 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).

Il sequenziamento dell'intero genoma di *Arabidopsis* ha permesso l'identificazione di tre geni di tipo isoamilasi ed uno di tipo pullulanasi, *AtISA1*, *AtISA2*, *AtISA3* e *AtPUI* (Delatte *et al.*, 2005; Wattebled *et al.*, 2005). L'eliminazione genetica della proteina *AtISA1* o *AtISA2* o di entrambi produce linee con basso contenuto di amido, che accumulano fitoglicogeno (Delatte *et al.*, 2005).

Il silenziamento di isoamilasi in patata, ottenuto con la tecnica dell'RNA antisense, hanno permesso di comprendere meglio il 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 preamiliopectina in polimero in grado di cristallizzare sul

granulo di amido nascente poiché le frazioni di amilopectina ed amilosio riscontrate nelle linee transgeniche erano pressoché identiche a quelle del controllo (Bustos *et al.*, 2004).

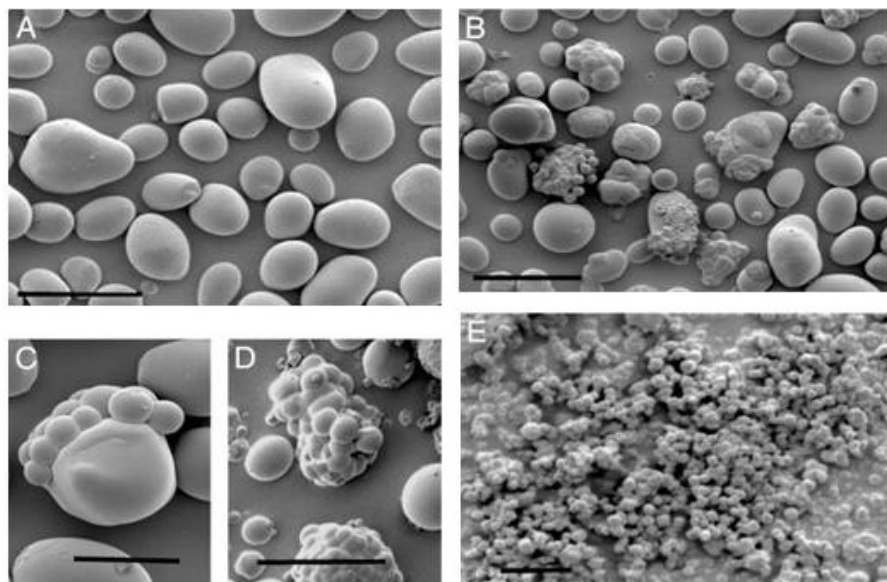


Figura 1.12 Granuli di amido isolati dal controllo (A) e dai tuberi di patata transgenici (B, C, D e E) (da Bustos *et al.*, 2004).

Per esaminare il ruolo dell'isoamilasi 1 (ISA1) nella biosintesi dell'amilopectina è stato introdotto nel mutante di riso *sugary-1* un gene che codifica per un'isoamilasi di frumento. Nelle piante transgeniche ottenute la sintesi di fitoglicogeno è sostituita da quella dell'amido: i livelli di fitoglicogeno residui risultano essere inversamente proporzionali al livello di espressione della proteina eterologa introdotta; anche i livelli di espressione delle pullulanasi e di *BEI*, che nei mutanti *sugary-1* erano ridotti rispetto al *wild type* per effetto pleiotropico, vengono ripristinate; 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; Fig. 1.12).

In frumento geni che codificano per isoamilasi sono stati isolati e descritti (Genschel *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2003), ma non sono stati identificati mutanti in questi geni.

1.3.4.8 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 e b); mentre l'alterazione dell'attività di questo enzima nelle foglie di *Arabidopsis* non ha nessuno 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 che sono, 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, sicuramente, un ruolo nella fosforilazione dell'amido sia in foglia che nel tubero e sembrano far parte del sistema di degradazione dell'amido (Ritte *et al.*, 2002; Mikkelsen *et al.*, 2004).

1.3.5 Regolazione della biosintesi dell'amido

Da ricerche effettuate in queste ultime decadi si è compreso che la sintesi dell'amido è regolata a differenti livelli e che questa regolazione è importante per determinare la quantità e la struttura dell'amido prodotto in un tessuto. I processi regolatori identificati possono essere riassunti in duplicazioni geniche e controllo trascrizionale dell'espressione genica, regolazione allosterica, regolazione redox, fosforilazione e formazione di complessi.

1-) Duplicazioni geniche e controllo trascrizionale dell'espressione genica. Esempi di questo meccanismo di regolazione sono stati visti per le AGPasi (Burton *et al.*, 2002b), GBSS (Vrinten e Nakamura, 2000), SSIIa (Jiang *et al.*, 2004), SSIII (Dian *et al.*, 2005) e BEIIa/BEIIb (Yamanouchi e Nakamura, 1992; Gao *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1998). Nei cereali la duplicazione delle AGPasi sembra essere avvenuta in 2 differenti step; un primo evento ha portato alla generazione delle subunità grandi e piccole, e un secondo evento più recente ha condotto alla formazione dell'isoforme plastidiali e citosoliche.

2-) Regolazione allosterica. Un esempio è la ben nota regolazione dell'AGPasi, che viene inibita dal Pi e attivata dalla 3PGA (3 fosfoglicerato) (Ballicora *et al.*, 2004).

3-) Regolazione redox. L'AGPasi è regolata da meccanismi redox in numerose specie (Fu *et al.*, 1998; Hendriks *et al.*, 2003; Tiessen *et al.*, 2003).

4-) Fosforilazione. Tetlow e colleghi (2004) hanno dimostrato che numerose proteine estratte dagli amiloplasti dell'endosperma di frumento vengono fosforilate. Tra queste proteine troviamo BEI, BEIIa, BEIIb e fosforilasi plastidiali; la defosforilazione di questi enzimi provoca una diminuzione nell'attività enzimatica (Tetlow *et al.*, 2004).

5-) Formazione di complessi. Attraverso esperimenti di immunoprecipitazione è stato dimostrato che all'interno dei granuli di amido di frumento si formano dei complessi enzimatici tra gli enzimi coinvolti nella biosintesi, come quello tra BEI, BEIIb e le amido fosforilasi (Tetlow *et al.*, 2004). Anche le isoamilasi e le AGPasi esistono come proteine eteromultimeriche, suggerendo che l'interazione proteina-proteina svolge un ruolo importante per l'attività enzimatica degli enzimi coinvolti nella sintesi dell'amido.

1.3.6 Proteine legate ai granuli di amido

Schofield e Greenwell (1987) hanno identificato diverse proteine legate ai granuli d'amido e le hanno suddivise in proteine di superficie ed integrali, in base alla temperatura con la quale venivano estratte. Le proteine integrali (SGP) erano solubilizzate riscaldando a 100 °C i granuli d'amido in presenza di un tampone di estrazione contenente SDS. Questa è tuttora la metodica più utilizzata per estrarre tali proteine.

Altri studi, effettuati in seguito, hanno dimostrato che la forma principale di SGP (58-60kDa) è il prodotto dei geni *waxy* (Ainsworth *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1993; Rahman *et al.*, 1995), ovvero le proteine *waxy* (GBSSI), responsabili della sintesi dell'amilosio (Preiss, 1991). Per quanto riguarda le forme a maggior peso molecolare, è stato dimostrato, mediante sequenza amminotermiale, saggi di attività enzimatica e reazione con anticorpi monoclonali, che si tratta di amido sintasi (75, 100 e 105 kDa) e di un enzima di ramificazione (Sgp-2 85 kDa) con alta omologia con la proteina BEIIb di mais (Rahman *et al.*, 1995; Båga *et al.*, 1999).

Yamamori ed Endo (1996) hanno dimostrato che le tre proteine di 100, 108 e 115 kDa (note come Sgp-1) corrispondono alle 3 isoforme SSIIa, codificate da tre geni omeologhi, *SSIIA*, *SSIIB* e *SSIID*. Li *et al.* (1999) hanno osservato che tali proteine sono presenti anche nella frazione solubile nei primi stadi di sviluppo dell'endosperma.

Le proteine da 75 kDa corrispondono invece alle 3 isoforme SSI e sono state chiamate Sgp-3: queste subunità co-migrano e non sono separabile su gel monodimensionali (Yamamori ed Endo, 1996).

Attraverso analisi in SDS-PAGE è possibile visualizzare le proteine legate ai granuli d'amido (Fig. 1.13).

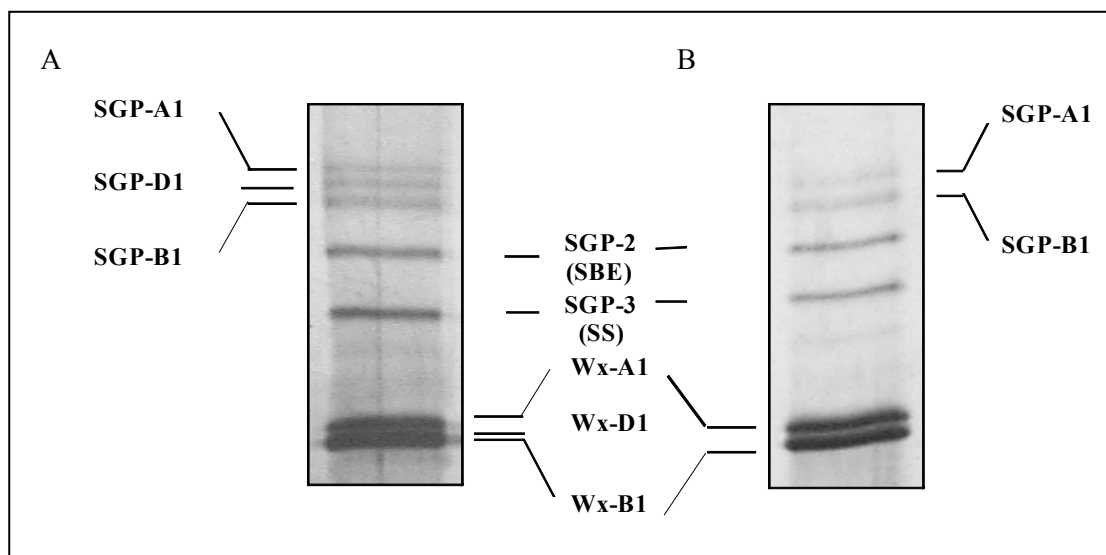


Figura 1.13 SDS-PAGE delle proteine estratte dai granuli d'amido isolate da cariossidi di frumento tenero (A) e duro (B).

1.4 Applicazioni dell'amido

1.4.1 Applicazioni e usi dell'amido nell'industria alimentare

Più della metà dell'amido prodotto viene utilizzato nell'industria alimentare; ciò ha aumentato, negli ultimi anni, l'interesse nei confronti dell'amido e della sua influenza sul prodotto finito. L'uomo assume giornalmente amido mediante la nutrizione, tra i prodotti ricchi in amido troviamo principalmente pane, pasta, dolci, riso, patate, polenta, legumi secchi. In diversi studi è stato evidenziato come la sua composizione sia importante nel determinare la qualità dei prodotti alimentari, soprattutto in merito alle interazioni temperatura-dipendenti dell'amido con l'acqua, durante i processi di trasformazione (Zeng *et al.*, 1997; Yasui *et al.*, 1999).

I legami tra le proprietà dell'amido e la fisiologia gastrointestinale dell'uomo hanno assunto, negli ultimi anni, grande importanza, soprattutto a causa dell'aumento dell'incidenza, in numerosi paesi, di disturbi come il diabete di tipo II e l'obesità. Gli amidi con un alto contenuto di amilosio è stato visto

che rendono più croccanti i prodotti fritti, impediscono la penetrazione degli oli durante la cottura e diminuiscono così il contenuto di grassi. Inoltre, sono spesso utilizzati come addensanti ed agenti gelatinizzanti negli alimenti (Slattery *et al.*, 2000).

D'altra parte è stato anche notato che un maggior contenuto di amilosio nei cibi aumenta la frazione di amido resistente, ovvero di quella parte di amido che non viene digerita. La struttura dell'amido e la sua funzionalità possono influire sulla funzione gastrointestinale in due modi. Per primo sulla percentuale di digestione dal tratto gastrointestinale fino all'intestino tenue, e, in secondo luogo, sulla estensione della digestione nel tratto che va dall'intestino tenue al crasso. La percentuale di digestione influenza la risposta glicemica di un cibo, mentre l'estensione della digestione controlla il contenuto di amido resistente in un cibo.

L'AACC (*American Association of Cereal Chemists*) ha definito fibra alimentare quelle parti della pianta commestibili o carboidrati analoghi che sono resistenti alla digestione ed all'assorbimento nell'intestino tenue e che vengono parzialmente o completamente fermentati nell'intestino crasso. L'amido resistente è, quindi, da un punto di vista nutrizionale, considerato una fibra alimentare (Nugent, 2005). Non potendo essere digerito, esso non verrà assorbito e quindi non potrà essere utilizzato dall'organismo per la produzione di energia; ma avrà, invece, importanti funzioni a livello dell'intestino. Così come tutti i carboidrati non digeribili/assorbibili permette infatti una regolarizzazione della funzione intestinale. L'amido resistente viene fermentato dalla flora microbica intestinale nell'intestino crasso, da questo processo vengono prodotti diossido di carbonio, metano, idrogeno, acidi organici (es. acido lattico) e SCFA (acidi grassi a catena corta). Gli SCFA prodotti includono il butirrato, il propionato e l'acetato, che svolgono ruoli fisiologici importanti per la prevenzione di varie malattie gravi (Topping *et al.*, 2003). In modo particolare è stato dimostrato che l'amido resistente previene malattie come il diabete (migliorando le risposte glicemiche-insuliniche), il cancro al colon, disturbi cardiovascolari (migliorando il profilo lipidico del sangue), l'osteoporosi (favorendo l'assorbimento dei minerali), il colera e la diarrea cronica e l'obesità (avendo un apporto calorico inferiore rispetto agli amidi standard) (Brown, 2004; Champ, 2004) (Tab 1.2).

La maggior parte delle calorie della patata derivano dal suo contenuto di amido, o meglio di amido digeribile. La cottura del tubero determina una trasformazione dell'amido da una forma resistente alla digestione ad una facilmente digeribile. Durante il raffreddamento dei tuberi dopo la cottura si assiste però al processo inverso: l'amido facilmente digeribile viene retrogradato e ritorna in una forma resistente alla digestione.

Gli amidi resistenti, tradizionalmente, sono stati classificati in quattro gruppi: RS1 (amido fisicamente inaccessibile); RS2 (granuli di amido resistenti alla digestione); RS3 (amido retrogradato) e RS4 (amido chimicamente modificato). Negli amidi di mais ad alto contenuto di amilosio è stato riscontrato un alto contenuto di amido resistente di tipo RS2 e RS3 (Brown, 1994; Muir *et al.*, 1995;

Topping *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2000). Oltre ai sopra menzionati fattori strutturali, altri fattori intrinseci possono influenzare la quantità di amido resistente, tra cui la formazione di complessi amilosio-lipidi, la presenza di inibitori delle α -amilasi e di altri polisaccaridi. Tutti questi fattori possono alterare direttamente l'attività enzimatica delle α -amilasi (Englyst *et al.*, 1992).

Tabella 1.2 Effetti fisiologici degli amidi resistenti (modificata da Nugent *et al.*, 2005).

Potenziati effetti fisiologici	Condizioni in cui ci può essere un effetto positivo
migliorare le risposte glicemiche e insuliniche	diabete, metabolismo
migliorare le condizioni dell'intestino	cancro al colon, colite ulcerosa, malattie infiammatorie intestinali
migliorare i lipidi nel sangue	malattie cardiovascolari, metabolismo, metabolismo dei lipidi
aumentare la sazietà e ridurre l'assorbimento di energia	obesità
aumentare l'assorbimento dei micronutrienti	osteoporosi, assorbimento dei minerali
in collegamento con terapie orali di reidratazione	trattamento per la diarrea acuta
interazioni sinergiche con altri componenti della dieta (fibre, proteine, acidi grassi...)	metabolismo, salute dell'intestino
termogenesi	obesità, diabete

Studi effettuati sui ratti hanno dimostrato che l'amido di frumento ad alto contenuto di amilosio (>70%) produce effetti benefici sulla salute (Regina *et al.*, 2006). Anche l'amido prodotto dai mutanti *sgp-1* di frumento, che ha un contenuto di amilosio del 35-40%, contiene livelli di amido resistente significativamente più elevati. Usando metodi di digestione enzimatica per predire i livelli di amido

resistente in vitro, si è notato che i livelli di RS aumentano rispettivamente a 1.6, 2.6 e 3.0% nel pane con sostituzioni del 10, 20 e 50% con farina di linee di frumento *sgp-1* nulli rispetto alle farine standard (Pham Van Hung *et al.*, 2005).

Gli amidi waxy con un alto contenuto di amilopectina possono essere utilizzati nell'industria alimentare per migliorare l'uniformità, la consistenza e la conservabilità di molti prodotti, in particolare di alcuni prodotti da forno e prodotti congelati (Ellis *et al.*, 1998; Fredriksson *et al.*, 1998; Graybosch, 1998; Slattey *et al.*, 2000; Bhattacharya *et al.*, 2002). Studi effettuati da Hayakawa *et al.* (2004) hanno evidenziato che le farine waxy ritardano l'invecchiamento del pane, ma per periodi di conservazione lunghi (più di sei giorni) è stato notato l'effetto contrario. Inoltre Morita *et al.* (2002a; 2002b) hanno osservato che farine waxy al 100% non hanno buone qualità panificatorie; mentre l'incorporazione di farine waxy (<20% del totale) con farine normali produce considerevoli miglioramenti nelle caratteristiche di "shelf-life" degli alimenti prodotti. Ad esempio, dopo un giorno di conservazione, il pane prodotto con queste miscele mantiene un'umidità e una morbidezza migliore di quello ottenuto con farine di frumento tenero normali (Hayakawa *et al.*, 2004).

Alcune linee di frumento (mutanti waxy privi dell'isoforma 4A) con un ridotto contenuto di amilosio permettono di produrre "noodles" (spaghetti orientali prodotti col frumento tenero) di qualità superiore (Yamamori *et al.*, 1992; Miura e Tanii, 1994).

1.4.1.1 Effetto della distribuzione delle dimensioni dei granuli e del contenuto di amilosio sulle proprietà reologiche della farina di frumento duro e sulla qualità di cottura della pasta

Soh *et al.* (2006) hanno dimostrato attraverso studi di ricostituzione della farina che variazioni nella distribuzione dei granuli di tipo A e B e nel contenuto di amilosio influiscono sulla proprietà reologiche della farina e sulla qualità della pasta. In questi studi il contenuto proteico viene mantenuto costante e si va ad alterare il rapporto fra granuli A e B o il contenuto di amilosio.

L'incremento dei granuli B provoca un aumento nell'assorbimento di acqua dovuto alla più alta efficienza dei granuli piccoli nel legare l'acqua rispetto ai granuli A (Chiodelli e Le Meste 2002). Inoltre, Sebecic e Sebecic (1995; 1999) hanno dimostrato che i granuli piccoli ed intermedi aumentano l'estensibilità della farina diminuendo la resistenza all'estensione. Park *et al.* (2005), infine, hanno proposto che i granuli piccoli potrebbero interagire più strettamente con il glutine nella farina, causando un incremento nella resistenza al mixografo. Un incremento dei granuli B al 32-44% (10-15% più alto rispetto al valore riscontrato nel frumento duro) influenza positivamente la qualità della pasta, migliorandone il nervo e riducendone la collosità dopo la cottura (Soh *et al.*, 2006). Vansteelandt e Delcour (1998) hanno trovato che gli stadi iniziali di essiccamento rendono i granuli di

amido, in generale, e i granuli piccoli, in particolare, meno estraibili; questo potrebbe essere dovuto all'incremento dell'inclusione fisica o alle possibili interazioni tra l'amido ed i componenti del glutine. Nella pasta essiccata ad alte temperature (95°C) le proteine possono prontamente coagulare, formando una rete continua che intrappola i granuli di amido e che diminuisce la loro gelatinizzazione e rigonfiamento durante la cottura: ciò incide positivamente sulla qualità della pasta; al contrario con gli amidi essiccati a temperature basse (55°C) si producono spaghetti qualitativamente scadenti (Delcour *et al.*, 2000a; Delcour *et al.*, 2000b). La proprietà di gelatinizzazione dell'amido può essere correlata con il rigonfiamento dei granuli di amido e con la capacità di assorbimento di acqua: Delcour *et al.* (2000a) hanno dimostrato che esiste una correlazione negativa tra il nervo della pasta e l'assorbimento di acqua.

L'importanza dell'amilosio nell'influencare le qualità pastificatorie nelle semole è stato dimostrato, per la prima volta, da Dexter e Matsuo (1979). Recentemente, Soh *et al.* (2006) hanno riportato che farine con un contenuto di amilosio al 32-44% producono pasta con caratteristiche migliori per quanto riguarda il nervo dopo la cottura ed attribuito tale miglioramento ad un minor assorbimento di acqua.

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. Anche il tempo di cottura risulta essere ridotto: ciò potrebbe essere dovuto alla mancanza delle interazioni amilosio-proteine che formano, insieme al glutine, una rete che impedisce agli essudati di fuoriuscire. 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 grano con proprietà ottimali per la produzione di pasta.

Le semole di frumento duro con bassi contenuti di amilosio producono, quindi, pasta con qualità inferiore rispetto ai frumenti duri normali a causa dell'effetto di ammorbidimento, caratteristica che non coincide con le esigenze dei consumatori che preferiscono la pasta cosiddetta "al dente" (Vignaux *et al.*, 2005; Gianibelli *et al.*, 2005).

1.4.2 Applicazioni ed usi dell'amido nell'industrie non alimentari

Gli usi industriali *non-food* dell'amido sono enfatizzati in una delle definizioni dell'amido nello "Shorter Oxford Dictionary": "un costituente della farina usato come un impasto con acqua per produrre tele, fibre tessili e carta" (Ellis *et al.*, 1998).

Oltre ad influenzare le proprietà fisiche di molti alimenti, l'amido viene utilizzato come additivo e materia prima anche dall'industria non alimentare, come ad esempio nelle industrie della carta, tessile, medico-farmaceutica o come substrato per la produzione di adesivi (Tab. 1.3) (Ellis *et al.*, 1998).

Tabella 1.3 Usi industriali dell'amido (Ellis *et al.*, 1998).

Settore	Usi
Alimentare	Agente addensante e modificatore della viscosità in dolciumi, cibi per bambini, maionese, pane, prodotti a base di carne, bevande, ecc.
Agrochimico	Rivestimento per semi, fertilizzante, erogazione di pesticidi
Cartario	Agente legante e di rivestimento nella produzione di carta e cartone
Cosmetico	Cipria e talco
Medico	Pasticche, prodotti sanitari assorbenti
Plastico	Plastica biodegradabile
Tessile	Imbozzimatura, finitura e stampa, resistenza al fuoco di tessuti e filati
Altri usi	Fibre minerali, adesivi, calcestruzzo, trattamento delle acque

Da qualche anno, sta suscitando un grande interesse la possibilità di produrre dall'amido un'ampia gamma di prodotti biodegradabili (buste, materiali per imballaggi) che possono sostituire quelli derivati dal petrolio, riducendo notevolmente l'inquinamento dell'ambiente (Ellis *et al.*, 1998; Slattery *et al.*, 2000).

Le caratteristiche chimico-fisiche degli amidi variano tra specie differenti. Queste differenze non sono solo correlate al rapporto amilosio/amilopectina o alle dimensioni ed alla distribuzione dei granuli, ma dipendono anche da altre componenti che interagiscono con l'amido, come i lipidi, le proteine e i gruppi fosfato. Il legame tra l'amilosio e lipidi varia, ad esempio, la temperatura di gelatinizzazione (Morrison, 1995).

Amidi con medesimo rapporto amilosio/amilopectina, ma con diverse quantità e tipo di lipidi, possono avere caratteristiche fisiche (come, ad esempio, la viscosità) molto divergenti (Ellis *et al.*, 1998).

Come precedentemente accennato, un'altra caratteristica che influenza le proprietà degli amidi è la fosforilazione.

L'amido di patata è fra quelli maggiormente fosforilato, mostra un maggior potere di rigonfiamento e viene principalmente utilizzato per la produzione di carta (Blennow *et al.*, 2003).

Per poter essere impiegato in uno dei settori industriali sopra citati, l'amido estratto deve subire delle modificazioni chimiche o fisiche. Quindi, la possibilità di intervenire direttamente nelle vie biosintetiche per produrre amidi con determinate proprietà e caratteristiche chimico-fisiche offre vantaggi, sia a livello temporale, sia a livello economico-ambientale. Infatti, le modificazioni chimiche producono sostanze tossiche per l'ambiente che hanno un costo di smaltimento elevato, questo problema potrebbe essere facilmente superato avvalendosi delle potenti tecniche di miglioramento genetico, convenzionali e non, oggi disponibili.

1.5 Miglioramento genetico

La selezione ed il miglioramento delle varietà è praticata con successo da centinaia di anni, prima dai contadini nei campi coltivati e, successivamente, a partire dal XX secolo, nei laboratori e nei campi sperimentali dai genetisti.

1.5.1 Miglioramento genetico convenzionale

Generalmente, è possibile distinguere le biotecnologie in convenzionali e non convenzionali (ingegneria genetica).

I metodi convenzionali di miglioramento genetico hanno il limite di non poter prescindere dall'incrocio sessuale seguito da una fase di selezione per le caratteristiche desiderate.

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

I metodi convenzionali oggi impiegati per superare la barriera sessuale comprendono sia le colture in vitro (dove per il miglioramento si usano, ad esempio, la fusione di protoplasti, la variazione somaclonale, l'embriogenesi somatica), sia la mutagenesi (che prevede l'irradiazioni di vaste popolazioni vegetali con raggi X, raggi gamma, neutroni lenti e veloci o mediante trattamenti chimici, per poi selezionare quegli individui che presentano caratteristiche migliori).

1.5.1.1 Tilling (Targeting Induced Local Lesion IN Genome)

Tilling è l'acronimo per Targeting Induced Local Lesions IN Genomes e consiste in una tecnica di genetica inversa che in ambito agrario fornisce al ricercatore piante, o famiglie di piante, mutate ad un gene d'interesse. Originariamente la tecnica del TILLING usava la cromatografia liquida denaturante ad alta prestazione (dHPLC) per individuare mutazioni puntiformi negli eteroduplex generati mediante PCR (usando oligonucleotidi specifici per il gene bersaglio) su pool di DNA estratti da differenti piante mutagenizzate con trattamenti chimici, come soluzioni di EMS (*ethyl methane sulfonate*) (McCallum *et al.*, 2000a; McCallum *et al.*, 2000b).

Colbert *et al.* (2001) hanno messo a punto un metodo più veloce e meno costoso che utilizza digestioni con l'enzima CEL I per identificare polimorfismi in singoli nucleotidi (SNP). I pool di DNA, ottenuti mescolando i DNA (da 2 a 10 campioni) estratti dalle singole piante mutagenizzate, vengono amplificati con oligonucleotidi specifici per il gene di interesse marcati con molecole fluorescenti (gli oligonucleotidi forward e reverse assorbono, rispettivamente, nell'infrarosso a 700 e 800). Gli ampliconi vengono denaturati e lasciati rinaturare lentamente; nel caso in cui è avvenuta una mutazione in una delle piante del pool si formeranno degli eteroduplex che vengono digeriti dall'enzima CEL I. I prodotti digeriti vengono rilevati su gel di acrilamide in condizioni denaturanti attraverso il sistema LI-COR., che è in grado di rilevare i fluorofori (Colbert *et al.*, 2001; Fig. 1.14).

Il principale vantaggio della tecnica TILLING è di poter essere applicata a qualunque specie che sia mutagenizzabile. In specie poliploidi, come il frumento la scelta degli oligonucleotidi è più complicata per la presenza di SNP sui geni omeologhi: quindi, gli oligonucleotidi, oltre ad essere specifici per il gene bersaglio, devono essere specifici anche per il genoma.

Slade *et al.* (2005) hanno effettuato uno screening su due popolazioni mutagenizzate di frumento (una di frumento duro e una di tenero) utilizzando la tecnologia del TILLING e sono riusciti ad isolare, utilizzando 8 coppie di oligonucleotidi genoma-specifici per i geni omeologhi *waxy*, 246 mutazioni puntiformi.

Un altro vantaggio del TILLING è che permette di isolare non solo i mutanti nulli, ma anche varianti alleliche con sostituzioni amminoacidiche: questi studi sono particolarmente adatti per capire la funzione di un determinato enzima o proteina e per individuare siti catalitici o siti di legame per interazioni proteina-proteina, DNA-proteina e, ad esempio, nel caso delle proteine legati ai granuli, i siti di legame di questi enzimi con il granulo di amido.

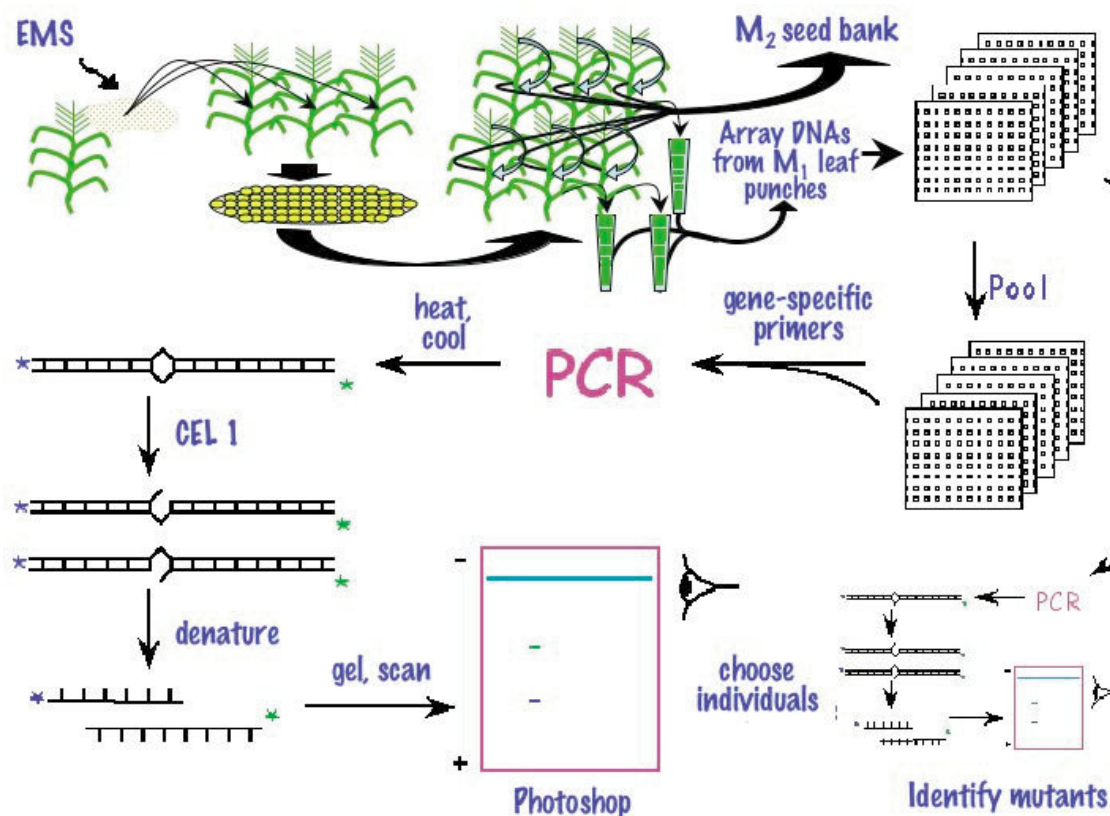


Figura 1.14 Schema del metodo Tilling per identificare mutanti indotti in un gene di interesse (da Till *et al.*, 2004).

1.5.2 Biotecnologie non convenzionali (Ingegneria genetica)

All'inizio degli anni '70 lo sviluppo del DNA ricombinante ha rivoluzionato gli approcci di miglioramento genetico. Il DNA ricombinante è il fulcro dell'ingegneria genetica: consiste in un complesso insieme di tecniche di manipolazione del DNA che consentono di isolare dei brevi segmenti di tale molecola, per moltiplicarli, studiarne la sequenza nucleotidica, trasferirli nel genoma di altre cellule controllandone l'incorporazione e l'espressione.

Lo sviluppo dell'ingegneria genetica costituisce la soluzione scientifica teoricamente ottimale da affiancare al miglioramento genetico classico per superare difficoltà non risolvibili attraverso le metodologie tradizionali. Infatti, questa tecnologia permette l'introduzione o il silenziamento mirato di un singolo carattere utile, ad esempio una resistenza, in una varietà superiore lasciando inalterate tutte le altre caratteristiche della pianta. Va, infatti, ricordato che il miglioramento tradizionale produce

piante che contengono alleli indesiderati oltre al gene di interesse. La maggior parte di questi geni indesiderati possono essere rimossi solo dopo numerosi reincroci con il genotipo parentale. Tuttavia non è possibile rimuoverli tutti e soprattutto non è possibile conoscere quali. La pianta modificata attraverso trasferimento genico diretto, al contrario, contiene lo stesso corredo genico della pianta da migliorare; l'unica differenza è la presenza di un gene in più: dunque esprime le stesse proteine della pianta parentale, eccetto una. Questo aspetto è particolarmente rilevante quando si desidera mantenere la tipicità di varietà locali che sono state selezionate pazientemente nel tempo dall'uomo, sia per caratteristiche qualitative che per capacità di adattamento ad un determinato ambiente.

Le metodologie principali utilizzate per trasferire geni di interesse sono il bombardamento mediante metodo biolistico, la trasformazione con l'*Agrobacterium tumefaciens*, la microiniezione, la trasformazione di protoplasti e l'elettroporazione. Il bombardamento biolistico e l'infezione con *A. tumefaciens* sono le tecniche che oggi si utilizzano per trasformare il frumento.

1.5.2.1 Metodo biolistico

Il bombardamento mediante metodo biolistico fa uso di un processo fisico per realizzare la trasformazione della pianta (Alpeter *et al.*, 2005). Tale approccio consiste nel generare rotture sul genoma con proiettili di oro rivestiti da DNA. I proiettili, penetrando, rilasciano il DNA che si integra nel genoma (Fig. 1.15). I vantaggi di questa tecnica consistono nella possibilità di utilizzare più costrutti per la trasformazione, non ci sono limiti per le dimensioni dei costrutti introdotti, ha una discreta efficienza e si possono inserire più copie del gene di interesse (a volte è uno svantaggio). Gli svantaggi di questa tecnologia sono che è impossibile controllare il sito ed il numero di copie del gene introdotto e che possono avvenire eventi di ricombinazione e riarrangiamenti del DNA esogeno (copie multiple, concatenamenti, frammentazioni del transgene). Un numero elevato di copie dello stesso gene, incorporate nel genoma della stessa cellula, possono portare al fenomeno del silenziamento genico (Danilova, 2007).

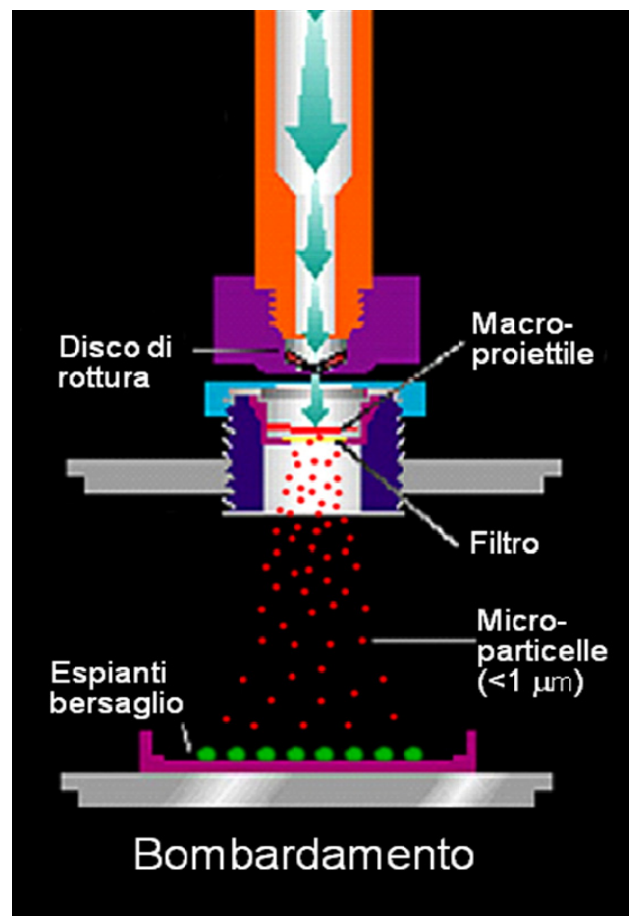


Figura 1.15 Rappresentazione del bombardamento di espianti vegetali.

1.5.2.2 Trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens*

A differenza del trasferimento diretto di DNA estraneo nelle cellule vegetali, la metodologia che utilizza l'*Agrobacterium* è un approccio più naturale per trasferire ed integrare un gene di interesse. Alcuni ceppi virulenti del genere *Agrobacterium*, che comprende, tra l'altro le specie *tumefaciens* e *rhizogenes*, sono in grado di infettare numerose piante dicotiledoni inducendo, in corrispondenza di una lesione, caratteristiche alterazioni morfologiche e differenziative, come la galla del colletto, una masserella di cellule indifferenziate indotta da *A.tumefaciens*, o la sindrome *hairy roots*, indotta da *A.rhizogenes* e caratterizzata dalla proliferazione di radici avventizie nel sito di infezione.

L'*Agrobacterium* è in grado di trasferire una porzione specifica del suo DNA (T-DNA), presente sul plasmide Ti, all'interno del nucleo delle cellule delle piante infettate dove viene stabilmente integrato nel genoma (de la Riva *et al.*, 1998). Il T-DNA contiene due tipi di geni: gli oncogeni, che codificano

per enzimi coinvolti nella sintesi di auxine e citochinine responsabili della formazione del tumore, e quelli per la sintesi delle opine. Queste ultime sono sintetizzate e secrete dalle cellule delle galle e sono consumate dall'*Agrobacterium tumefaciens* come fonte di carbonio e di azoto, conferendo a quest'ultimo un vantaggio sulla popolazione microbica. Il T-DNA, utilizzato per la produzione di piante transgeniche, è stato opportunamente ingegnerizzato in laboratorio, con la rimozione dei geni che sintetizzano gli ormoni e le opine e la sostituzione di questi geni con il transgene (Fig. 1.16). L'applicabilità della trasformazione mediata da *Agrobacterium*, dapprima limitata al tabacco ed a poche altre specie, bersagli naturale dell'infezione, è ora ampliata alla maggior parte delle specie vegetali di interesse agronomico, comprese graminacee e leguminose (Lee *et al.*, 2001). Il vantaggio nell'utilizzo di questa metodologia è che l'*Agrobacterium* inserisce normalmente il gene *target* in singola copia diversamente da quanto accade con il metodo biobalistico.

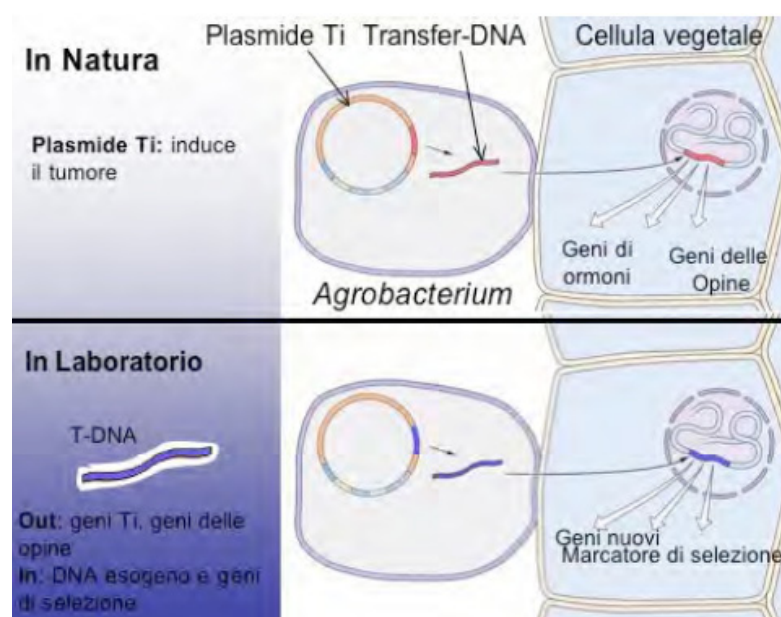


Figura 1.16 Trasformazione con l'*Agrobatterio*: ingegnerizzazione del T-DNA.

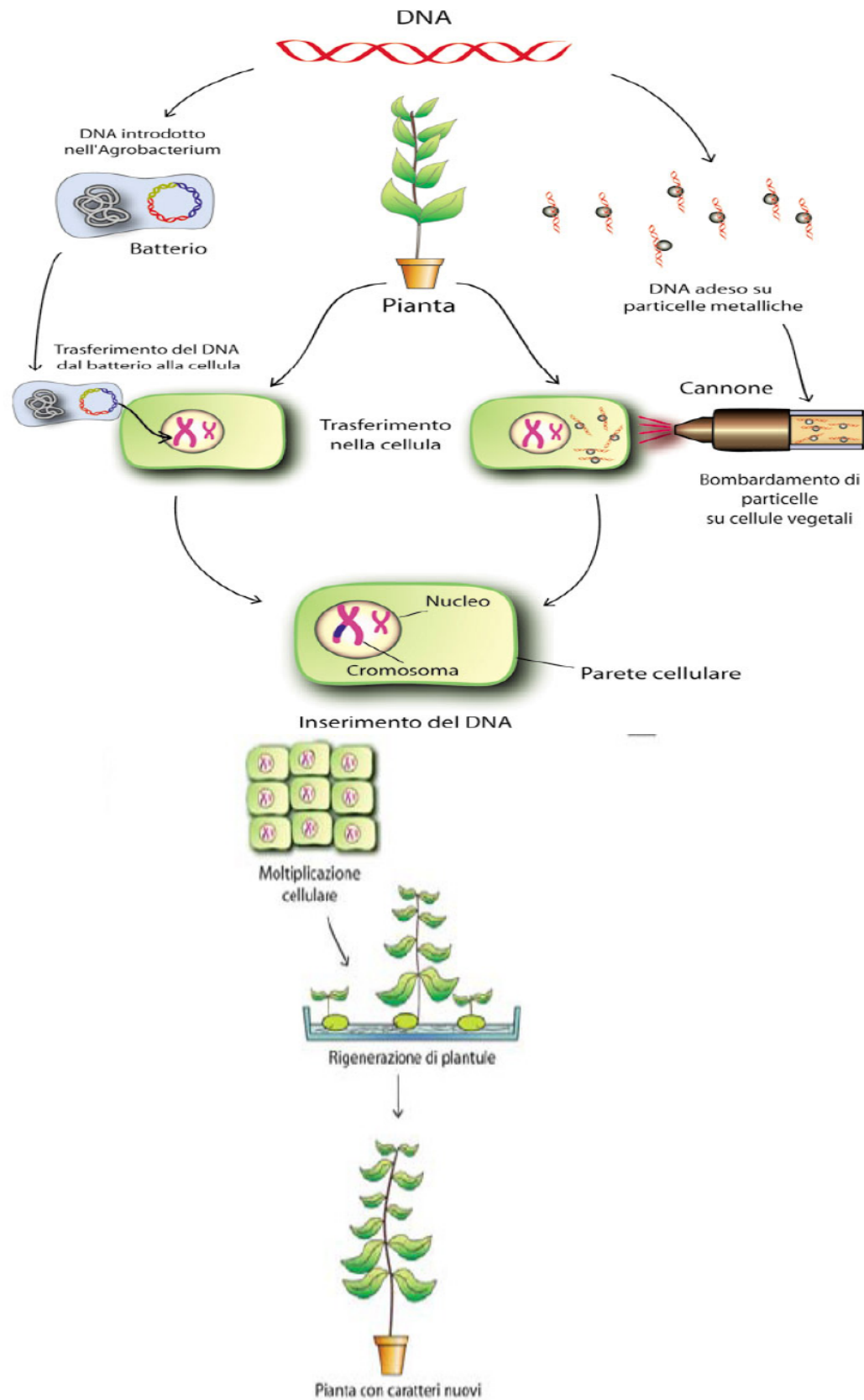


Figura 1.17 Rappresentazione schematica della trasformazione di espianti vegetali mediante Agrobatterio e metodo biolistico.

1.5.2.3 RNA interference (RNAi)

Una delle tecniche maggiormente usate in questi ultimi anni per silenziare in modo efficiente geni di interesse è l'RNA *interference*. Questo approccio è stato oggetto di studio negli ultimi 10 anni ed è un nuovo meccanismo di silenziamento genico naturale, mediato da RNA a doppio filamento (dsRNA). In numerosi organismi, tra cui animali e piante, è stato osservato che l'RNA a doppio filamento è in grado di indurre silenziamento genico specifico. E' stato possibile introdurre dsRNA all'interno della cellula in maniera diretta con l'uso dei transgeni, utilizzando opportuni costrutti. Si tratta di costrutti contenenti una sequenza di un gene *target* ripetuta ed invertita a formare una struttura a forcina, con la presenza di uno spaziatore. Smith *et al.* (2000) hanno dimostrato che costrutti aventi come spaziatore una sequenza riconosciuta come intronica vengono meglio processati ai fini dell'RNAi.

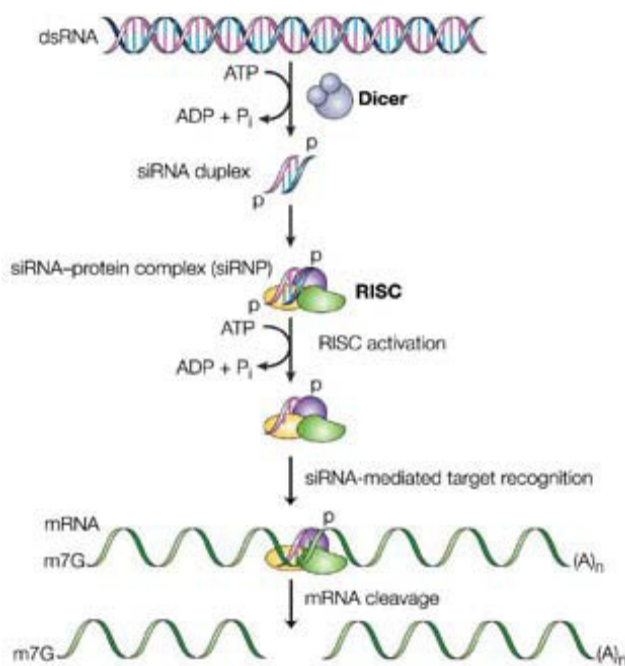


Figura 1.18 Rappresentazione schematica del meccanismo dell'RNAi.

Il modello funzionale dell'RNAi consta di due fasi fondamentali: quella di “iniziazione” e quella “effettrice”. Nella fase iniziale, i dsRNA immessi nella cellula vengono “digeriti” dall'enzima Dicer in corte molecole di RNA a doppio filamento lunghe da 21 a 23 paia di basi e chiamate siRNA (small interfering RNAs). Dicer è una ribonucleasi bidentata appartenente alla super famiglia delle RNAasi III, che riconoscono in modo specifico gli RNA a doppio filamento (dsRNA). Nella fase effettrice, i duplex siRNA si legano ad un complesso nucleasico e formano quello che viene chiamato “RNA-

induced silencing complex": RISC. Dopo tale legame, i siRNA vengono denaturati a RNA a singolo filamento, da una reazione ATP dipendente che è fondamentale per l'attivazione del complesso RISC. Inoltre, è necessaria una fosforilazione al 5' del siRNA duplex perché esso possa incorporarsi in RISC (Nykanen *et al.*, 2001); questa modificazione viene svolta da una chinasi endogena (Schwarz *et al.*, 2002). Il complesso così attivato, usando come stampo il singolo filamento incorporato, va a tagliare filamenti di mRNA complementari allo stesso. Il taglio avviene a circa 12 nucleotidi dal 3' del siRNA antisenso (Fig.1.18).

1.5.3 Stato dell'arte sulle manipolazioni genetiche della composizione dell'amido mediante tecniche convenzionali

Da diversi anni, in seguito alla scoperta che alcune varietà di frumento con un ridotto contenuto di amilosio permettono di produrre "noodles" di qualità superiore (Yamamori *et al.*, 1992; Hideho e Sachiko, 1994; Miura e Tanii, 1994), è cresciuta l'attenzione nei confronti dell'amido e della possibilità di modificarne la composizione con conseguente miglioramento sul prodotto finito. Nel frumento, essendo una specie allopoliploide, non è stato possibile identificare in natura genotipi completamente waxy, ovvero privi di amilosio. Solo da alcuni anni, attraverso screening del germoplasma mondiale dei frumenti mediante tecniche elettroforetiche mono e bidimensionali, è stato possibile individuare alcune linee e varietà prive di una o due isoforme di GBSSI (waxy parziali) e di SGP-1, che sono state utilizzate per produrre genotipi nulli per tutte e tre le isoforme (Nakamura *et al.*, 1995; Yamamori *et al.*, 2000).

I primi studi effettuati in Giappone hanno permesso di individuare due varietà di frumento tenero, Kanto 107 e Kanto 79, con un ridotto contenuto di amilosio (Yamamori *et al.*, 1992), in quanto prive delle proteine Wx-A1 e Wx-B1 (Nakamura *et al.*, 1993).

Analizzando il germoplasma mondiale per individuare varianti alleliche ai loci *waxy*, è stato osservato che alleli nulli al locus *Wx-A1* sono molto comuni in frumenti provenienti dal Giappone, dalla Corea e dalla Turchia, mentre alleli nulli al locus *Wx-B1* sono molto diffusi nei frumenti australiani (Yamamori *et al.*, 1994). Nello stesso studio compiuto su 1960 frumenti provenienti da tutto il mondo è stata trovata una sola cultivar cinese di frumento tenero, BaiHuo, priva della proteina Wx-D1. In seguito, alleli nulli al locus *Wx-D1* sono stati trovati da Boggini *et al.* (2001) in una linea italiana e da Urbano *et al.* (2002) in due linee, una italiana ed una iraniana. Da uno studio condotto da Graybosch *et al.* (1998) su più di 200 varietà di frumento tenero coltivate negli Stati Uniti è risultato che molte di esse hanno alleli nulli al locus *Wx-A1* o al locus *Wx-B1*; una sola cultivar, Ike, è risultata avere alleli nulli ad entrambi i loci. Non è stata

invece trovata alcuna varietà priva della proteina Wx-D1. In questo studio è stato, inoltre, ipotizzato che gli alleli nulli trovati potrebbero essere stati introdotti tra la fine degli anni '50 e l'inizio degli anni '60, da frumenti provenienti dal Giappone, dalla Corea e dall'Australia. Rodriguez-Quijano *et al.* (1998), analizzando 606 frumenti esaploidi comprendenti varietà ed accessioni spagnole e portoghesi, hanno trovato il 4,6% di frumenti nulli per la proteina Wx-A1 e il 17% nulli per la Wx-B1. Nessuno dei frumenti analizzati ha mostrato variabilità per la proteina Wx-D1.

Ricerche simili, anche se in minor numero, sono state condotte su frumenti tetraploidi, nei quali è stato trovato un basso polimorfismo per le proteine waxy. Yamamori *et al.* (1995), analizzando 151 accessioni di frumento duro provenienti da diversi paesi, hanno trovato due forme alleliche per il locus *Wx-A1* e soltanto una per il locus *Wx-B1*; Nieto-Taladriz *et al.* (2000) ne hanno trovate due per il locus *Wx-A1* e quattro per il locus *Wx-B1*; Boggini *et al.* (2001) non hanno identificato alcun polimorfismo tra le varietà di frumento duro coltivate in Italia; Urbano *et al.* (2002) sono riusciti ad isolare tre linee iraniane che presentano un polimorfismo per l'allele *Wx-B1* ed una linea turca priva della proteina Wx-A1.

I primi esperimenti di manipolazione della composizione dell'amido di frumento mediante incrocio tra varietà che presentavano alleli nulli per le proteine waxy, sono stati effettuati da Nakamura *et al.* (1995); i quali hanno prodotto la prima linea di frumento waxy incrociando la cultivar giapponese Kanto 107, priva delle proteine Wx-A1 e Wx-B1, con la cultivar cinese BaiHuo priva della proteina Wx-D1. Tali risultati sono stati riprodotti, usando gli stessi parentali, in altri laboratori in diverse parti del mondo.

Un'altra strategia che è stata adottata per produrre frumenti waxy è la mutagenesi. Yasui *et al.*, (1997) hanno trattato con etilmetansulfonato (EMS) la varietà Kanto 107, già priva delle proteine Wx-A1 e Wx-B1 ed hanno ottenuto una linea nulli anche al locus *Wx-D1*. Kiribuchi-Otobe *et al.* (1997) hanno prodotto linee di frumento waxy partendo da linee doppio aploidi per trasferire rapidamente il carattere waxy da linee mutanti ad una linea con lo stesso corredo genetico di base.

In diversi studi è stata messa in evidenza l'importanza di introdurre il carattere waxy in un corredo genetico ben definito, in quanto sono state osservate differenze nel contenuto di amilosio dovute proprio al diverso corredo genetico (Miura *et al.*, 1999; Yamamori e Quynh, 2000). Recentemente, Miura *et al.* (2002) hanno prodotto linee quasi isogeniche di frumento tenero per i diversi alleli waxy nella cultivar Chinese Spring (CS), partendo da linee di sostituzione di Chinese Spring incrociate con Kanto 107 e Bai Huo ed attraverso la produzione di linee doppio aploidi.

Slade *et al.* (2005) sono riusciti ad identificare 246 mutazioni puntiformi nei geni GBSSI attraverso uno screening su una popolazione mutagenizzata con la tecnologia del TILLING.

Mutanti per differenti isoforme di amido sintasi (SSs) sono stati identificati in diversi cereali; la composizione dell'amido in tutti questi mutanti rivela un relativo incremento nel contenuto di amilosio ed una riduzione nella sintesi di amilopectina. In frumento tenero sono state isolate delle varietà prive di ciascuna isoforma per le Sgp-1. Dall'incrocio delle tre varietà prive di una differente isoforma Sgp-1, Yamamori *et al.* (2000) hanno prodotto una linea di frumento priva delle tre isoforme Sgp-1 (SSII). Tale linea presenta delle alterazioni nella struttura dell'amilopectina, ovvero un incremento nel numero delle catene corte, una diminuzione di quelle di lunghezza intermedia ed un aumento del contenuto di amilosio; mentre il contenuto totale di amido appare di circa il 20% più basso rispetto al frumento normale. Per ultimo, sono state osservate una perdita di cristallinità da parte dei granuli d'amido e deformazioni di quelli di tipo A.

1.5.4 Stato dell'arte sulle manipolazioni genetiche mediante tecniche di trasformazione genetica

Da vari anni sono stati sviluppati diversi metodi per produrre piante di cereali geneticamente modificate. Sebbene siano state prodotti cereali transgenici mediante trasformazione di protoplasti o mediante *Agrobacterium*, la maggior parte vengono correntemente prodotti usando il metodo biolistico, anche la frequenza di piante transgeniche ottenute è piuttosto bassa (0,1-1% per frumento, mais e orzo) ed un'alta percentuale di queste contengono inserzioni multiple (Rahman *et al.*, 2000).

La trasformazione genetica mediante bombardamento di calli di frumento ha permesso di comprendere meglio il ruolo di una classe di enzimi di ramificazione (BEI) (Baga *et al.*, 1999b). Morell *et al.* (2001), utilizzando come sonda la sequenza di un cDNA codificante per un'isoforma BEI di pisello, hanno identificato in una genoteca di cDNA di frumento, una sequenza codificante per una BEI. Questo cDNA è stato utilizzato per produrre piante di frumento transgeniche attraverso la tecnica dell'RNA antisense. Le piante così trasformate hanno mostrato una ridotta attività degli enzimi di ramificazione BEI ed alterazioni nella struttura dell'amido, perdita di cristallinità ed una minore temperatura di gelatinizzazione, dovute a modificazioni della frazione amilopectinica.

In modo analogo Regina *et al.* (2005), usando l'agrobatterio, sono riusciti a silenziare i geni *BEIIa* mediante la tecnica dell'RNA *interference* (RNAi) ottenendo piante transgeniche di frumento tenero con un contenuto di amilosio superiore al 70%.

Un'altro esperimento di trasformazione mediante bombardamento è stato effettuato da Smidansky *et al.* (2002), i quali hanno trasformato piante di frumento con una forma modificata del gene *Shrunken2* di mais, che codifica per una subunità maggiore alterata della AGPasi che non viene inibita dal Pi. Nel mais tale subunità porta alla formazione di un eterotetramero

AGPasico con una sensibilità inferiore all'inibitore allosterico ortofosfato (Pi), ed un'interazione più stabile tra le subunità maggiori e minori aumentandone così l'attività. Nelle piante di frumento transgeniche così prodotte, è stato osservato un aumento del peso dei semi ed un aumento nella biomassa totale delle piante.

FINALITA' DELLA TESI

2 FINALITA' DELLA TESI

Negli ultimi anni l'interesse per l'amido è notevolmente aumentato per i possibili usi in campo alimentare ed industriale. Dal punto di vista nutrizionale l'amido riveste un ruolo fondamentale essendo presente in numerosi prodotti alimentari di uso comune come pasta, pane, noodles, cous cous e biscotti.

Oltre ad essere un componente essenziale di molti alimenti, l'amido riveste un ruolo importante come additivo o materia prima nell'industria tessile, medico-farmaceutica e degli adesivi.

Di notevole interesse per l'ambiente è, poi, l'uso dell'amido per la produzione di polimeri biodegradabili nell'industria della plastica o per la produzione di carta.

Lo sviluppo delle biotecnologie più avanzate hanno fornito nuove conoscenze sulle vie biosintetiche dell'amido ed hanno favorito possibili interventi per ottenere amidi con caratteristiche desiderate. Da numerosi studi è risultato che le proprietà chimico-fisiche e, di conseguenza, gli usi finali dell'amido sono strettamente associati alle quantità relative dei due polimeri che lo compongono, l'amilosio e l'amilopectina. Quindi alterando il rapporto amilosio/amilopectina si possono produrre degli amidi con caratteristiche chimico-fisiche nuove che possono essere impiegati direttamente per usi specifici, senza la necessità di ricorrere a trattamenti chimici.

Attualmente l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sugli amidi ad alto contenuto di amilosio, in quanto i nutrizionisti ritengono che tali amidi hanno un ruolo analogo alla fibre alimentari con effetti benefici sulla salute umana, prevenendo l'insorgenza di malattie tra cui il tumore al colon, l'obesità, il diabete di tipo II e l'osteoporosi.

Inoltre, è stato dimostrato che le semole "high amylose" possono risultare in caratteristiche qualitative migliori. In particolare la pasta mostra un miglior nervo dopo la cottura e va, quindi, incontro alle esigenze dei consumatori che preferiscono la pasta cosiddetta "al dente".

Lo scopo principale di questo lavoro di Tesi è stato l'ottenimento di linee di frumento duro e tenero con un contenuto di amilosio incrementato, utilizzando tecniche tradizionali (breeding di mutanti naturali ed indotti) e tecniche di biologia molecolare come la sovraespressione, il silenziamento genico ed il TILLING.

Un altro obiettivo è stato la caratterizzazione di linee di frumento duro e tenero con basso contenuto di amilosio, valutando l'effetto dei singoli geni waxy sulla sintesi dell'amilosio, sulla composizione e struttura dell'amido e sulle caratteristiche qualitative degli impasti.

MATERIALI E METODI

3 MATERIALI E METODI

3.1 Materiale Vegetale

3.1.1 Linee quasi isogeniche per le proteine waxy in frumento tenero e duro

Il set di mutanti waxy di frumento duro e tenero, caratterizzati in questo lavoro, sono stati ottenuti mediante l'incrocio di mutanti naturali privi delle isoforme waxy con la cultivar di frumento duro Svevo e la linea di frumento tenero N11. La varietà Kanto 107 (Yamamori *et al.*, 1992) presenta alleli nulli ai loci *Wx-A1* e *Wx-B1* mentre Iran 689 è nulla al locus *Wx-D1* (Urbano *et al.*, 2002).

La linea N11 è stata incrociata con la cultivar Kanto 107 e con la linea di frumento tenero iraniana, Iran 689. La progenie F₂ di entrambi gli incroci, che presentava alleli nulli, è stata incrociata a sua volta, per produrre una linea priva delle tre proteine waxy. La linea così prodotta è stata reincrociata per cinque volte con N11.

La varietà Svevo, essendo un frumento duro quindi privo del genoma D, è stata incrociata solo con la varietà Kanto 107. La linea waxy (F₂) derivata da questo incrocio è stata reincrociata quattro volte con Svevo.

3.1.2 Produzione di linee quasi isogeniche per le SGP-1 in frumento tenero e duro

La linea di frumento tenero N11 è stata incrociata con tre varietà di frumento tenero giapponesi, identificate da Yamamori *et al.* (2000), ciascuna priva di un'isoforma di proteine Sgp-1:

Chousen 30 (SGP-A1⁻),

Kanto79 (SGP-B1⁻),

Turkey 116 (SGP-D1⁻).

La varietà Svevo è stata incrociata con Chousen 30 e Kanto 79. Le linee F₂ nulli derivate da ciascun incrocio sono state reincrociate con N11 e Svevo.

Le linee ottenute ed impiegate nel presente lavoro di Tesi non possono considerarsi “quasi isogeniche” poiché il numero di reincroci è ancora basso. Infatti sono stati utilizzati semi BC₂F₄ per le analisi. Le linee verranno ulteriormente reincrociate per realizzare materiale “quasi isogenico”.

3.1.3 Tecnica di incrocio impiegata per la produzione delle linee quasi isogeniche

Il frumento è una pianta con fiori monoclini nei quali normalmente avviene l'autofecondazione. L'esecuzione degli incroci ha richiesto un processo di emasculazione (asportazione delle antere prima della loro maturazione) delle piante utilizzate come genitori femminili, per evitare che il polline autofecondasse gli ovai. Per facilitare l'operazione di emasculazione, la spiga è stata sottoposta alla "toletta" che consiste nell'eliminazione delle spighe della parte basale e di quella apicale perché non hanno fioritura contemporanea a quelle della parte mediana. In seguito sono stati eliminati i fiori centrali delle spighe, lasciando solo i due laterali. Ad ogni fiore sono state tagliate le glumelle alla loro estremità, per facilitare l'asportazione, con le pinzette, delle tre antere contenute in ogni fiore. Terminata l'operazione di emasculazione ogni spiga è stata ricoperta con un sacchetto che permette la traspirazione, per evitare eventuali impollinazioni accidentali. Una volta che gli stigmi sono diventati ricettivi (dopo pochi giorni) sono state introdotte le antere mature provenienti da un'altra pianta, utilizzata come genitore maschile.

3.2 Estrazione acidi nucleici

3.2.1 Estrazione DNA genomico

Il protocollo d'estrazione è basato sul metodo di de Kochko *et al.* (1990). Il DNA genomico è stato isolato da 0.5 g di tessuto vegetale il quale viene ridotto in polvere mediante rottura meccanica in azoto liquido. La polvere viene trasferita in un tubo da centrifuga e mescolata con 15 ml di tampone di estrazione (Tris-HCl 100 mM pH 8.0; EDTA 50 mM pH 8.0; NaCl 500 mM; β -mercaptoetanolo 10mM) ed 1 ml di SDS al 20 %. Il campione viene riscaldato a 65°C per 10 min per consentire la lisi cellulare e, dopo l'aggiunta di 5 ml di acetato di potassio 5 M, viene lasciato in ghiaccio per 20 min in modo che le proteine denature precipitino. I frammenti cellulari e le proteine vengono separati mediante centrifugazione a 20,000 x g per 20 min ad una temperatura di 4°C. Il supernatante viene trasferito in un nuovo tubo da centrifuga al quale vengono aggiunti 10 ml di isopropanolo. Dopo un'incubazione di 30 min a -20°C, il campione viene centrifugato a 20000xg per 15 min. Il precipitato che si ottiene viene lasciato seccare e successivamente risospeso in 700 μ l di TE (Tris.Cl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). A questo punto si procede al trattamento con ribonucleasi A (1 μ g RNAsi per 10 μ g di DNA genomico) per degradare l'RNA. Per separare il DNA purificato dalle proteine, 1/10 di volume di acetato di sodio 3 M pH 5.3 ed un volume di fenolo-cloroformio 1:1 vengono aggiunti al campione che, dopo essere stato ben mescolato, viene centrifugato a 13,000xg per 5 minuti. Dopo la centrifugazione è possibile distinguere nettamente due fasi all'interfaccia delle quali si trovano le

proteine. La fase superiore acquosa, contenente il DNA purificato dalle proteine, viene recuperata e ad essa vengono aggiunti 0.7 volumi di isopropanolo freddo. Il campione viene centrifugato a 13,000xg per 10 min, il supernatante rimosso, il sedimento lavato con 1 ml di etanolo al 75 % e quindi centrifugato a 13,000xg per 5 min. Successivamente il supernatante viene eliminato e il precipitato seccato all'aria e risospeso in 200-500 µl di TE.

3.2.2 Estrazione e purificazione di DNA plasmidico

L'estrazione del DNA plasmidico è stata realizzata con il kit Plasmid Midi Prep (QIAGEN). Le cellule batteriche contenenti il plasmide d'interesse vengono inoculate in 2-5 ml di 2YT (Tryptone 16 g/l, estratto di lievito 10 g/l, NaCl 5 g/l) in presenza dell'opportuno antibiotico di selezione e incubate per una notte a 37°C in continua rotazione (circa 220 rpm). La coltura di partenza viene successivamente diluita in 50 ml di terreno selettivo e lasciata crescere in rotazione a 37°C per 12-16 h. Le cellule vengono centrifugate per 15 min a 6,000 x g ad una temperatura di 4°C. Il supernatante viene rimosso e il precipitato costituito dalle cellule batteriche viene risospeso in 4 ml di un tampone contenente RNAasi agitando vigorosamente per mezzo di un vortex. Si aggiungono quindi 4 ml del tampone per la lisi cellulare, contenente NaOH 200 mM ed SDS (Sodio Dodecil Solfato) 1%, mescolando delicatamente e si lascia per 5 min a temperatura ambiente. Per consentire la precipitazione di proteine, DNA genomico, residui cellulari ed SDS si aggiungono 4 ml di potassio acetato 3 M pH 5.5 pre-raffreddato e il campione viene posto in ghiaccio per 15 min. Per separare il DNA plasmidico dalle proteine precipitate e i residui cellulari, il campione viene centrifugato una prima volta per 30 min a 30,000 x g a 4°C e, una volta recuperato, il supernatante viene nuovamente centrifugato nelle stesse condizioni per 15 min. Nel frattempo si procede ad equilibrare le colonnine contenenti la resina a scambio anionico che tratterrà il plasmide, con un tampone opportuno che scende attraverso le colonnine per forza di gravità. Il supernatante recuperato dalla seconda centrifugazione viene trasferito nella colonnina equilibrata e lasciato penetrare attraverso la resina. Si eseguono quindi due lavaggi con un tampone contenente etanolo. Dopo aver eluito il DNA in 5 ml di tampone di eluizione, si aggiungono 0.7 volumi (3.5 ml) di isopropanolo per consentire la precipitazione del DNA. Una centrifugazione di 30 min a 15,000 x g a 4°C permette la formazione di un precipitato e il supernatante viene eliminato. Il DNA depositato viene lavato con etanolo 70%, il quale consente la rimozione dei sali precipitati e inoltre, essendo più volatile dell'isopropanolo, rende il DNA più facile da ridissolvere. L'etanolo viene eliminato in seguito ad una ulteriore centrifugazione di 10 min a 15,000 x g. Il DNA plasmidico viene seccato sotto vuoto e risospeso in 120 µl di H₂O.

Il protocollo di purificazione è basato su una procedura di lisi alcalina, seguita dal legame del DNA plasmidico ad una resina a scambio anionico sotto appropriate condizioni di sali e pH. Lavaggi

successivi con tamponi a concentrazioni saline crescenti permettono la rimozione di RNA, proteine ed impurità a basso peso molecolare e successivamente l'eluizione del DNA plasmidico. Quest'ultimo è, quindi, precipitato mediante isopropanolo, lavato con etanolo per la rimozione dei sali residui e risospeso in acqua.

3.2.3 Estrazione RNA totale dalle cariossidi

Per isolare l'RNA da cariossidi immature a partire da 100 mg di materiale si è ricorso al protocollo che prevede l'utilizzo del TRIZOL (Gibco).

La distruzione dei tessuti vegetali viene realizzata con l'utilizzo di mortaio e pestello in presenza di azoto liquido. La polvere ottenuta con tale trattamento viene trasferita in un tubo da 2 ml precedentemente raffreddato, e viene 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. Si aggiungono, quindi, 0.5 ml di fenolo/cloroformio/IAA (25:24:1) e si agita con il vortex. Il campione può essere lasciato a temperatura ambiente per un massimo di 20 minuti. Per eliminare gli zuccheri presenti nella cariosside si centrifuga per 5 minuti a 5,000 rpm a 4 °C. Il surnatante (circa 300 µl) viene recuperato, facendo attenzione a non prendere particolati, e posto in una nuova eppendorf. Vengono aggiunti quindi 1 ml di Trizol e 0.4 ml di cloroformio/IAA (24:1) agitando vigorosamente con il vortex. Il campione viene centrifugato a 5,000 rpm per 10 min a 4°C. La fase acquosa risultante viene recuperata e trasferita in un nuovo tubo. Per purificare il campione viene fatto un lavaggio con 1 ml di cloroformio/IAA, seguito da una centrifugazione a 5,000 rpm per 10 minuti a 4 °C. La fase superiore viene trasferita in una nuova provetta facendo attenzione a non toccare con il puntale i particolati. La precipitazione dell'RNA si ottiene aggiungendo 2 volumi di etanolo al 100% e 1/10 del volume di acetato di sodio pH 5.2 seguito da un'incubazione di 30 min a -80°C e successiva centrifugazione a 10,000 rpm per 10 min a 4°C. Il supernatante viene rimosso e si procede al lavaggio del precipitato con 1 ml di etanolo 70%. Una ulteriore centrifugazione a 5,000 rpm per 5 min a 4°C consente al precipitato contenente l'RNA di depositarsi sul fondo del tubo, l'etanolo può quindi essere rimosso. Il precipitato viene lasciato seccare all'aria sottocappa per 5-10 minuti, facendo attenzione ad evitare che si asciughi eccessivamente, e quindi risospeso in 50 µl di H₂O DEPC, aggiungendo 0.1 µl di inibitore di RNasi.

3.3 Metodi separazione acidi nucleici

3.3.1 Elettroforesi su gel di agarosio

L'identificazione e la separazione dei frammenti di DNA è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di agarosio all'0.8% ed all'1.5% in TBE 0.5× (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.

3.3.2 Elettroforesi su gel di agarosio contenente formaldeide

Per verificare l'integrità dell'RNA estratto e uniformare il più possibile i quantitativi da usare nei successivi esperimenti, i campioni di RNA sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di formaldeide. Le corse elettroforetiche sono state effettuate utilizzando gel di formaldeide all'1.2% in tampone di corsa MOPS pH7. I campioni caricati sono stati preparati aggiungendo ad 1µl di RNA 3µl di acqua DEPC e 1µl di Loading Buffer 6x. Dopo bollitura a 65°C per 5 minuti e raffreddamento in ghiaccio per 1 minuto, è stato aggiunto 1 µl di bromuro di etidio (100µg/ml).

3.4 Tecniche di clonaggio

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 o 5-10 ng di DNA plasmidico in un volume finale di 50 µl. La miscela di reazione è costituita da 1X tampone di reazione della Taq Polimerasi contenente MgCl₂ 1.5 M, dNTPs 200 µM, 50-100 pmoli di ogni oligonucleotide, 1U di Taq Polimerasi. Quando non indicato diversamente, le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 1 ciclo iniziale di 5 min a 95°C seguito da 30-35 cicli di denaturazione 1 min a 95°C, annealing 1 min a 55-65°C, estensione 1-2 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 RT-PCR semiquantitativa

Per le reazioni di amplificazione mediante la tecnica di RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) è stato preparato cDNA a singolo filamento a partire da circa 1 µg di RNA totale. Il DNA contaminante è stato rimosso utilizzando 1 µl di DNasi (0.1 U-0.3 U di DNasi I RNasi free) per campione in presenza di 1X tampone di reazione dell'enzima M-MLV (trascrittasi inversa) (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50mM DTT), in un volume totale di 10 µl. Il campione è stato incubato a temperatura ambiente per 15 minuti. Per inattivare la DNasi è stato aggiunto 1 µl di EDTA 25 mM ed è stato scaldato a 65 °C per 5 minuti. Questa miscela è stata utilizzata immediatamente per la trascrizione inversa. A ciascuna reazione sono stati aggiunti 2 µl dell'oligo(dT)/dNTP mix (1 µl oligo d(T)₁₂₋₁₈ 500 µg/ml e 1 µl di dNTPs 10 mM), i campioni sono stati lasciati per altri 5 minuti a 65 °C e poi messi in ghiaccio per 1 minuto. Le provette sono state centrifugate brevemente, sono stati aggiunti 7 µl della RT mix (4 µl di 5X First-Strand Buffer = 250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; 2 µl di DTT 0.1 M, 1 µl di RNasina o RNasiOUT RNasi Inhibitor, 40 U/ µl) e i campioni sono stati incubati a 37 °C per 2 minuti. Dopo aver aggiunto 1 µl (20 U) di M-MLV RT, e mescolato gentilmente con la pipetta, i campioni sono stati incubati a 37 °C per 50 minuti. La reazione di retrotrascrizione è stata inattivata a 70 °C per 15 minuti. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per applicazioni con PCR (Polymerase Chain Reaction). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con 1 µl di cDNA in un volume finale di 30 µl. La miscela di reazione è costituita da 1X tampone di reazione della Taq Polimerasi contenente MgCl₂ 1.5 mM, dNTP mix 200 µM, 50-100 pmoli di ogni oligonucleotide, 1U di Taq Polimerasi (Qiagen). Le condizioni di amplificazione e gli oligonucleotidi utilizzati sono indicati nella tabella 3.1.

Tabella 3.1 Elenco degli oligonucleotidi utilizzati.

Oligonucl.	Seq. nucleotidica	T annealing
Wx-A1 Fw	CAG GAA ACC GCA CCG ATT CG	60 °C
Wx-A1 Rev	CAC CCT CTC GTA CCT GTC AAC	
Wx-B1 Fw	CGA AGC AAC AAA GCC GGA AAG	60 °C
Wx-B1 Rev	TCA CCC TCT CGT ACT CGT CCG	
GAPDH Fw	CAA CGC TAG CTG CAC CAC TAA CT	60 °C
GAPDH Rev	GAC TCC TCC TTG ATA GCA GCC TT	
Wx3F	CTT GCT GCA GGT AGC CAC A	60 °C
Wx1R	CTC CCC ATA CGA GAA CCC T	
XhoWxF	ATA CTC GAG ATG GCG GCT CTG GTC ACG TC	58 °C
XbaWxR	ATA TCT AGA TCA GGG AGC GGC GAC GTT CTC C	
DxPrF	CAT GCA GGC TAC CTT CCA C	60 °C
DxPrR	CGG TGG ACT ATC AGT GAA TTG	
BAR1	CAT CGA GAC AAG CAC GGT CA	60 °C
BAR2	GAA ACC CAC CAC GTC ATG CCA GT	
SalKpnIntF	GTC GAC GGT ACC GCA GAA AAT ATA CGA GAT TG	60 °C
XbaXhoIntrR	ACC TCT AGA CTC GAG CCA CCT TCA TGT TGG TCA ATA G	
SalXbacDNAF	GTC GAC TCT AGA GGC GGG TTG AGT GAG ATC TG	60 °C
KpnXhocDNAR	GGT ACC CTC GAG TCG GTA GTC AAG ATG GCT CC	

3.4.3 Estrazione e purificazione dei frammenti di DNA da gel di agarosio

Il recupero dal gel dei frammenti di interesse viene eseguito utilizzando il Gel Extraction Kit (Qiagen). La bandina viene tagliata dal gel di agarosio, collocata in un tubo da 1.5 ml al quale vengono aggiunti 3 volumi di tampone di solubilizzazione per ogni volume di gel e incubata per 10 min a 50°C per facilitare il dissolvimento del gel, agitando ogni 2-3 minuti. Viene poi aggiunto 1 volume di isopropanolo per ogni volume di gel iniziale e il campione viene posto nella colonnina di affinità per consentire al DNA di legarsi. Il tutto viene centrifugato per 1 minuto a 10,000 x g. Dopo aver

eliminato il tampone eluito dalla colonnina, si procede con il lavaggio della resina con un tampone (PE) contenente etanolo. Si centrifuga per 1 minuto, si elimina il tampone passato attraverso la colonnina e, per fare in modo che tutti i residui di etanolo vengano allontanati dalla membrana su cui aderisce il DNA, si procede ad una ulteriore centrifugazione a vuoto. La colonnina viene collocata su un nuovo tubo e il DNA viene eluito con 30-50 µl di H₂O.

3.4.4 Digestione con enzimi di restrizione e ligazione in un vettore di interesse

Il plasmide di interesse (2 µg) viene digerito in un volume finale scelto in modo che la concentrazione del plasmide sia compresa tra 0.1 e 0.2 µg/µl. La miscela di reazione contiene gli opportuni enzimi di restrizione (10-12 unità) ed il tampone specifico (1/10 del volume finale). Il campione viene lasciato per 2-3 ore alla temperatura ottimale di digestione (che per la maggior parte degli enzimi corrisponde a 37°C) e successivamente viene controllato che la reazione di taglio sia avvenuta correndo il DNA su gel d'agarosio 0.8%. Il tampone usato per la corsa è TBE 0.5X (TBE 10X: Tris 108 g/L, Acido Borico 55 g/L, EDTA 0.02 M pH 8.0). La ligazione dei frammenti di DNA al vettore di clonaggio è stata effettuata a temperatura ambiente per 2-4 h utilizzando 1 unità di T4 DNA ligasi, 1 µl di tampone di reazione 10x e un rapporto molare vettore:inserto di 1:1 in un volume totale di 10 µl.

3.4.5 Determinazione delle sequenze nucleotidiche

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

3.4.6 Preparazione delle cellule competenti per la trasformazione chimica di E. coli.

Cellule di *E. Coli* appartenenti al ceppo batterico DH5α sono state inoculate in 5 ml di 2xYT (Tryptone 16 g/l, estratto di lievito 10 g/l, NaCl 5 g/l) e incubate a 37°C per una notte. Il giorno successivo 0.5 ml della coltura vengono inoculati in 50 ml di 2xYT e fatti crescere in agitazione a 37°C a 260 rpm, fino a che la lettura allo spettrofotometro indica un valore per l'assorbanza misurata a 600 nm compreso tra 0.5 e 0.6. I batteri vengono posti in ghiaccio per 1 ora e successivamente sedimentati mediante centrifugazione a 4,000 rpm per 4 minuti a 4°C. Le cellule vengono risospese in 25 ml di una

soluzione composta da CaCl_2 100 mM, MnCl_2 70 mM, NaOAc 40 mM pH 5.5, precedentemente raffreddata, e poste in ghiaccio per 40-45 minuti. Si procede quindi ad una ulteriore centrifugazione nelle stesse condizioni della precedente, e le cellule sedimentate vengono risospese in una soluzione contenente CaCl_2 100 mM, MnCl_2 70 mM, NaOAc 40 mM pH 5.5 e glicerolo 15%.

Le cellule competenti così ottenute vengono testate per verificare l'efficienza della trasformazione.

3.4.7 Trasformazione delle cellule competenti di *E.coli*

Per la trasformazione, aliquote da 0.1 ml di cellule competenti vengono trasferite sterilmente in tubi di polipropilene tenuti in ghiaccio e vengono aggiunti 5 μl del prodotto di ligazione. Le cellule vengono mantenute in ghiaccio per circa 30 minuti e successivamente sottoposte a shock termico ponendo i tubi per 1 minuto a 42°C. Vengono quindi aggiunti alle cellule 0.9 ml di 2xYT e le cellule vengono poste in agitazione a 37 °C per 50 minuti in modo che si riprendano dal trattamento e possano esprimere il gene di resistenza all'antibiotico selezionante. Infine le cellule vengono piastrate su capsule Petri contenenti LB-agar (Tryptone 10g/L, estratto di lievito 5g/L, NaCl 10g/L più microagar 10 g/L) e l'antibiotico di selezione opportuno (50 mg/L). Le piastre vengono incubate a 37°C per 12 ore.

3.4.8 Preparazione delle cellule competenti per la trasformazione mediante elettroporazione di *A. tumefaciens*

Cellule di *A. tumefaciens* appartenenti al ceppo batterico AGL1 sono state inoculate in 5 ml di LB e incubate a 28°C per una notte. Il giorno successivo 5 ml della coltura sviluppatasi durante la notte sono stati inoculati in 500 ml di LB e incubati in continua agitazione a 260 rpm a 28°C fino a chè il valore di assorbanza a 600 nm misurata con lo spettrofotometro raggiunge un valore compreso tra 0.5 e 0.6. I batteri sono stati posti in ghiaccio per 15 min e successivamente sedimentati mediante centrifugazione a 5,000 rpm per 15 min a 4°C. Le cellule sono state risospese in un litro di H_2O sterile fredda, centrifugate a 5,000 per 8 min a 4 °C e risospese in 250 ml di H_2O sterile fredda. Le cellule sono state quindi centrifugate a 5,000 rpm per 15 min a 4°C e le cellule sedimentate sono state risospese in una soluzione di glicerolo al 15%. Le cellule elettrocompetenti ottenute con questo protocollo possono essere suddivise in aliquote e conservate a -80°C per le successive trasformazioni.

3.4.9 Trasformazione mediante elettroporazione delle cellule elettrocompetenti

Per la trasformazione, aliquote da 40 µl di cellule competenti sono state scongelate in ghiaccio e a queste sono stati aggiunti 0.1 µg di plasmide. Le cellule sono poi incubate in ghiaccio per 5 min e trasferite in una cuvetta da 0.2 cm. L'elettroporazione è stata eseguita a 25 µFarad, 2500 Volts, 200-400 Ohm e 3-6 ms Pulse. Alle cellule trasformate è stato immediatamente aggiunto 1 ml di LB dopodichè le cellule sono state poste in agitazione a 28°C per un'ora in modo che si riprendano dal trattamento e possano esprimere il gene di resistenza all'antibiotico selezionante. Infine le cellule sono state piastrate su capsule Petri contenenti LB-agar (Tryptone 10g/L, estratto di lievito 5g/L, NaCl 10g/L più microagar 10 g/L) e l'antibiotico di selezione opportuno. Le piastre vengono incubate a 28°C fino all'apparizione delle colonie.

3.5 Southern blotting

Il DNA genomico è stato digerito con un eccesso di enzima di restrizione in un volume finale di 50 µl per 4-5 ore a 37°C (7 µg DNA genomico, 20 U di enzima, 5 µl di tampone 10X). I frammenti del DNA digerito sono stati separati su gel 0.8% di agarosio mediante corsa elettroforetica 1V/cm per 16-18 ore. Il metodo utilizzato è stato quello di Southern (Sambrook *et al*, 1989). Dopo essere stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio, ed essere stati fotografati, i frammenti di DNA sono stati trasferiti su filtro di nylon carico positivamente (Roche) secondo le seguenti modalità di seguito riportate.

Il gel è stato posto in agitazione per 60 minuti in una soluzione denaturante contenente NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M. Questa soluzione denatura le molecole di DNA (da doppia a singola elica), rendendole disponibili per l'ibridazione con la sonda. Successivamente il gel è stato posto in agitazione in una soluzione neutralizzante (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1 M pH 8,0) per 60 minuti.

I frammenti di restrizione presenti nel gel così trattato sono stati sottoposti a trasferimento per capillarità utilizzando come tampone di trasferimento l'SSC 10× (NaCl 150 mM; citrato di sodio 15 mM). Alla fine del trasferimento (circa 16 ore) è stata prelevata la membrana che dopo essere stata lavata per 10 minuti con SSC 2×, è stata fatta asciugare all'aria per circa 30 minuti. Il DNA trasferito è stato fissato mediante raggi UV a 150 Joule. In questo modo il filtro è pronto per l'ibridazione con la sonda marcata.

3.5.1 Ibridazioni molecolari

Questi esperimenti consistono di quattro fasi: preibridazione, ibridazione, lavaggio e rilevamento immunologico.

Preibridazione

In questa fase le membrane su cui sono state trasferite le molecole di DNA, sono state saturate in modo da impedire alla sonda di legarsi sul filtro e generare del segnale di fondo (background). La soluzione che è stata utilizzata ha la seguente composizione: SSC 5×; N-Laurilsarcosine 0,1%; SDS 0,2%; Blocking Reagent (Boehringer Mannheim) 0,5%. La membrana è stata tenuta in preibridazione per almeno 3 ore alla temperatura di 65°C.

Ibridazione

La sonda è stata denaturata ponendola a 95°C per 5 minuti e quindi in ghiaccio per 1 minuto. In questo modo si rinaturano solo le sequenze altamente ripetute eventualmente presenti.

La sonda così trattata è stata mescolata ad una soluzione analoga a quella di preibridazione. Il filtro è stato mantenuto in tale soluzione per almeno 6 ore alla temperatura di 65°C per le ibridazioni ad alta stringenza o alla temperatura di 55-50°C per le ibridazioni a medio-bassa stringenza.

Lavaggio

Il filtro è stato lavato due volte con una soluzione contenente SSC 2× e SDS 0,1% per 5 minuti a temperatura ambiente e quindi due volte per 15 minuti alla temperatura di ibridazione con una soluzione contenente SSC 0,1× e SDS 0,1%.

In seguito i filtri sono stati sottoposti a rilevamento immunologico di due tipi: rilevamento colorimetrico e rilevamento per chemiluminescenza.

Entrambi consistono in una serie di passaggi che consentono di evidenziare i frammenti di DNA cui si è legata la sonda.

Rilevamento con metodo colorimetrico

Dopo aver lavato per 5 minuti i filtri con il tampone 1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 150 mM), questi sono stati incubati a temperatura ambiente con il tampone 2 (buffer 1 + Blocking Reagent 0,5%) per 30 minuti. Si è poi proceduto ad aggiungere al tampone 2 l'anticorpo coniugato, alla concentrazione di 150 mU/ml e successivamente alla rimozione dell'anticorpo che non si è legato mediante due risciacqui con il tampone 1 per 15 minuti ed un risciacquo per 3 minuti con il tampone 3 (Tris-HCl 100mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM).

Infine, i filtri sono stati posti al buio in una “soluzione colorante” [tampone 3 + 2,25% di soluzione NBT (nitroblutetrazodio) 75 mg/ml + 1,75% di soluzione di X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate) 50 mg/ml].

I frammenti di DNA che hanno ibridato si sono evidenziati in un tempo che è variato da pochi minuti a qualche ora. La reazione è stata bloccata immergendo i filtri in TE pH 8,0 per circa 10 minuti. Quindi i filtri sono stati fatti asciugare all'aria e sono stati conservati riposti fra due strati di carta bibula.

Rilevamento con metodo chemiluminescenza

Questo tipo di rilevamento differisce rispetto al metodo colorimetrico, oltre che per alcuni tamponi di lavaggio, per il substrato su cui va ad agire la fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo, che non l'X-fosfato, ma il CSPD. Quest'ultimo, subendo una defosforilazione, emette luce che impressiona la lastra fotografica.

I tamponi e le modalità di lavaggio utilizzati sono: 5 minuti di lavaggio con tampone 1 (Acido Maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5; + 0,3% Tween 20 V/V), un secondo lavaggio con tampone 2 (10× blocking solution 1: 10 in Acido Maleico) per 30 minuti e successiva aggiunta dell'anticorpo antiDIG-AP fragment (Roche) utilizzato nel rapporto 1:10000. La rimozione dell'anticorpo è stata fatta con due risciacqui con tampone 1 di 15 minuti ciascuno e con un risciacquo con tampone 3, lo stesso utilizzato nel rilevamento colorimetrico.

Il filtro è stato messo in una busta di nylon, è stato aggiunto 1 ml di CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2 dioxetane-3,2'-(5'chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) phenil phosphate) ed è stato posto 15 minuti a 37°C per favorire la reazione con la fosfatasi alcalina. Infine, il filtro è stato esposto su lastre fotografiche e sviluppato dopo 3 ore e dopo esposizione over night.

3.5.2 Marcatura della sonda

La marcatura del clone è stata effettuata mediante reazioni di polimerizzazione a catena in presenza di digossigenina, secondo la procedura riportata da D'Ovidio e Anderson (1994). 1 µl di DNA (15ng) è stato aggiunto ad una miscela di reazione contenente: 73,5 µl di H₂O; 10 µl di tampone 10×; 10mM dATP, dCTP, dGTP; 1mM dTTP; 0,1 mM DIG-11dUTP-alkali labile (Roche), 100 mM primers DxPrF/DxPrR; 2,5 U di RedTaq Polymerasi (Sigma). L'amplificazione del DNA è stata effettuata alle seguenti condizioni: 94°C per 1 minuto; 55°C per 1 minuti; 72°C per 1 minuti per un totale di 30 cicli. Il DNA amplificato è stato successivamente purificato utilizzando il “gel extraction kit” della Qiagen. L'efficienza della marcatura viene controllata mediante il TEST STRIP (Roche).

3.6 Screening per identificare mutanti indotti mediante la tecnica del TILLING

3.6.1 PCR (Primer Mix e Master Mix)

Gli oligonucleotidi, non marcati e marcati con la fluorescenza (quello *forward* assorbe gli infrarossi a 700 e quello *reverse* a 800), vengono risospesi in TE con una concentrazione finale pari a 100 μ M e conservati al buio. La mix di oligonucleotidi utilizzata per la reazione di PCR è preparata come segue:

6 μ l di oligonucleotide *Forward* fluorescente (100 μ M stock)

4 μ l di oligonucleotide *Forward* non marcato (100 μ M stock)

8 μ l di oligonucleotide *Reverse* fluorescente (100 μ M stock)

2 μ l di oligonucleotide *Reverse* non marcato (100 μ M stock)

La reazione di PCR viene allestita in un volume finale di 10 μ l. La taq utilizzata è la Ex-Taq HotStart Takara (Cambrex biosciences FRRR006A). Le concentrazioni finali dei componenti della PCR master mix sono:

Buffer 0.5X; dNTPS 0.2 mM; oligonucleotidi mix 0.17 μ M; MgCl₂ 1.5 mM.

Per ogni reazione di PCR vengono utilizzati 0.05 μ l di Ex-Taq e 5 ng di DNA genomico (2.5 ng di una linea e 2.5 ng di un'altra linea).

Le condizioni di PCR (altamente stringenti) sono qui sotto riportate:

95 °C 2 min

94 °C 20 s

73 °C 30 s x 8

Decremento 1 °C/cycle

Gradiente a 72 °C @ 0.5 °C/s

72 °C 1 min 30

94 °C 20 s

65 °C 30 s

Gradiente a 72 °C @ 0.5 °C/s X 20

72 °C 1 min 30

72 °C 5 min

Gli oligonucleotidi utilizzati per selezionare i mutanti *Sgp-I* sono riportati nella tabella 3.2.

Tabella 3.2 Coppie di oligonucleotidi genoma-specifici per i geni *Sgp-I*.

Oligonuc.	Sequenza nucleotidica	Amplicone	Riferimento
Sgp-A1 F1	CCT TCG GAC AAG AAG TTG	711 bp	
Sgp-A1 R1	GGA GTC CAG CGT GCT CAG		
Sgp-A1 F2	ATG TTC TCT TCA CCG GCG C	825 bp	
Sgp-A1 R2	CCA CAC ACA GAC ACA CACATA C		
Sgp-A1 F3	GCG TTT ACC CCA CAG AGC	451 bp	Shimbata <i>et al.</i> 2005
Sgp-A1 R3	ACG CGC CAT ACA GCA AGT CAT A		Shimbata <i>et al.</i> 2005
Sgp-A1 F4	ACC AAC TTC TCC CTG AGC AC	800 bp	Chibbar <i>et al.</i> 2005
Sgp-A1 R4	GGA CCA GAT CGA GAT CGG A		Chibbar <i>et al.</i> 2005
Sgp-B1 F1	GGC TCA AAT TTC GTG CCC	715 bp	
Sgp-B1 R1	GCG TGG TTA TCA GCG TTC		
Sgp-B1 F2	ATT TCT TCG GTA CAC CAT TGG CTA	671 bp	Shimbata <i>et al.</i> 2005
Sgp-B1 R2	TGC CGC AGC ATG CC		Shimbata <i>et al.</i> 2005
Sgp-B1 F3	CAT CGT ATC ACG ATC ACC CAC	805 bp	
Sgp-B1 R3	GGA AGC AGA AGC CGA GGG CAC		
Sgp-B1 F4	CTG GGG ACG CTG GAC TC	780 bp	Chibbar <i>et al.</i> 2005
Sgp-B1 R4	GCT ACG GAC CAG ATC GGA A		Chibbar <i>et al.</i> 2005
Sgp-D1 F1	GGG AGC TGA AAT TTT ATT GCT TAT TG	558 bp	Shimbata <i>et al.</i> 2005
Sgp-D1 R1	TCG CGG TGA AGA GAA CAT GG		Shimbata <i>et al.</i> 2005
Sgp-D1 F2	CCG CGA ACC GTA CCA TCT C	798 bp	
Sgp-D1 R2	GAG CAG AGG CCG AGG ACT C		
Sgp-D1 F3	TTT CGA GTC CTC GGC CTC TG	776 bp	
Sgp-D1 R3	TCC TTC TTT GTG AAA TCT GGC		
Sgp-D1 F4	CAC CAA CTT CTC CCT GAG GAC	700 bp	Chibbar <i>et al.</i> 2005
Sgp-D1 R4	GCG CAA TGC AGT TCC AT		Chibbar <i>et al.</i> 2005

3.6.2 Formazione degli eteroduplex, digestione e purificazione

Gli ampliconi ottenuti dalla reazione di PCR vengono denaturati a 99 °C per 10 minuti; i filamenti a singola elica del DNA sono stati rinaturati lentamente diminuendo la temperatura di 0.3 °C ciclo per 99 cicli per favorire la formazione di eteroduplex nel caso in cui nella regione amplificata c'è una mutazione in una delle due linee che costituiscono il pool.

Per la digestione è stato utilizzato l'enzima *CEL I* (Transgenomics, 706020), endonucleasi che riconosce il *mismatch* e taglia in corrispondenza di esso. Lo stock dell'enzima è diluito 1 a 64 con acqua distillata sterile. Ad ogni campione di PCR (10 µl) vengono aggiunti 5 µl di acqua e 1 µl di enzima diluito 1:64 e si incuba a 45 °C per 15 minuti.

La reazione di digestione viene fermata aggiungendo 5 µl di EDTA 0.15 M a ciascun campione.

La purificazione degli ampliconi digeriti viene effettuata caricando i campioni su colonne riempite con sephadex G-50 (Amersham Biosciences 17-0043-02). Le colonne vengono preparate riempiendo una piastra millipore (Multiscreen HTS 96 HV, Millipore, MSHVN4550) con sephadex in polvere e aggiungendo in ciascuna colonna 300 µl di acqua. Si lasciano idratare le colonne per circa 1 h e dopo centrifugazione a 2,000 rpm per 2 minuti si caricano i 21 µl di ciascun campione, a cui si fa seguire centrifugazione per 2 minuti a 2,000 rpm. Si aggiungono 4 µl di loading dye a ciascun campione e si procede alla concentrazione (e denaturazione) del campione utilizzando un forno ad aria alla temperatura di 85 °C fino a quando non rimangono circa 2 µl.

I campioni denaturati (0.8 µl) sono quindi caricati su gel di acrilamide e separati mediante elettroforesi con il sistema di analisi LI-COR 4300 DNA. Questo sistema usa due canali per distinguere le colorazioni IRD700 (primer forward) e IRD800 (primer reverse) del frammento di PCR marcato, rispettivamente, alle estremità 5' e 3'. Nelle linee che hanno una mutazione, oltre all'amplicone atteso, è visibile una banda di dimensioni più piccole sia nell'immagine IRDye700 che in quello IRDye800. La somma del peso molecolare delle 2 bande corrisponde a quello dell'amplicone atteso.

Gli esperimenti riguardanti il TILLING sono stati svolti presso il Centro di Ricerca di Rothamsted (Harpenden, UK) in collaborazione con il Prof. Peter Shewry.

3.7 Produzione di piante transgeniche mediante metodo biolistico

3.7.1 Terreni di coltura

I terreni di coltura sono terreni MS modificati per colture cellulari di frumento (Sears e Deckard, 1982). La preparazione implica l'aggiunta di Sali MS, Maltosio, Thiamina-HCl, L-asparagina, titolazione a pH 5.85 e successivamente aliquotata in bottiglie da 500 ml in cui è stato precedentemente aggiunto il phytagel.

Il terreno viene sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 120 °C, si aggiunge il 2,4 D e viene versato in normali piastre Petri 100 mm x 15 mm, (tranne nel caso del terreno per il bombardamento per il quale le piastre Petri sono 60mm x 15 mm) e lasciato solidificare.

I terreni sono preparati secondo la metodologia e la composizione indicati da Weeks *et al.* 1993 (Tab. 3.3).

Tabella 3.3 Composizione dei terreni di coltura e rigenerazione dei tessuti.

Terreno per il prelievo degli embrioni	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/l; • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt; • L-asparagine 0.15g/l • 0.25% v/v di phytigel • 2,4 D (0.5 mg/ml) 2ml/500 ml
Terreno di recupero	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/ • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt; • L-asparagine 0.15g/l • 0.25% v/v di phytigel • 2,4 D (0.5 mg/ml) 2ml/500 ml
Terreno per il bombardamento	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/l; • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt • L-asparagine 0.15g/l • Sucrose 171.5 g/l • 2,4 D (0.5 mg/ml) 2ml/500 ml
Terreno di rigenerazione	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/l; • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt • L-asparagine 0.15g/l • 2,4 D (0.5 mg/ml) 0.2ml/500 ml • Bialaphos (1 mg/ml) 1.5 ml/500 ml
Terreno di radicazione	• Murashige & Skoog Salt mixture 2.15g/l; • Maltose 20g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 5ml/lt • L-asparagine 0.075g/l • Bialaphos (1 mg/ml) 1.5 ml/500 ml
Terreno per la germinazione precoce	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/l; • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt • L-asparagine 0.15g/l • Bialaphos (1 mg/ml) 1.5 ml/500 ml

3.7.2 Espianti, bombardamento e rigenerazione delle piante

Isolamento degli embrioni

Cariossidi prelevate a 10-18 giorni dopo l'antesi sono state ottenute da piante allevate in campo. Queste cariossidi sono state sterilizzate mediante sonicazione (6 volte per 20 secondi) in etanolo al 70% contenente 50µl/100ml di tween 20. Successivamente sono state sterilizzate in etanolo 70% per 5 minuti, in ipoclorito di sodio al 20% per 15 minuti e risciacquate in acqua sterile tre volte per un minuto.

Gli embrioni immaturi della grandezza di circa 0.5-1 mm sono stati isolati mediante l'uso di stereomicroscopio e posizionati con la parte dello scutello esposta, sul terreno per il prelievo degli embrioni e conservati in cella di incubazione a 23 C al buio per cinque giorni. Gli embrioni immaturi di 0,5-1 mm sono stati individuati come l'espianto che garantisce la più alta frequenza di trasformazione con il minor numero di trasformanti chimerici prodotti.

Preparazione dei microproiettili e bombardamento

Una quantità pari a 30 mg di proiettili d'oro di dimensioni di 0,6 mm vengono pesati in una eppendorf da 1.5 ml (possibilmente siliconate in modo da evitare l'adesione delle particelle d'oro alle pareti), risospesi in 500 µl di etanolo 100% e aliquotati in eppendorf sterili da 35 µl ciascuna.

I microproiettili vengono microcentrifugati alla massima velocità per pochi secondi e l'etanolo viene rimosso. Successivamente i microproiettili vengono risospesi in 200µl di acqua sterile fredda, microcentrifugati nuovamente alla massima velocità per pochi secondi e il supernatante viene scartato. Segue l'aggiunta del DNA plasmidico, nel caso specifico il costrutto pRDPT5+WxB1 o pRDPT5+SBEIIa(RNAi) e il costrutto pUBI::BAR di 5505bp contenente il gene *bar* codificante per la fosfinotricina acetil trasferasi, (PAT) che è in grado di disattivare la fosfinotricina, principio attivo di diversi erbicidi tra cui il bialaphos (Blechl e Anderson, 1996). I due costrutti sono stati utilizzati per co-bombardare calli derivanti da embrioni maturi come descritto nel paragrafo precedente. Il rapporto molecolare tra i due plasmidi deve essere di 3:1 a favore del gene bersaglio. Il quantitativo minimo di plasmide contenente il gene marcatore aggiunto è di 12.5 µg.

Segue l'aggiunta in ordine delle seguenti soluzioni:

Acqua sterile	224.93 µl
CaCl ₂ (2.5M)	250 µl
Spermidina	50 µl

I campioni così preparati vengono messi in agitazione su un vortex a una temperatura di 4°C per 15-20 minuti e successivamente centrifugati per pochi secondi alla massima velocità. Il pellet viene risospeso in 600µl di etanolo 100% centrifugato alla massima velocità per pochi secondi e il supernatante viene

eliminato. L'oro ricoperto dal DNA, così ottenuto, viene risospeso in 36 µl di etanolo 100% e conservato in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo.

Approssimativamente 30-40 calli, derivati da embrioni, vengono trasferiti nel terreno ad alto potenziale osmotico 4 ore prima dell'inizio del bombardamento.

Successivamente 10 µl della soluzione contenente i microproiettili, accuratamente risospesa, viene posta sul disco del macrocarrier. Segue bombardamento come descritto da Weeks *et al.* (1993) utilizzando l'apparato biolistico Dupont biolistic Delivery system (modello PDS-1000). La distanza del macrocarrier e del disco metallico dal tessuto bersaglio è di 13 cm e la resistenza del disco di rottura è 1100 psi.

Immediatamente dopo il bombardamento i calli vengono mantenuti nel terreno per il bombardamento e conservati al buio a 23° C per 24 ore e successivamente trasferiti nel terreno di recupero per quattro settimane con trasferimento in terreno fresco ad intervalli di due settimane. Successivamente i calli vengono trasferiti nel terreno per la rigenerazione, caratterizzato dalla presenza dell'erbicida Bialaphos, dove rimangono per 6 settimane con trasferimento in terreno fresco ad intervalli di due settimane in una camera di crescita e soggette a 16/8 ore di fotoperiodo (43 µE/m²) a 27° C.

In questa fase nuovi germogli vengono emessi dai calli che risultano essere resistenti all'erbicida, solitamente a partire dalla terza settimana.

I germogli differenziati vengono trasferiti in tubi in pirex contenenti il terreno di radicazione, caratterizzato dall'assenza di 2,4 D, dove vengono sottoposti all'ultima fase della selezione e dove rimangono per un periodo variabile tra due-tre settimane.

Circa l'1% dei germogli sarà in grado di formare radici. A questo livello le piantine vengono definite "resistenti" se sono in grado di formare lunghe radici con fitti peli radicali in un terreno contenente Bialaphos.

Le piante suscettibili all'erbicida, e pertanto non contenenti il gene marcatore, iniziano a formare abbozzi radicali ma le radici primarie interrompono la crescita e vengono emessi corti abbozzi di radici secondarie; la lamina fogliare presenta segni di necrosi fogliare e un ridotto vigore già dopo una settimana di coltura nel terreno di radicazione.

Una volta che le piante hanno raggiunto un'espansione della lamina fogliare e delle radici sufficiente, vengono trasferite in vasetti e mantenute in camera di incubazione per l'acclimatamento completamente coperte da un film plastico trasparente per aumentare l'umidità alla temperatura di 23° C e con fotoperiodo di 16 ore per un periodo variabile tra cinque e dieci giorni.

Le piantine, denominate T0 (Trasformanti 0), sono state, successivamente, trapiantate in vasi normali e trasferite in serra.

3.8 Produzione piante transgeniche attraverso trasformazione con l'Agrobatterio

3.8.1 Terreni di coltura

I terreni vengono preparati concentrati 2X e solidificati mescolando con una soluzione di Phytigel (per il terreno di co-coltivazione e di induzione) o agar gel (per il terreno di rigenerazione) concentrata 2X. Nelle tabelle 3.4, 3.5 e 3.6 sono riportati i terreni utilizzati per la trasformazione e per la crescita dell'Agrobatterio.

3.8.2 Preparazione del materiale donatore

Gli embrioni idonei sono stati raccolti nel periodo tra 12-16 DPA.

Le cariossidi presenti sulla parte superiore e inferiore della spiga e quelle secondarie sono state scartate perché troppo piccole. Se le spighe vengono raccolte il giorno prima della trasformazione è consigliabile non rimuovere i semi, ma conservare la spiga con lo stelo immerso in acqua a 4 °C.

I semi vengono sterilizzati in una soluzione di etanolo al 70% (v/v) per un minuto e poi in una soluzione al 10% di detergente per 15 minuti. In seguito vengono effettuati 4-5 lavaggi con acqua sterile.

Gli embrioni di dimensioni comprese tra 0.8-1.5 mm vengono prelevati dalla cariosside in condizioni sterili utilizzando un bisturi ed uno stereoscopio. Durante la selezione l'asse embrionale viene rimosso per evitare una germinazione precoce. Gli embrioni scelti vengono messi su piastre petri da 5-6 cm contenenti terreno di co-coltivazione. Su ogni piastra vengono messi circa 80 embrioni ed è consigliabile preparare una piastra alla volta dato che gli embrioni devono rimanere su questo terreno per un periodo inferiore a 50 minuti.

Tabella 3.4 Terreni di inoculazione, co-coltivazione e di induzione.

	Per 1 Litro pH 5.8		
Componenti	Inoculazione	Co-coltivazione	Induzione
MS Macro salts (x10)	200 ml	200 ml	200 ml
L7 Micro salts (x1000)	2 ml	2 ml	2 ml
FeNaEDTA (x100)	20 ml	20 ml	20 ml
MS Vitamins (x1000)	2 ml	2 ml	2 ml
Inositolo	200 mg	200 mg	200 mg
Glutammina	1 g	1 g	1 g
Caseina idrosilata	200 mg	200 mg	200 mg
MES	3.9 g	3.9 g	3.9 g
Glucosio	20 g	20 g	-
Maltosio	80 g	80 g	80 g
Autoclavare e poi aggiungere			
Piclorame	2 mg	2 mg	2 mg
Acido ascorbico	100 mg	100 mg	100 mg
2,4 D	2 mg	2 mg	0.5 mg
Acetosiringone	200 μ M	200 μ M	-
Timentina	-	-	160 mg

Tabella 3.5 Terreni di rigenerazione.

	Per 1 Litro pH 5.7		
Componenti	R	RDZ	RPPT
L7 macrosalts (x10)	100 ml	100 ml	100 ml
L7 microsals (x1000)	10 ml	10 ml	10 ml
Tiamina-HCl	10 mg	10 mg	10 mg
Pirodoxina-HCl	1 mg	1 mg	1 mg
Acido nicotinico	1 mg	1 mg	1 mg
Ca-pantotenato	1 mg	1 mg	1 mg
Acido ascorbico	1 mg	1 mg	1 mg
FeNaEDTA	10 ml	10 ml	10 ml
Inositolo	200 mg	200 mg	200 mg
Maltosio	30 g	30 g	30 g
Sterilizzare per filtrazione e aggiungere			
2,4 D	-	0.1 mg	-
Zeatina	-	5 mg	-
PPT	-	-	2-4 mg

3.8.3 Preparazione dell'agrobatterio

Il terreno su cui vengono fatti crescere le colonie di Agrobatterio ceppo AGL1 è l'MG/L (Tab. 3.6). Il ceppo AGL1 può essere selezionato con la carbenicillina (200 mg/l), mentre il plasmide pGUB+SBEIIa (RNAi) conferisce la resistenza alla kanamicina (100 mg/l).

Lo stock in glicerolo, contenente l'agrobatterio con all'interno i plasmidi di interesse (pGUB+SBEIIa(RNAi) e pAL156), viene inoculato in 10 ml di MG/L a 27-29 °C in agitazione a 250 rpm per 12-24 h (fino a che l'OD a 600 nm è maggiore di 1). Il numero di inoculi fatti coincide con quello delle piastre da trasformare.

La coltura viene, quindi, centrifugata a 5,000 rpm per 10 minuti e il pellet risospeso in circa 4 ml di terreno di inoculazione con l'aggiunta di acetosiringone che attiva i geni di virulenza. La coltura risospesa viene mantenuta in agitazione fino a quando non viene utilizzata per un massimo di 3 h.

Tabella 3.6 Terreno MG/L.

Per 1 L pH 7	
Componenti	
Mannitolo	5 g
Acido L-glutammico	1 g
KH ₂ PO ₄	250 mg
NaCl	100 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	100 mg
Tryptone	5 g
Estratto di lievito	2.5 g
Autoclavare e poi aggiungere	
Biotina	1 µg

3.8.4 Inoculazione e co-coltivazione

Si versano 4 ml della soluzione di agrobatterio sulla piastra Petri contenente gli embrioni selezionati che si trovano in terreno di co-coltivazione e si aggiungono 0.001-0.002% di Silwet (agente surfattante che rompe la tensione superficiale e facilita l'interazione degli agrobatteri con gli embrioni). Le piastre sono quindi incubate al buio a temperatura ambiente (< 1 h).

Gli embrioni, in seguito, vengono trasferiti su nuove piastre (9 cm di diametro) contenente terreno di co-coltivazione e incubate al buio a 24-25 °C per 3 giorni.

3.8.5 Controllo dell'Agrobatterio, rigenerazione e selezione

Dopo i 3 giorni di co-coltivazione gli embrioni sono trasferiti su piastre contenenti il terreno di induzione dei calli con l'aggiunta di Timentina e incubati a 24-25 °C al buio.

Dopo 3-4 settimane gli embrioni vengono trasferiti al terreno RDZ e incubati a 24-25 °C alla luce.

Dopo 3-4 settimane si trasferiscono i campioni nel terreno selettivo RPPT. Il terreno RPPT viene cambiato ogni 3-4 settimane fino a quando le plantule resistenti non sono pronte per essere trasferite al suolo.

Soluzioni stock:**MS Macrosalts (x10)**

16.5 g/l NH_4NO_3 (Fisher Scientific UK, Leicestershire, UK)

19.0 g/l KNO_3 (Sigma-Aldrich, Dorset, UK)

1.7 g/l KH_2PO_4 (Fisher Scientific UK)

3.7 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific UK)

4.4 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific UK)

Sterilizzare in autoclave e conservare a 4 °C.

MS Vitamins (x1000)

0.1 g/l Tiamina HCl (Sigma-Aldrich)

0.5 g/l Pirodoxina HCl (Sigma-Aldrich)

0.5 g/l Acido nicotinico (Sigma-Aldrich)

Preparare 100 ml alla volta. Sterilizzare filtrando e conservare a 4 °C.

L7 Microsalts (x1000)

15.0 g/l MnSO_4 (Fisher Scientific UK)

5.0 g/l H_3BO_3 (Fisher Scientific UK)

7.5 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific UK)

0.75 g/l KI (Fisher Scientific UK)

0.25 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (VWR International Ltd., Leicestershire, UK)

0.025 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific UK)

0.025 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)

Preparare 100 ml alla volta. Sterilizzare filtrando e conservare a 4 °C.

MS Vitamins/Inositol (x1000)

40.0 g/l Mio-Inositolo (Sigma-Aldrich)

2.0 g/l Tiamina HCl

0.2 g/l Pirodoxina HCl

0.2 g/l Acido nicotinico

0.2 g/l Ca-Pantotenato (Sigma-Aldrich)

0.2 g/l Acido ascorbico (Sigma-Aldrich)

Conservare a -20 °C in aliquote da 10 ml.

Acido 2,4-Diclorofenoacetico (2,4-D) (Sigma-Aldrich)

1 mg/ml in etanolo/acqua (sciogliere la polvere in etanolo e poi portare a volume con acqua).

Sterilizzare filtrando e conservare a -20 °C in aliquote da 1 ml.

Zeatina (Sigma-Aldrich)

10 mg/ml in HCl/acqua (dissolvere la polvere in un piccolo volume di HCl 1M e portare a volume con acqua).

Sterilizzare filtrando e conservare a -20 °C in aliquote da 1 ml.

Piclorame (Sigma-Aldrich)

1mg/ml (100mg piclorame in 100ml di acqua)

Sterilizzare filtrando e conservare a -20 °C in aliquote da 2 ml.

Acido Ascorbico (Sigma-Aldrich)

100mg/ml

Sterilizzare filtrando e conservare a -20 °C in aliquote da 1 ml.

Acetosiringone 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone (Aldrich D12,440-6: MW- 196.20)

50mM (Pesare 100mg Acetosiringone e dissolvere in 10 ml di etanolo al 70%)

Aliquotare e conservare a -20 °C.

Timentina (Duchefa)

300mg/ml

Phytigel (x2) (Sigma-Aldrich)

Preparare 800 ml concentrato 4 g/l, sterilizzare in autoclave e conservare a temperatura ambiente.

Agargel (x2) (Sigma-Aldrich)

Preparare un volume di 400 ml concentrato 10 g/l, sterilizzare in autoclave e conservare a temperatura ambiente.

3.9 Controllo e crescita delle piante transgeniche

Prima di essere messi a germinare i semi sono stati analizzati per verificare la presenza del transgene. Per far questo è stato estratto il DNA da mezza cariossidi e su di esso è stata condotta un'analisi PCR utilizzando gli oligonucleotidi specifici per i costrutti.

Per l'estrazione di DNA da foglia è stata seguita la procedura riportata in D'Ovidio e Porceddu (1996).

Un quantitativo di tessuto pari a circa un cm² di foglia è stato omogenizzato e posto in una eppendorf a cui 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. Trascorso questo tempo il campione è stato centrifugato a 14000 RPM, il sopranatante recuperato è stato trattato con isopropanolo per far precipitare il DNA in esso contenuto. Il pellet di DNA è stato lavato con etanolo al 70%, asciugato sotto vuoto e risospeso in 20 µl di TE.

Un quantitativo di DNA pari a 1 µl è stato utilizzato per allestire le reazioni PCR. Queste reazioni sono state condotte impiegando la miscela di reazione “RedTaq Master Mix” della Sigma utilizzando gli oligonucleotidi specifici per il costrutto di interesse e le seguenti condizioni di amplificazione: 30 cicli composti dai seguenti step, 94°C per 1 minuto, 60°C per 1 minuto, 72°C per 1 minuto, più un ulteriore ciclo a 72°C per 5 minuti.

3.10 Analisi delle proteine legate ai granuli d'amido

3.10.1 Isolamento dei granuli d'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 la farina posta in provette contenenti 1 ml di H₂O. I campioni sono stati lasciati a 4°C per tutta la notte.

Il giorno seguente i campioni di farina sono stati agitati sul vortex, centrifugati per cinque minuti a 13000 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 13000 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 pH 6.8; 2.3% SDS; 1 % ditiotreitolo (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 13000 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 4°C.

3.10.2 Estrazione delle proteine legate ai granuli d'amido

Le proteine sono state estratte aggiungendo ai granuli d'amido (circa 5 mg per campione) 100-120 µl di tampone di estrazione (Tris HCl 62.5 mM pH 6.8; 2.3 % SDS; 10 % saccarosio; 10 % glicerolo; 0.05 % blu di bromofenolo (BPB); 1 % DTT). Successivamente, i campioni sono stati agitati sul vortex, bolliti per circa quattro minuti, raffreddati in ghiaccio e centrifugati a 13000 rpm per dieci minuti. Sono stati poi caricati su gel 50 µl (HOEFER SE 600) o 20 µl (Mini-Protean III) di surnatante.

3.10.3 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS

Le proteine waxy sono state analizzate mediante SDS-PAGE secondo il metodo di Laemmli (1970) modificando il rapporto tra concentrazione di acrilammide e bisacrilammide (30:0.135 invece di 30:0.8) (Zhao e Sharp, 1996), per visualizzare meglio le proteine waxy che hanno un peso molecolare molto simile.

Composizione del "gel di corsa":

T = 10; C = 0.33; Tris-HCl 0.36 M pH 8.8; 0.1% SDS.

$T = 100 \times (\text{g acrilammide} + \text{g bisacrilammide}) / \text{volume della soluzione};$

$C = 100 \times (\text{g bisacrilammide} / \text{g acrilammide} + \text{g bisacrilammide}).$

Composizione del "gel spaziatore":

T = 4.1; C = 2.56; Tris-HCl 0.125 M pH 6.8; 0.1% SDS.

La polimerizzazione dell'acrilammide, sia nel gel di corsa che in quello di carica, è stata indotta con 0.2% N, N, N', N' - tetrametiletilendiamina (TEMED) e 0,1% persolfato di ammonio (APS).

L'elettroforesi è stata eseguita in tampone Tris 0.02 M; glicina 0.2 M; pH 8.8; 0.1 % SDS. Per effettuare l'elettroforesi verticale delle proteine waxy, estratte dal frumento tenero, è stato utilizzato il sistema HOEFER SE 600 (Amersham Biosciences) e, per quelle estratte dal frumento duro, il Mini-Protean III (Bio-Rad). Per il frumento duro è stato possibile utilizzare dei mini-gel in quanto sono presenti solo le proteine Wx-A1 e Wx-B1 che presentano una maggiore differenza di mobilità.

Nel sistema HOEFER SE 600 le lastre per l'elettroforesi misurano 18 cm x 16 cm e il gel ha uno spessore di 0.75 mm; la corsa è stata effettuata a corrente costante (30 mA per gel) per circa quattro ore, controllando la temperatura della camera elettroforetica (9°C). La corsa è stata fermata circa 40 minuti dopo che il colorante è uscito dal fondo del gel.

Nel Mini-Protean III le lastre misurano 10 cm x 7 cm e il gel ha uno spessore di 0.75 mm; la corsa è stata effettuata a voltaggio costante (200 V) per circa un'ora.

L'analisi delle proteine SGP-1 è stata effettuata sempre mediante SDS-PAGE variando solamente il rapporto tra acrilammide e bisacrilammide del gel di corsa: T = 8; C = 0.44.

Le analisi sono state condotte con l'apparato Mini-Protean III, nelle stesse condizioni impiegate per l'analisi delle proteine waxy di frumento duro.

Per la colorazione dei gel è stato utilizzato il metodo che impiega il nitrato d'argento (Silver staining, Bio-Rad).

3.11 Analisi RVA (Rapid Visco Analyser)

La viscosità dell'amido è stata misurata usando il *Rapid Visco Analyser* (RVA) (Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia).

La farina è stata preparata da 10 g di semi di singole piante usando un mulino Cyclotec dotato di un filtro da 0.5 mm. La farina (3.87 g) (14% di umidità) è stata mescolata con 500 µl di soluzione acquosa contenente il 10% di nitrato d'argento (per inibire l' α -amilasi), il tutto è stato portato a volume (25.13 g) con l'aggiunta di acqua MilliQ. Nel *Rapid Visco Analyser* la sospensione è stata sottoposta alle seguenti variazioni di temperatura: due minuti a 50°C, la temperatura è stata aumentata fino a 95°C in sei minuti (dal secondo all'ottavo minuto), mantenuta a 95°C per quattro minuti (dall'ottavo al dodicesimo minuto), portata a 50°C in quattro minuti (dal dodicesimo al sedicesimo minuto) e lasciata a questa temperatura per altri quattro minuti. La durata totale della corsa è di venti minuti.

Le analisi sono state ripetute due volte per ogni campione di farina. I parametri misurati sono picco di viscosità (la massima viscosità dell'impasto caldo), picco minimo (la più bassa viscosità dell'impasto) e viscosità finale. Da questi parametri sono stati calcolati il *breakdown* (picco di viscosità meno il picco minimo) ed il *setback* (viscosità finale meno il picco minimo). Tutti i parametri sono stati espressi in Centipoise (Cp) ($1 \text{ Cp} = 1/12 \text{ RVU}$).

In aggiunta sono stati misurati il tempo in cui viene raggiunto il picco di viscosità e la *pasting temperature* (la temperatura in cui si verifica un aumento della viscosità, dovuto al rigonfiamento dei granuli d'amido).

3.12 Determinazione contenuto d'amilosio

Il contenuto di amilosio è stato determinato mediante il metodo della Concanavalina A (Con A) (Gibson *et al.*, 1997) usando il *kit amylose/amylopectin assay* (Megazyme Inc., Wicklow, Irlanda). Le analisi sono state ripetute due volte per ogni campione.

3.12.1 Preparazione solventi

Il solvente concentrato Con A (pH 6.4, 600mM in acetato) è stato preparato come descritto da Yun e Matheson (1990). Un litro di solvente contiene acetato di sodio anidro (49.2 g), cloruro di sodio (175.5 g), cloruro di calcio diidrato (0.5 g), cloruro di magnesio esaidrato (0.7 g) e cloruro di manganese tetraidrato (0.7 g). Il pH è stato portato a 6.4 con acido acetico glaciale. Al momento dell'uso, il solvente concentrato (30 ml) è stato diluito a 100 ml con acqua distillata e usato per preparare la soluzione Con A (4.0 mg/ml).

L' α -amilasi fungina (500 U, purificato da *Aspergillus oryzae*) e l'amiloglucosidasi (2 ml, 200 U in *p*-nitrofenil β -maltoside o 3300 U in amido solubile a pH 4.5 e 40°C, purificato da *Aspergillus niger*) sono stati forniti dalla Megazyme Int. Irlanda Ltd in soluzione con 2 ml di ammonio solfato.

Il reagente amiloglucosidasi/ α -amilasi è stato preparato diluendo l'intera soluzione in 20 ml di tampone acetato di sodio (100 mM, pH 4.5).

Tutte le determinazioni del glucosio sono state effettuate colorimetricamente con il reagente glucosio-ossidasi/perossidasi/4-amminoantipirina/*p*-acido idrossibenzoico (GOPOD) (Megazyme).

La soluzione standard di glucosio (100 μ g/0.1 ml in 0.2% acido benzoico) fornita con il *kit* della Megazyme è stata usata direttamente.

Inoltre come campione di riferimento è stato usato amido contenente il 70% di amilosio, fornito con il *kit*.

Il tampone di acetato di sodio (100mM, pH 4.5) è stato preparato aggiungendo 5.9 ml di acido acetico glaciale a 900 ml di acqua distillata. La soluzione è stata aggiustata a pH 4.5 con 1 M (4g/100ml) di idrossido di sodio ed infine è stato aggiunto sodio azide (0.2 g), necessario per conservare la soluzione a temperatura ambiente.

3.12.2 Pre-trattamento dell'amido

I campioni di farina (25 mg) sono stati solubilizzati in 1 ml di Dimetilsolfossido (DMSO) mediante agitazione a bassa velocità sul vortex seguita dal riscaldamento in acqua bollente fino a che la farina risulta completamente dispersa. Dopo un minuto, i campioni sono stati agitati ad alta velocità sul vortex ed incubati in un bagnetto con acqua bollente per 15 minuti. Per rimuovere i lipidi, i tubi sono stati agitati vigorosamente con vortex e tenuti a temperatura ambiente per circa 5 minuti; successivamente per precipitare l'amido sono stati aggiunti 6 ml di etanolo 95%. Dopo 15 minuti a temperatura ambiente, il precipitato è stato centrifugato per 5 minuti a 2000g. Il surnatante è stato eliminato ed i tubi sono stati fatti asciugare per 10 minuti su un foglio di carta. Il pellet è stato risospeso in 1 ml di DMSO e i tubi sono stati trasferiti per 15 minuti in acqua bollente e agitati ogni 2

minuti sul vortex. I campioni sono stati diluiti in 2 ml di solvente Con A diluito; successivamente sono stati trasferiti in una beuta da 25 ml e portati a volume con la stessa soluzione (Soluzione 1).

3.12.3 Precipitazione dell'amilopectina e determinazione del contenuto di amilosio

Un'aliquota (1 ml) di Soluzione 1 è stata mescolata con 0.5 ml della soluzione Con A (4 mg/ml) provocando la precipitazione dell'amilopectina. Le provette sono state lasciate a temperatura ambiente per un'ora e poi centrifugate a 20000 g per 10 minuti a 20°C, per rimuovere il precipitato. Ad un'aliquota (1 ml) di surnatante sono stati aggiunti 3 ml di tampone di acetato di sodio per ridurre il pH a circa 5. I campioni sono stati scaldati in acqua bollente per 5 minuti per denaturare la Con A ed equilibrati a 40°C mediante incubazione in acqua per 5 minuti. L'incubazione è continuata per 30 minuti a 40°C dopo aver aggiunto 0.1 ml di reagente amiloglucosidasi/ α -amilasi per idrolizzare enzimaticamente l'amilosio a glucosio. I tubi sono stati centrifugati a 2000g per 5 minuti a temperatura ambiente.

Ad un'aliquota da 1 ml di surnatante sono stati aggiunti 4 ml di reagente GOPOD (12,000U/litro glucosio ossidasi, 650 U/litro perossidasi e 0.4 mM 4-aminoantipirina), necessario per la misurazione colorimetrica del glucosio. I campioni sono stati incubati a 40°C per 20 minuti insieme al reagente bianco (1 ml di tampone acetato di sodio e 4 ml di reagente GOPOD) ed al glucosio di controllo preparato con 0.15 ml di soluzione glucosio standard (1 mg/ml), 0.9 ml di tampone sodio acetato e 4 ml del reagente GOPOD.

L'assorbanza dei campioni e del controllo è stata determinata rispetto al reagente bianco a 510 nm. Nelle condizioni del saggio, il glucosio standard presenta un'assorbanza a 510 nm di 1.003 ± 0.017 .

3.12.4 Determinazione dell'amido totale

Alla Soluzione 1 (1 ml) sono stati aggiunti 4 ml di tampone sodio acetato (100 mM, pH 4.5) e 0.1 ml di reagente amiloglucosidasi/ α -amilasi, per idrolizzare l'amido totale a glucosio. I tubi sono stati incubati per 10 minuti a 40°C. Un'aliquota (1 ml) di questa soluzione (in duplicato) è stata mescolata con 4 ml di reagente GOPOD e incubata a 40°C per 20 minuti.

L'assorbanza a 510 nm è stata determinata come descritto precedentemente.

3.5.5 Calcolo del contenuto di amilosio

Il contenuto d'amilosio è misurato come rapporto, espresso in percentuale, del glucosio derivato dal supernatante dopo il trattamento con Con A e il glucosio derivato dalla soluzione di amido totale.

$$\% \text{ Amilosio} = \frac{A_{510} \text{ surnatante Con A} \times 6.15}{A_{510} \text{ amido totale} \times 9.2} \times 100$$

Dove 6.15 e 9.2 sono i fattori di diluizione, rispettivamente, per la Con A e per l'amido totale.

RISULTATI E DISCUSSIONE

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Produzione di linee di frumento a basso contenuto di amilosio

Al fine di ridurre il contenuto di amilosio nell'amido di riserva, alleli nulli per le proteine waxy, precedentemente identificati (Yamamori *et al.*, 1992; Urbano *et al.*, 2002), sono stati inseriti nella cultivar di frumento duro Svevo e nella linea di frumento tenero N11. La cultivar Svevo è stata scelta poiché è ampiamente utilizzata in Italia per la produzione di pasta, grazie alla sua alta produttività associata ad ottime prestazioni qualitative. Per quanto riguarda la linea N11 è stata scelta poiché, oltre alle ottime caratteristiche qualitative e di produttività, sono disponibili numerose linee quasi isogeniche che variano nella composizione delle proteine di riserva, che permetteranno, in futuro, la valutazione dell'interazione tra componenti dell'amido e proteine del glutine.

La selezione delle linee quasi isogeniche è stata effettuata analizzando, tramite SDS-PAGE, le proteine waxy estratte dai granuli d'amido, isolati da mezza cariosside.

La linea di frumento tenero N11 e la cultivar di frumento duro Svevo sono state incrociate con la cultivar giapponese di frumento tenero Kanto 107 (Yamamori *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1993), che presenta alleli nulli ai loci *Wx-A1* e *Wx-B1*. La linea N11 è stata, inoltre, incrociata con la linea di frumento tenero iraniana, Iran 689, priva della proteina codificata dal gene *Wx-D1* (Urbano *et al.*, 2002).

Gli incroci effettuati sono schematizzati nelle figure 4.1 e 4.2.

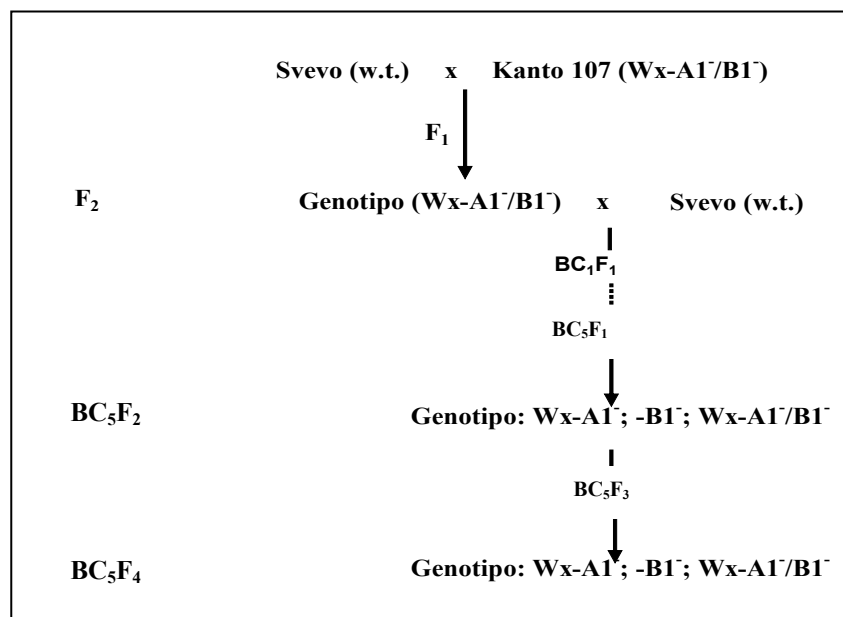


Figura 4.1 Schema degli incroci effettuati per la produzione di linee quasi isogeniche per le proteine waxy in frumento duro.

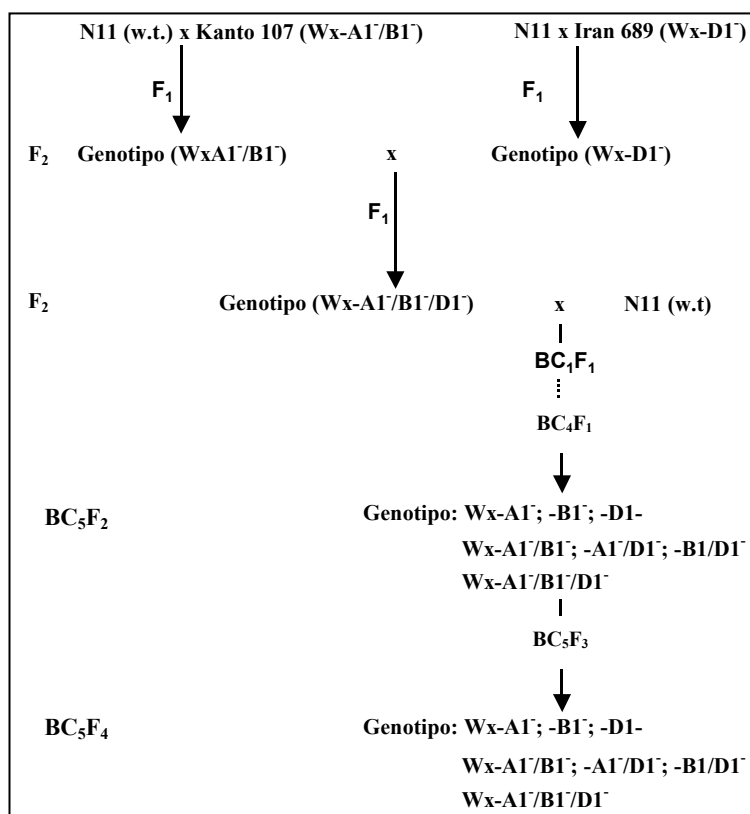


Figura 4.2 Schema degli incroci effettuati per la produzione di linee quasi isogeniche per le proteine waxy in frumento tenero.

Questa serie di incroci ha portato alla produzione di due set di linee waxy, una in frumento tenero e l'altra in frumento duro, con tutte le combinazioni possibili. Per quanto riguarda il frumento tenero N11, ad esempio, sono stati ottenuti i tre genotipi mutanti singolo nulli (privi rispettivamente dei geni *Wx-A1*, *-B1* e *-D1*), i tre genotipi doppio nulli (*Wx-A1⁻B1⁻*, *Wx-A1⁻D1⁻* e *Wx-B1⁻D1⁻*) ed il genotipo *Waxy* (triplo nulli).

Il set di mutanti *waxy* del frumento duro Svevo è composto, invece, dai due genotipi singolo nulli (privi rispettivamente dei geni *Wx-A1* e *Wx-B1*) e dal genotipo *Waxy* (doppio nulli) (Fig. 4.3 e Fig. 4.4).

Il carattere *waxy* è riconoscibile anche fenotipicamente, soprattutto in frumento duro, per l'aspetto ceroso della cariosside (Fig. 4.5).

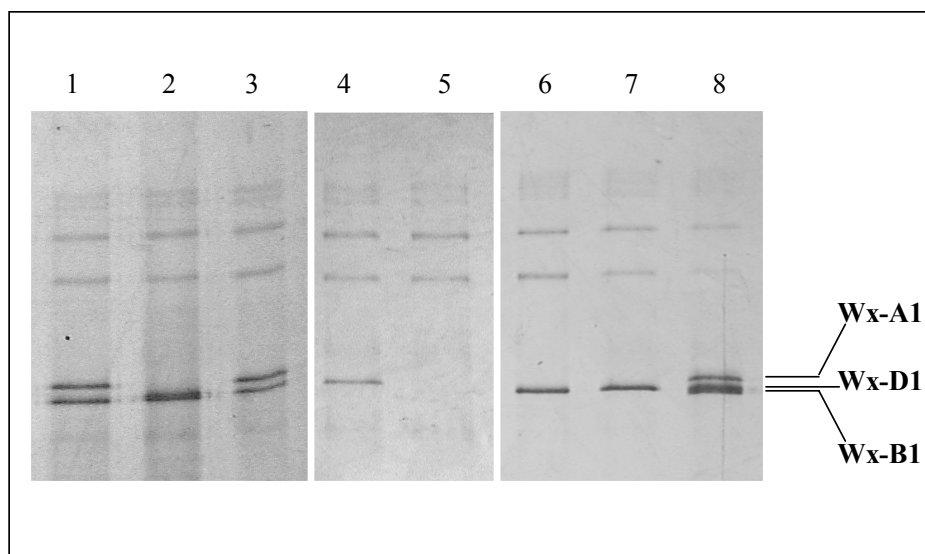


Figura 4.3 Fenotipo elettroforetico delle proteine waxy estratte dai granuli d'amido delle linee di frumento tenero. 1) Genotipo *Wx-D1*⁻, 2) Genotipo *Wx-A1*⁻, 3) Genotipo *Wx-B1*⁻, 4) Genotipo *Wx-B1/D1*⁻, 5) Genotipo *Wx-A1/B1/D1*⁻, 6) Genotipo *Wx-A1/D1*⁻, 7) Genotipo *Wx-A1/B1*⁻, 8) Linea N11, genotipo normale.

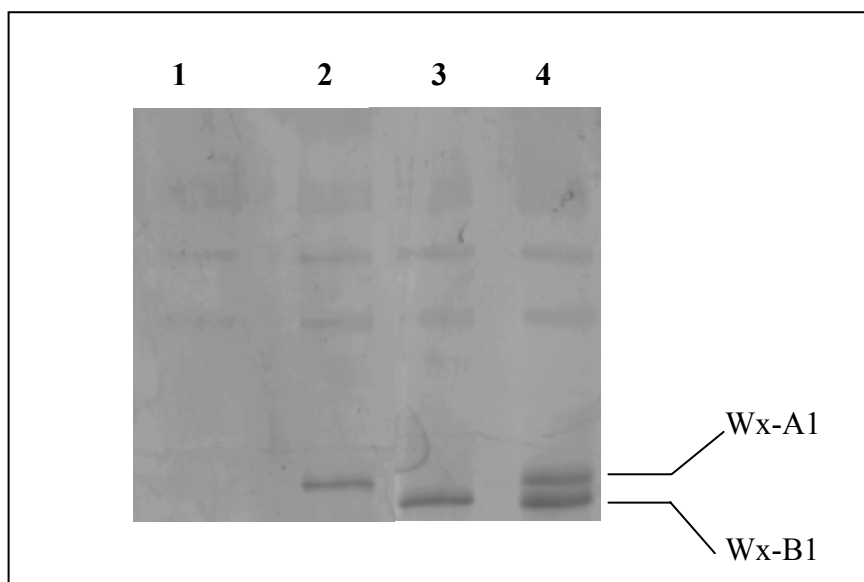


Figura 4.4 Fenotipo elettroforetico delle proteine waxy estratte dai granuli d'amido delle linee di frumento duro. 1) Genotipo *Wx-A1/B1*⁻, 2) Genotipo *Wx-B1*⁻, 3) Genotipo *Wx-A1*⁻, 4) Cultivar Svevo, genotipo normale.



Figura 4.5 Confronto fenotipico tra cariossidi di frumento con genotipo normale e genotipo waxy.

4.1.1 Determinazione del contenuto di amilosio in linee quasi isogeniche per le proteine waxy di frumento duro e tenero

Per valutare l'influenza dei singoli alleli waxy il contenuto di amilosio è stato determinato nei due set completi di mutanti *waxy* di frumento tenero e di frumento duro (Tab. 4.1 e 4.2).

Il contenuto di amilosio nel genotipo N11 è di circa il 26%, mentre nel genotipo *Waxy* totale è stato riscontrato un drastico crollo nella percentuale di amilosio (-95.31%). Il contenuto di amilosio degli altri sei genotipi nulli parziali è distribuito fra questi due estremi. Tra i campioni con gli alleli singoli nulli, il *Wx-B1* ha 2.7 punti percentuali di amilosio in meno rispetto a N11 con una diminuzione del 10.5%, mentre i genotipi privi della proteina *Wx-A1* (23.2%) e *Wx-D1* (24.2%) mostrano una flessione più lieve nel contenuto di amilosio, rispettivamente del 9.37 e del 5.46%. Le linee doppio nulli presentano una riduzione massima di 5.4 punti percentuali rispetto al genotipo N11 con un calo del 21%. Il genotipo doppio nulli privo degli alleli *Wx-B1* e *Wx-D1* è quello che ha meno amilosio nell'endosperma (20.2%) se paragonato ai genotipi *Wx-A1/D1* (21.7%) e *Wx-A1/B1* (22.7%).

Tabella 4.1 Contenuto d'amilosio dei genotipi waxy di frumento tenero.

Genotipo	Wx-A1 ⁻	Wx-B1 ⁻	Wx-D1 ⁻	Wx-A1 ⁻ /B1 ⁻	Wx-A1 ⁻ /D1 ⁻	Wx-B1 ⁻ /D1 ⁻	N11 w.t.	N11 wx
Contenuto amilosio (%)	23.2	22.9	24.2	22.7	21.2	20.2	25.6	1.2

Tabella 4.2 Contenuto d'amilosio dei genotipi waxy di frumento duro.

Genotipo	Wx-A1 ⁻	Wx-B1 ⁻	Svevo w.t.	Svevo Wx
Contenuto amilosio (%)	26.4	22.2	29	1.5

Nel frumento duro il genotipo *Waxy* mostra un drastico crollo nel contenuto di amilosio (-94.3%) se paragonato a Svevo (Tab. 4.2). L'assenza della proteina Wx-B1 causa una maggiore riduzione nel contenuto d'amilosio rispetto alla mancanza della proteina Wx-A1. Infatti, il campione *Wx-B1⁻* sintetizza il 22.2% di amilosio con circa 7 punti percentuali in meno del genotipo Svevo (-23.44%), mentre il genotipo *Wx-A1⁻* ne produce il 26.4% con una diminuzione pari al 8.96%.

Dai dati sul contenuto di amilosio risulta che il gene *Wx-B1* è predominante nella sintesi di amilosio, poiché la sua assenza provoca una diminuzione maggiore nella percentuale di amilosio sia in frumento duro che tenero.

4.1.2 Caratterizzazione del set di linee waxy di frumento duro

Nelle linee waxy parziali di frumento duro e tenero è stato riscontrato una modesta riduzione del contenuto di amilosio rispetto ai genotipi *Waxy* totali. Questo ci ha lasciato ipotizzare che possa esistere un meccanismo di compensazione nei mutanti parziali, ovvero la presenza di una o più isoforme attive compensa l'assenza delle altre isoforme. Al fine di verificare questa ipotesi, sono state effettuate analisi di RT-PCR semiquantitativa sui messaggeri estratti dalle cariossidi a differenti stadi di sviluppo del set di mutanti parziali waxy di frumento duro cv. Svevo; come *house keeper* (controllo) per quantificare il cDNA è stata scelta la Gliceraldeide-Fosfo-Deidrogenasi, che è espressa in modo

costitutivo nei semi, utilizzando una coppia di oligonucleotidi specifica (GAPDH Fw e GAPDH Rev); inoltre sono state utilizzate due coppie di oligonucleotidi specifiche, rispettivamente, per il gene *Wx-A1* (Wx-A1Fw e Wx-A1Rev) e *Wx-B1* (Wx-B1Fw e Wx-B1 Rev) (Fig. 4.6). Le due coppie di oligonucleotidi sono state disegnate allineando i geni *Wx-A1* (n° accessione AB019622) e *Wx-B1* (n° accessione AB019623) presenti in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dato che la regione codificante dei due geni risulta essere particolarmente conservata con una similitudine del 95.05%, gli oligonucleotidi sono stati disegnati su sequenze che differiscono per uno o pochi nucleotidi.

Da questa analisi risulta che nel mutante singolo nulli *Wx-B1*, l'espressione del gene funzionale *Wx-A1* è incrementata a 14, 21 e 28 dpa (giorni post-antesi) rispetto a Svevo.

Anche nel mutante singolo nulli *Wx-A1* il numero di messaggeri del gene funzionale *Wx-B1* è aumentato rispetto a Svevo a 14 e 21 dpa (Fig. 4.6).



Figura 4.6 RT-PCR semiquantitativa sul set di mutanti parziali waxy estratti da cariossidi a differenti stadi di maturazione. Sv= Svevo, dpa= day post anthesis, Wx= waxy, GAPDH= gliceraldeide-fosfo-deidrogenasi.

Per confermare, ulteriormente, l'ipotesi che esiste un meccanismo di compensazione nei mutanti waxy singoli nulli in frumento duro e per verificare se l'aumento degli RNA messaggeri porta all'incremento delle proteine waxy funzionale, è stata effettuata l'analisi densitometrica sulle proteine waxy estratte dalle cariossidi a differenti stadi di sviluppo, con le medesime cinetiche utilizzate per le analisi di RT-PCR. Il programma utilizzato per queste analisi è il Kodak Digital Science 1D. Anche in questo caso è stata confermata l'ipotesi che nei mutanti parziali di frumento duro l'assenza di un allele è in parte compensata dalla presenza dell'altra isoforma. Infatti nel mutante parziale *Wx-B1* la proteina Wx-A1 risulta essere maggiormente presente a 14, 21 e 28 dpa rispetto alla cv. Svevo, mentre nell'altro mutante singolo nulli, che non esprime il gene che codifica per la proteina Wx-A1, è stato

riscontrato un aumento significativo dell'enzima funzionale Wx-B1 a 7, 14 e 21 dpa (Fig. 4.7 e Tab 4.3).

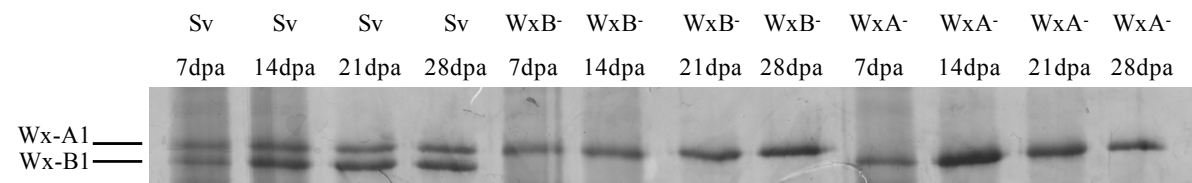


Figura 4.7 SDS-PAGE delle proteine waxy estratte dai granuli di amido delle cariossidi dei mutanti parziali waxy in frumento duro Svevo.

Tabella 4.3 Analisi densitometrica delle proteine waxy estratte dalle cariossidi dei mutanti singoli nulli di frumento duro.

	Sv 7dpa	Sv 14dpa	Sv 21dpa	Sv 28dpa	WxB ⁻ 7dpa	WxB ⁻ 14dpa	WxB ⁻ 21dpa	WxB ⁻ 28dpa	WxA ⁻ 7dpa	WxA ⁻ 14dpa	WxA ⁻ 21dpa	WxA ⁻ 28dpa
WxA1	511459	569728	398118	465949	507201	671407	647484	683650	—	—	—	—
WxB1	439588	624905	507709	522140	—	—	—	—	578724	1023952	792091	478603

4.1.3 Proprietà degli sfarinati di linee quasi isogeniche waxy in frumento tenero

Per valutare l'influenza dei singoli alleli e delle loro diverse combinazioni sulle caratteristiche qualitative degli sfarinati, sono state studiate le modifiche subite dall'amido, come componente della farina, nelle interazioni con l'acqua al variare della temperatura, utilizzando come strumento l'RVA. L'RVA permette di misurare i cambiamenti di viscosità prodotti riscaldando e raffreddando l'amido in presenza di acqua. Sono stati determinati vari parametri quali il picco di viscosità, la viscosità minima, il *breakdown*, la viscosità finale, il *setback* ed il *peak time* degli otto differenti genotipi di frumento tenero che formano il set di mutanti waxy: la linea N11 *wild-type* (*wt*), i tre genotipi N11 waxy singoli nulli (*Wx-A1⁻*, *Wx-B1⁻*, *Wx-D1⁻*), i tre genotipi N11 waxy doppi nulli (*Wx-A1⁻/B1⁻*, *Wx-A1⁻/D1⁻*, *Wx-B1⁻/D1⁻*), e la linea N11 waxy triplo nulli (*Waxy*) (Fig. 4.8; Fig. 4.9 e Tab. 4.4). Ci sono chiare e nette differenze tra il genotipo N11 e quello *Waxy* per tutti i parametri determinati. Il genotipo *Waxy* ha alto

picco di viscosità, bassa viscosità finale, basso *setback*, elevato *breakdown* e raggiunge il picco di viscosità in tempi più brevi ed a temperature più basse rispetto al genotipo N11 (Tab. 4.4). I granuli waxy, se scaldati in un eccesso di acqua, si rigonfiano rapidamente dando una viscosità più alta a temperature minori rispetto agli amidi con un maggior contenuto di amilosio. L'elevato *breakdown* dei waxy può essere dovuto alla maggior fragilità dei granuli rigonfi che si rompono a temperature più basse rispetto ai granuli contenenti anche amilosio; questi risultano più resistenti per la presenza di legami idrogeno tra amilosio e lipidi. Il *setback* e la viscosità finale dell'amido della linea *Waxy* sono molto bassi perché non ci sono, o comunque sono presenti in piccole quantità, le molecole di amilosio in grado di riassociarsi e cristallizzare in maniera irreversibile durante il processo di retrogradazione, che avviene nella fase di raffreddamento. Le linee parziali mostrano un andamento della curva di viscosità variabile ma comunque più simile alla linea N11 piuttosto che a quella *Waxy* completa, ciò è un'ulteriore prova che le proteine funzionali compensano la mancanza delle altre isoforme nei mutanti parziali.

Anche i dati RVA confermano che la proteina Wx-B1 ha un ruolo predominante nella sintesi dell'amilosio, poiché la sua essenza ha un'influenza maggiore sulla viscosità finale e sugli altri parametri considerati rispetto alle altre isoforme Wx-A1 e Wx-D1.

I parametri delle curve di viscosità risultano, inoltre, essere in accordo con i valori del contenuto di amilosio riportati nella tabella 4.1, confermando che il rapporto amilosio/amilopectina è il fattore che influisce con maggior efficacia sulle proprietà chimico-fisiche degli amidi.

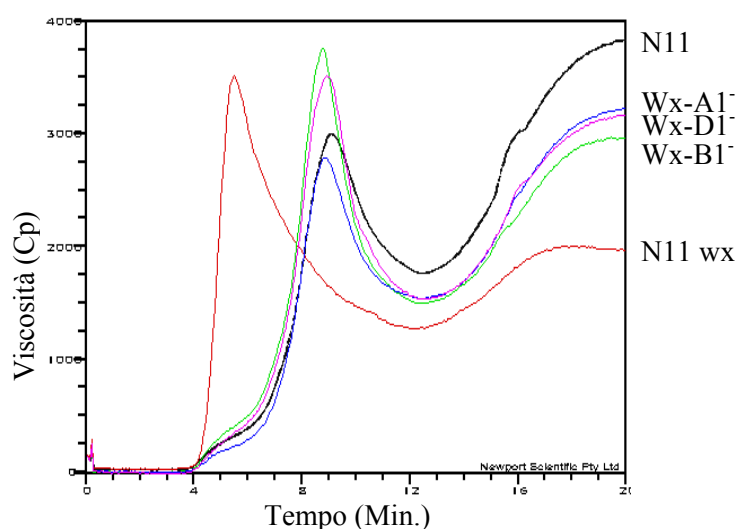


Figura 4.8 Grafici RVA del set di mutanti *waxy* singoli nulli e totali di frumento tenero.

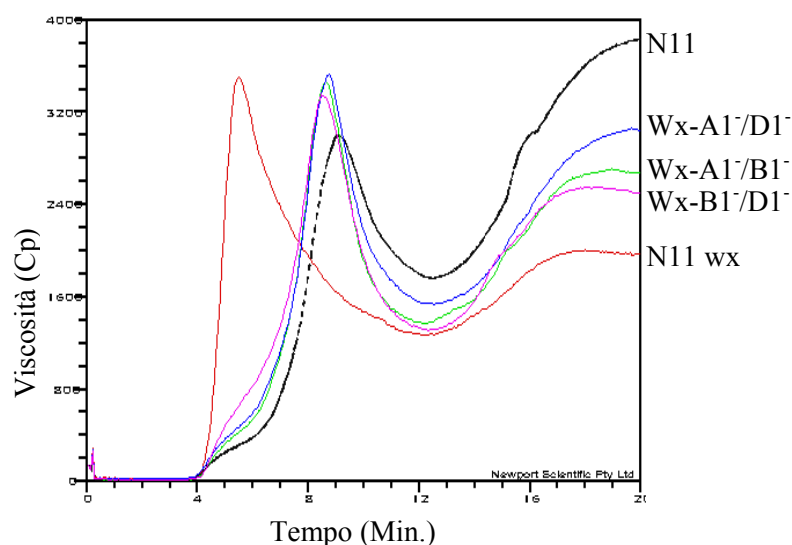


Figura 4.9 Grafici RVA del set di mutanti *waxy* doppio nulli e totali di frumento tenero.

Tabella 4.4 Analisi RVA sul set di linee *waxy* parziali e totali di frumento tenero N11.

Genotipo	ViscPicco	Breakdown	ViscFinale	Setback	Peak Time
N11Wt	3004	1237	3845	2078	9,0663
N11WxA1-	2791	1254	3226	1689	8,8663
N11WxD1-	3492	1952	3144	1604	8,8663
N11WxB1-	3784	2199	3077	1492	8,8663
N11WxA1-/B1-	3483	2089	2680	1286	8,6663
N11WxA1-/D1-	3528	1989	3050	1511	8,733
N11WxB1-/D1-	3353	2038	2498	1183	8,4663
N11Wx	3432	2202	1951	721	5,4663

4.1.4 Proprietà degli sfarinati delle linee quasi isogeniche *waxy* di frumento duro

I vari parametri dedotti con l'RVA sono stati determinati anche per la cultivar di frumento duro Svevo e per i diversi genotipi *waxy* ottenuti (Tab.4.5, Fig 4.10). La linea Svevo *Waxy* completa ha il picco di viscosità (3013 Cp) ed il *breakdown* (1737 Cp) più alti rispetto alla cultivar Svevo ed al genotipo *Wx-A1* nulli, mentre il genotipo *Wx-B1* ha una curva di viscosità particolare ed unica con il picco più alto (3646 Cp), ma con il *breakdown* simile al genotipo *Waxy* e con la viscosità finale simile, invece, all'altro genotipo singolo nulli (*Wx-A1*).

L'amido della linea *Waxy* di frumento duro è, inoltre, unico per i suoi bassi valori di viscosità finale (1873 Cp) e *setback* (597 Cp) rispetto alla linea *wild-type* che presenta, al contrario, i valori più alti. L'amido *waxy* raggiunge il picco di viscosità circa tre minuti prima degli altri, similmente a quanto osservato nel frumento tenero. Come già visto per le linee di frumento tenero, l'assenza delle interazioni amilosio-lipidi favorisce il ringofiammento dei granuli di amido che collassano più rapidamente.

L'amido estratto dai mutanti *Wx-B1* nulli ha caratteristiche più simili al genotipo *Waxy* rispetto all'altro mutante singolo nulli (*Wx-A1*), confermando che il gene *Wx-B1* ha un ruolo predominante nella sintesi dell'amilosio. Questa osservazione è stata confermata, nei paragrafi precedenti, dalle analisi sul contenuto di amilosio nei set di linee quasi isogeniche di frumento duro.

Anche dalle analisi effettuate sul set di frumento duro è stato dimostrato che il rapporto amilosio/amilopectina è il fattore più importante nel regolare le proprietà dell'amido; variando le porzioni relative di amilosio ed amilopectina è possibile produrre, infatti, amidi con curve di viscosità uniche.

Anche le analisi RVA effettuate sui due set di mutanti *waxy* hanno messo in risalto l'effetto predominante della isoforma *Wx-B1* sia in frumento duro che tenero. Questi dati sono in perfetta sintonia con quelli ottenuti sul contenuto di amilosio e nelle analisi RT-PCR. Inoltre la presenza di una singola isoforma maschera, in parte, l'assenza delle altre mantenendo un certo livello di amilosio. Questi meccanismi sono frequenti in specie poliploidi come il frumento e rendono più difficili l'identificazione di mutanti naturali o indotti con tecniche di genetica classica.

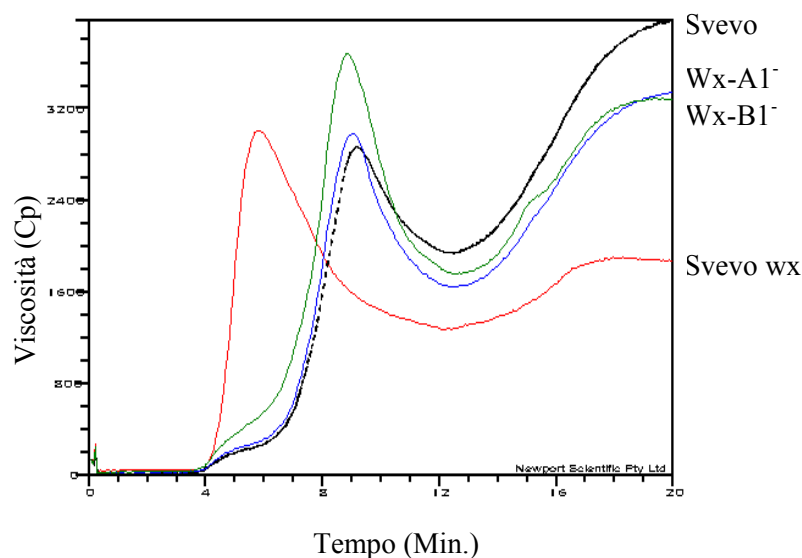


Figura 4.10 Grafici RVA del set di linee *waxy* di frumento duro.

Tabella 4.5 Analisi RVA sul set di linee *waxy* parziali e totali di frumento duro Svevo.

Genotipo	ViscPicco	Breakdown	ViscFinale	Setback	Peak Time
SvevoWt	2789	912	3923	2046	9,0663
SvevoWxA1-	2987	1341	3344	1698	8,9996
SvevoWxB1-	3646	1871	3333	1558	8,8663
SvevoWx	3013	1737	1873	597	5,7996

4.2 Produzione di linee di frumento ad alto contenuto di amilosio

4.2.1a Produzione di linee quasi isogeniche per le proteine Sgp-1 in frumento tenero

Allo scopo di produrre piante di frumento tenero “high amylose”, la linea N11 è stata incrociata con tre varietà di frumento tenero, prive ciascuna di un’isoforma Sgp-1, ovvero Chousen 30 (Sgp-A1⁻), Kanto 79 (Sgp-B1⁻) e Turkey 116 (Sgp-D1⁻) (Yamamori *et al.*, 2000). Gli incroci eseguiti sono schematizzati nella figura 4.11.

Alcune piante della generazione F₂ che presentavano genotipi nulli sono state reincrociate con la linea N11 per ottenere linee quasi isogeniche. Inoltre sono state incrociate tra loro piante derivate entrambe da un primo incrocio con N11, che presentavano il genotipo *Sgp-A1*⁻ ed il genotipo *Sgp-D1*⁻, per produrre una linea con entrambi gli alleli nulli.

I semi BC₁F₁ ottenuti da questi incroci sono stati messi a germinare senza essere analizzati. Le piante così prodotte sono state lasciate autofecondare.

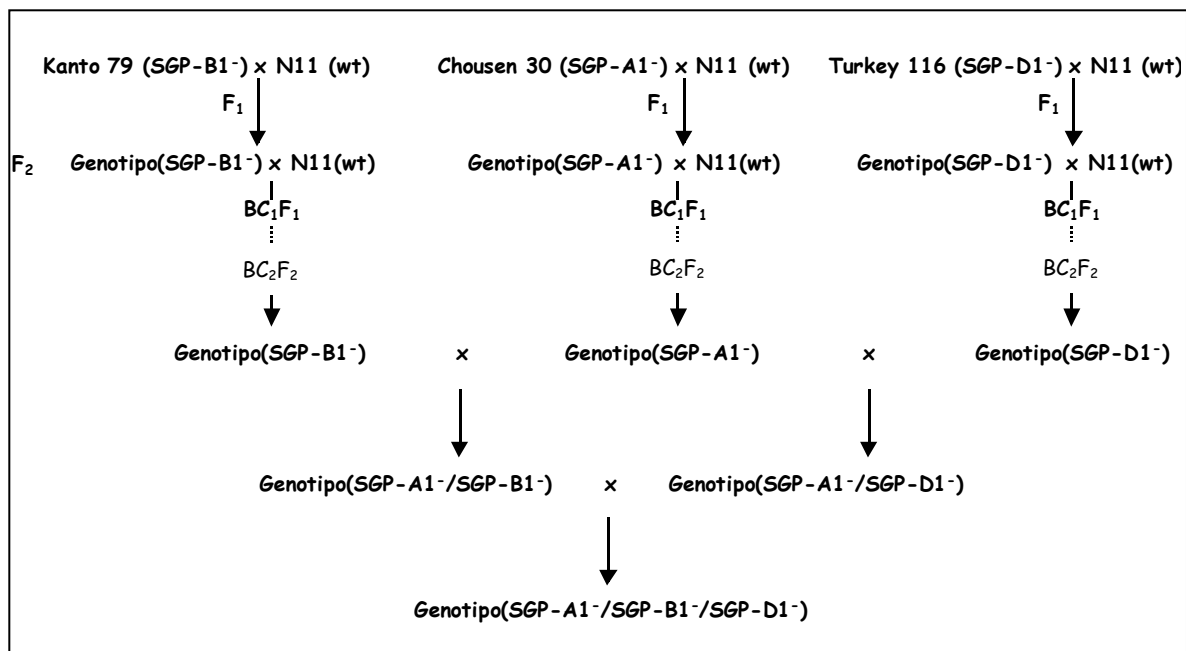


Figura 4.11 Schema degli incroci effettuati per la produzione di linee quasi isogeniche per le proteine SGP-1 in frumento tenero

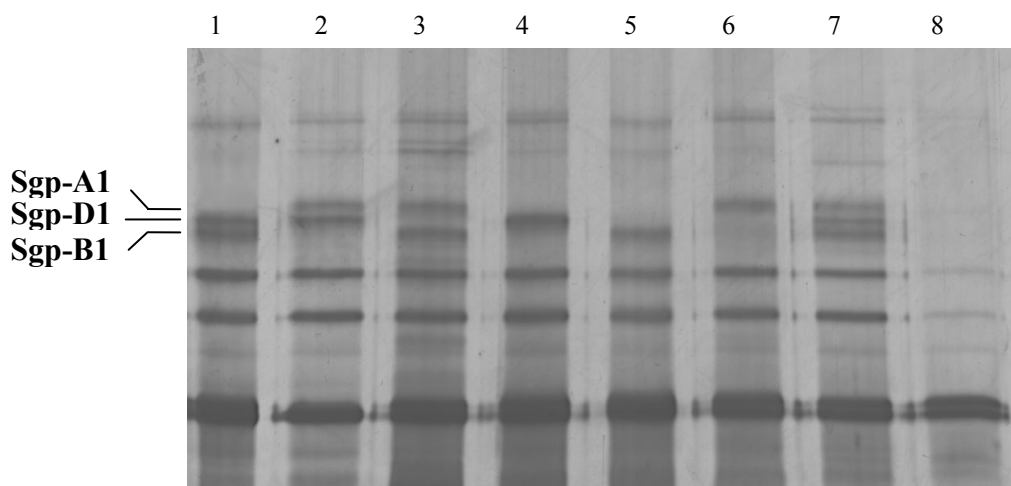


Figura 4.12 SDS-PAGE delle proteine estratte dai granuli di amido delle linee *sgp-1* di frumento tenero 1) *Sgp-A1*⁻, 2) *Sgp-B1*⁻, 3) *Sgp-D1*⁻, 4) *Sgp-A1*⁻/*B1*⁻, 5) *Sgp-A1*⁻/*D1*⁻, 6) *Sgp-B1*⁻/*D1*⁻, 7) N11, parentale 8) *Sgp-A1*⁻/*B1*⁻/*D1*⁻.

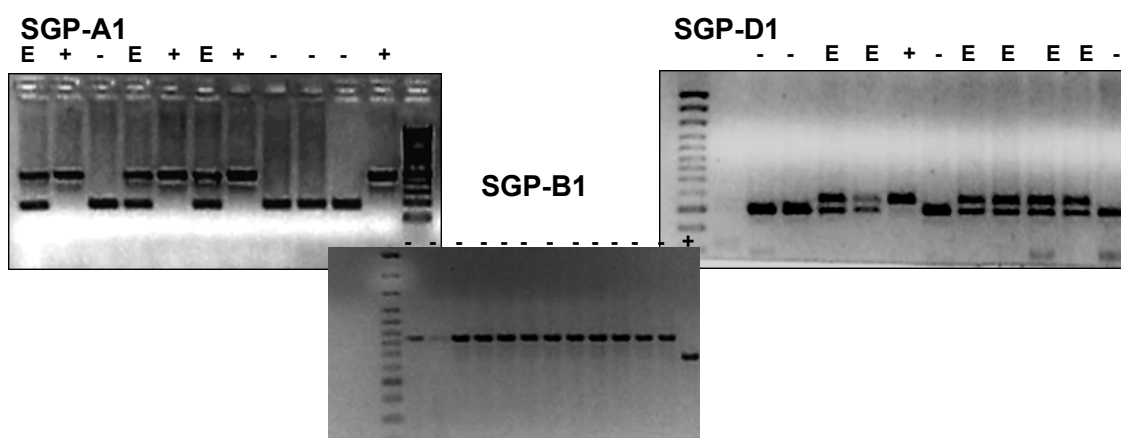


Figura 4.13 Separazione su gel di agarosio all'1.2% del prodotto di PCR ottenuto dall'amplicazione su DNA genomico estratto da foglia delle linee di frumento tenero utilizzando gli oligonucleotidi specifici per i gene *Sgp-A1* (*Sgp-A1* F3 e *Sgp-A1* R3), *Sgp-B1* (*Sgp-B1* F2 e *Sgp-B1* R2) e *Sgp-D1* (*Sgp-D1* F1 e *Sgp-D1* R1) (Shimbata *et al.*, 2005). E= eterozigote; - = linea nulli; + = linea *wild type*.

Sono stati effettuati incroci tra piante BC₁F₂ che presentavano genotipi singoli nulli per i diversi alleli per produrre linee priva di due proteine Sgp-1. I due genotipi doppio nulli, *Sgp-A1*⁻/*B1*⁻ e *Sgp-A1*⁻/*D1*⁻, sono stati incrociati per ottenere la linea triplo nulli (*Sgp-A1*⁻/*B1*⁻/*D1*⁻). Le analisi, effettuate mediante SDS-PAGE, sono state compiute su mezza cariossidi, in modo da poter mettere a germinare l'altra metà con l'embrione (Fig. 4.12).

L'individuazione dei genotipi è particolarmente complessa in quanto è difficile distinguere dall'intensità delle bande proteiche, osservate in SDS-PAGE, un genotipo normale omozigote da uno eterozigote. Per distinguere gli omozigoti dagli eterozigoti sono state utilizzate tre coppie di oligonucleotidi specifici per i tre geni *Sgp-1* disegnate a monte ed a valle della mutazione (Fig. 4.13) (Shimbata *et al.*, 2005).

Nei gel SDS-PAGE del mutante *Sgp-1* triplo nulli non sono state trovate legate ai granuli le proteine Sgp-2 e Sgp-3. L'ipotesi più accreditata è che si formano dei complessi mediante interazioni proteina-proteina tra queste differenti isoforme ed altre proteine presenti sul granulo, per cui l'assenza delle Sgp-1 impedisce alle altre di legarsi sui granuli.

4.2.1b Produzione di linee quasi isogeniche per le proteine *Sgp-1* in frumento duro

La cultivar di frumento duro Svevo è stata incrociata con le varietà di frumento tenero Chousen 30 (*Sgp-A1*⁻) e Kanto 79 (*Sgp-B1*⁻) al fine di produrre una linea di frumento con alleli nulli per le proteine Sgp-1. I due genotipi singoli nulli, *Sgp-A1*⁻ e *Sgp-B1*⁻, sono stati incrociati tra loro per ottenere il genotipo doppio nulli. La serie di incroci effettuati sono rappresentati schematicamente nella Fig. 4.14.

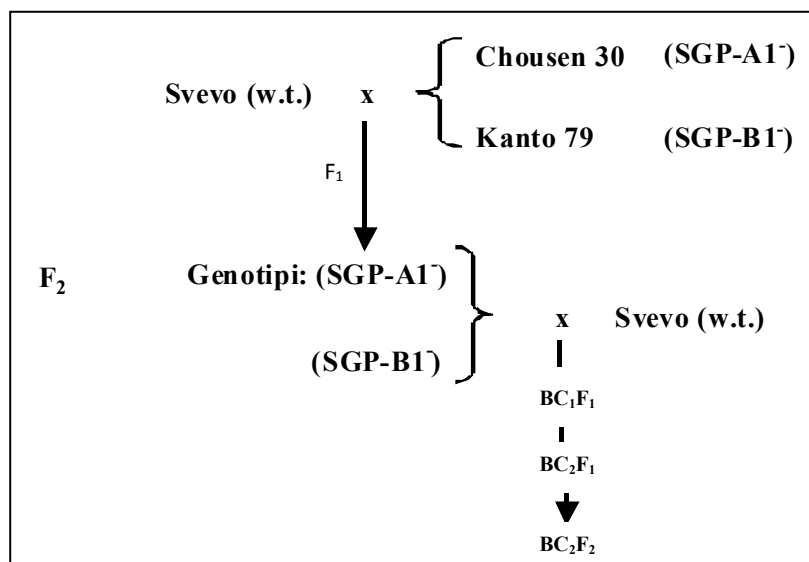


Figura 4.14 Schema degli incroci effettuati per la produzione di linee quasi isogeniche per le proteine SGP-1 in frumento.

I diversi genotipi singoli nulli della progenie F₂, identificati mediante SDS-PAGE, sono stati reincrociati con la cultivar Svevo. Tutte le piante BC₂F₁ prodotte sono state lasciate autofecondare. I semi con genotipo in eterozigosi sono stati identificati grazie alle analisi PCR utilizzando le coppie di oligonucleotidi specifici per i geni *Sgp-A1* e *Sgp-B1* come mostrato nel paragrafo precedente. Infine è stato, quindi, creato un set di linee *Sgp-1* nulli parziali e totali in frumento duro cultivar Svevo. Le differenti combinazioni dei mutanti ottenuti sono mostrati nella figura 4.15.

Analogamente a quanto osservato in frumento tenero al mutante *Sgp-1* completo mancano, oltre alle proteine Sgp-1, anche le proteine Sgp-2 e Sgp-3 (Fig. 4.15).

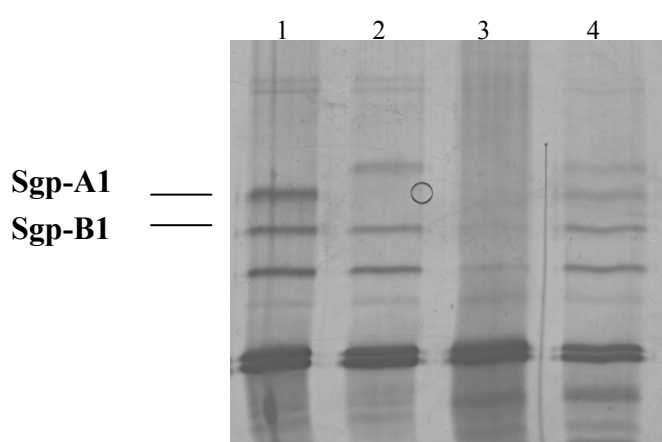


Figura 4.15 Fenotipo elettroforetico delle proteine estratte dai granuli di amido delle linee parziali e complete *sgp-1* di frumento duro 1) *Sgp-A1*⁻, 2) *Sgp-B1*⁻, 3) *Sgp-A1*⁻/*B1*⁻, 4) Svevo, parentale.

4.2.1.1 Determinazione del contenuto di amilosio in linee nulle per le proteine *Sgp-1* di frumento tenero e duro

Il contenuto di amilosio del set completo di mutanti *Sgp-1* di frumento duro e tenero è riportato nella tabella 4.6.

Il contenuto di amilosio nel genotipo parentale Svevo è di circa il 23%, mentre nel genotipo *Sgp-1* completo è stato riscontrato una percentuale di amilosio del 43.6% con un incremento pari all'89%. Tale valore è più alto rispetto a quello riscontrato da Yamamori *et al.* (2000) sul mutante *Sgp-1* completo di frumento tenero. Il contenuto di amilosio dei 2 genotipi singolo nulli, *Sgp-A1*⁻ e *Sgp-B1*⁻, è, rispettivamente, del 24.3% e 29.1%. Ciò fa ipotizzare che l'omeoallele *Sgp-B1* ha un impatto maggiore sulla sintesi dell'amilopectina rispetto al gene *Sgp-A1*, dato che la sua assenza produce un aumento nel contenuto di amilosio di 6.1 punti percentuali (+ 26.52%) rispetto al genotipo Svevo.

Per quanto riguarda il frumento tenero non è stato possibile eseguire la determinazione del contenuto di amilosio su tutto il set perché il materiale che avevamo a disposizione non era sufficiente. I campioni che sono stati analizzati sono i due mutanti doppio nulli *Sgp-A1⁻D1⁻*, *Sgp-A1⁻B1⁻* e la linea triplo nulli. Nei mutanti parziali il contenuto di amilosio si discosta poco dalla linea N11, con un aumento massimo di circa 3.1 punti percentuali riscontrato nel mutante *Sgp-A1⁻D1⁻*. Nel mutante *Sgp-I* triplo nulli il contenuto di amilosio risulta essere incrementato del 31.73% rispetto al genotipo parentale N11, passando dal 23% al 30.3%.

Come già riportato da Yamamori *et al.* (2000), l'incremento del contenuto di amilosio, osservato nei genotipi nulli completi, potrebbe essere dovuto solo in parte all'assenza delle proteine Sgp-1. La simultanea riduzione nella quantità delle proteine Sgp-2 e Sgp-3, osservata nei genotipi nulli, potrebbe concorrere all'aumento nel contenuto di amilosio.

Tabella 4.6 Contenuto di amilosio nel set di mutanti Sgp-1 di frumento duro (A) e tenero (B).

A

Genotipi	Sgp-A1 ⁻	Sgp-B1 ⁻	Sgp-A1 ⁻ B1 ⁻	Svevo
Contenuto amilosio (%)	24.3	29.1	43.6	23

B

Genotipi	Sgp-A1 ⁻ D1 ⁻	Sgp-A1 ⁻ B1 ⁻	Sgp-A1 ⁻ B1 ⁻ D1 ⁻	N11
Contenuto amilosio (%)	26.1	24.4	30.3	23

4.2.1.2 Proprietà degli sfarinati delle linee nulli per le proteine *Sgp-1* di frumento duro e tenero

Le analisi RVA effettuate sulle linee *Sgp-1* nulli parziali e complete confermano l'effetto differente dei due alleli, *Sgp-A1* e *Sgp-B1*, sulle proprietà di "pasting" (Fig. 4.16). Gli sfarinati del campione *Sgp-1* completo mostrano caratteristiche di viscosità dell'amido in esse presenti molto simili a quelle osservate da Yamamori *et al.* (2006) per il mutante *Sgp-1* completo di frumento tenero, con un valore molto basso del picco di viscosità (196), *breakdown* (24), *setback* (181) e viscosità finale (353) rispetto al controllo (Svevo). Le proprietà dei mutanti singoli nulli sono differenti: l'*Sgp-A1* nulli mostra caratteristiche simili a Svevo, differendo solo moderatamente nel *breakdown* e nella viscosità finale; al contrario la linea *Sgp-B1* nulli mostra un valore più basso per tutti i parametri osservati (Tab. 4.7).

L'amido dei mutanti doppi nulli, avendo un contenuto di amilosio elevato, struttura dei granuli e dell'amilopectina alterata (come discusso nell'introduzione, paragrafo 1.2.3.4), non sono in grado di assorbire l'acqua durante il riscaldamento; di conseguenza, i granuli non si rigonfiano e la curva di viscosità risulta essere del tutto particolare: non si riscontrano, infatti, incrementi di viscosità significativi durante le analisi RVA (Fig. 4.16).

L'amido del mutante singolo nulli *Sgp-B1* ha una curva di viscosità con caratteristiche che si discostano maggiormente da Svevo; ciò avvalorare l'ipotesi che il gene *Sgp-B1* ha un ruolo maggiore rispetto all'altro omeoallele nella sintesi dell'amilopectina. I dati delle analisi RVA sono in perfetta sintonia con quelli sul contenuto di amilosio ed è interessante notare che c'è corrispondenza inversamente proporzionale tra curva di viscosità (Fig. 4.16) e contenuto di amilosio (Tab. 4.6A).

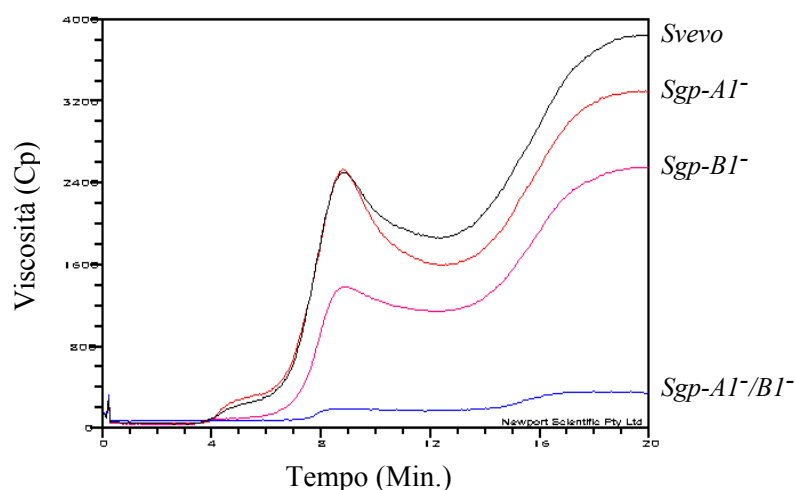


Figura 4.16 Grafici RVA del set di linee *Sgp-1* di frumento duro.

Tabella 4.7 Analisi RVA sul set di linee *Sgp-1* parziali e totali di frumento duro Svevo.

Campione	Picco Visc	Breakdown	Visc Finale	Setback	Peak Time
Svevo	2376	601	3172	1397	8,533
<i>Sgp-A1⁻</i>	2538	940	3305	1707	8,799
<i>Sgp-B1⁻</i>	1387	246	2559	1418	8,799
<i>Sgp-A1⁻B1⁻</i>	196	24	353	181	8,333

Per quanto riguarda il set di mutanti *Sgp-1* di frumento tenero, le analisi RVA sono state effettuate solo su 3 linee (quella triplo nulli, l'*Sgp-A1⁻B1⁻* e l'*Sgp-A1⁻DI⁻*) poiché il materiale che, attualmente, abbiamo a disposizione non è sufficiente per questo tipo di analisi (Fig. 4.17). Gli sfarinati del campione *Sgp-1* nulli completo hanno valori bassi del picco di viscosità (697), *breakdown* (63), *setback* (670) e viscosità finale (1304) rispetto al controllo (N11). Le proprietà dei 2 mutanti doppio nulli sono differenti: l'*Sgp-A1-B1* nulli mostra caratteristiche più simili a N11, differendo solo moderatamente nel *breakdown* e nella viscosità finale; al contrario la linea *Sgp-A1-DI* nulli mostra un valore più basso per tutti i parametri osservati (Tab. 4.8).

In frumento duro il gene *Sgp-B1* sembra avere un ruolo maggiore rispetto all'altro allele nella sintesi dell'amilopectina; mentre in frumento tenero questo dato sembrerebbe non essere confermato, in quanto il mutante doppio nulli *Sgp-A1-B1* ha un andamento che maggiormente si avvicina a N11. Anche in questo caso i valori di viscosità (Tab 4.8) ed il contenuto di amilosio (Tab 4.6 B) sono strettamente correlati e risultano essere inversamente proporzionali.

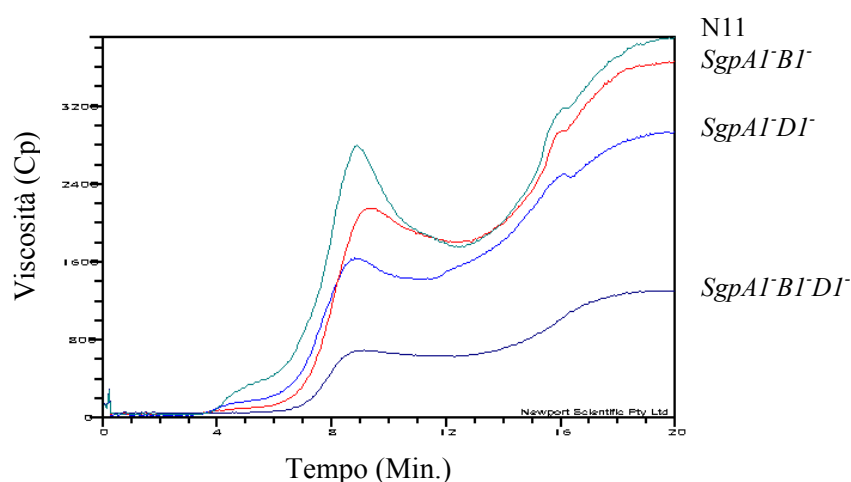


Figura 4.17 Grafici RVA del set di 3 linee *Sgp-1* di frumento tenero.

Tabella 4.8 Analisi RVA su 3 linee *Sgp-I* parziali e totali di frumento tenero N11.

Campione	Picco Visc	Breakdown	Visc Finale	Setback	Peak Time
Sgp-A1`D1`	1646	221	2930	1505	8,7996
Sgp-A1`B1`	2157	352	3654	1849	9,3996
Sgp-A1`B1`D1`	697	63	1304	670	9,133
N11	2806	1048	3911	2153	8,8663

4.2.2 Identificazione di mutanti indotti *Sgp-I*

Nei mutanti *Sgp-I* completi di frumento duro e tenero, trattati nel paragrafo precedente, è stato riscontrato un aumento considerevole nel contenuto di amilosio, ma, purtroppo, i semi risultano essere abbastanza raggrinziti con una perdita in peso di circa il 40%.

Probabilmente questo calo è dovuto alla mancanza dei geni *SSIIa*, ma un'altra possibile causa potrebbe essere il trasferimento di qualche carattere indesiderato durante l'incrocio tra i mutanti naturali di scarsa qualità e le nostre linee di elite. Per ottenere dati più attendibili sono necessari ulteriori incroci con i parentali (N11 per il frumento tenero e Svevo per il duro) per ottenere linee quasi isogeniche. Una possibile alternativa a questa opzione è quella di isolare mutanti indotti con trattamenti chimici su cultivar di interesse e di incrociare i mutanti *Sgp-I* singoli nulli identificati per ottenere un nuovo set di linee *Sgp-I* parziali e totali.

Circa 6000 semi di frumento tenero cultivar Cadenza sono stati mutagenizzati con una soluzione di EMS all'0.8% per 16 ore presso il Centro di Ricerca di Rothamsted (Harpenden, UK) ed è stata ottenuta una popolazione di circa 2500 linee mutagenizzate.

4.2.2.1 Identificazione di mutanti indotti e nuove varianti alleliche nei geni *Sgp-I* mediante screening con la tecnica TILLING

Allo scopo di identificare i mutanti indotti sono stati utilizzate coppie di oligonucleotidi specifici per i geni *Sgp-A1*, *Sgp-B1* e *Sgp-D1*. Le sequenze nucleotidiche dei geni *Sgp-A1* (n° di accessione AB201445), *Sgp-B1* (n° accessione AB201446) e *Sgp-D1* (n° di accessione AB201447) sono state allineate con il programma DNAMAN ed è stato, così, possibile, utilizzando il programma PRIMER PREMIER 5, disegnare 12 coppie di oligonucleotidi specifici per i geni *SSIIa* (4 coppie per ogni genoma). La specificità genomica è stata testata mediante analisi PCR sul DNA genomico delle tre linee di frumento ditelosomiche, prive, rispettivamente, del braccio corto del cromosoma 7A, 7B e 7D, che ci sono state fornite dalla Prof.ssa Carla Ceoloni (Fig. 4.18).

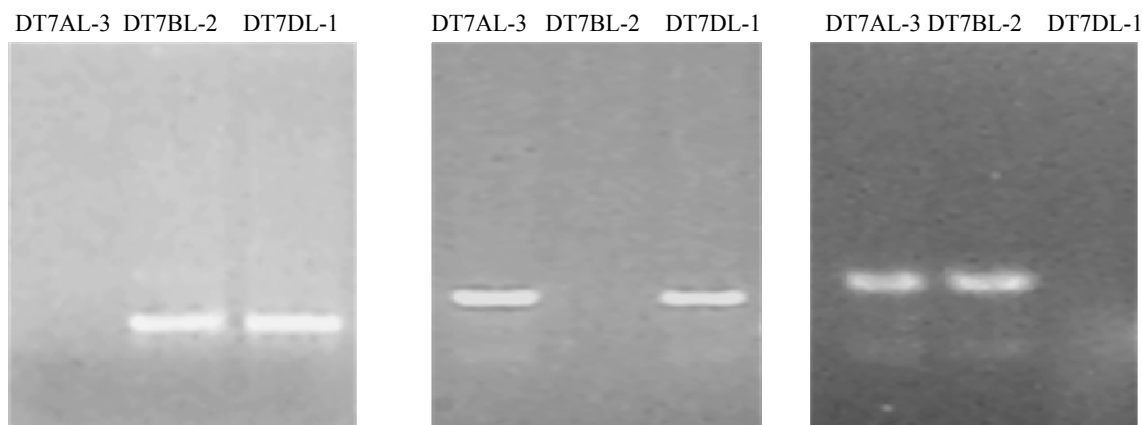


Figura 4.18 Separazione su gel di agarosio al 1.2% del prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione del DNA genomico delle linee ditelosomiche DT7AL-3, DT7BL-2 e DT7DL-1 per verificare la genoma specificità degli oligonucleotidi. Nel primo gel è riportato un esempio di una coppia di oligonucleotidi specifica per il genoma A, nel secondo per il genoma B e nel terzo per il genoma D.

L'identificazione di eventuali mutazioni è stato effettuato sul DNA genomico di 1344 linee di frumento tenero cultivar Cadenza (generazione M₃) mutagenizzato utilizzando, per il momento, solo quattro delle dodici coppie di oligonucleotidi specifici opportunamente marcati. Le analisi sono state condotte su pool composti da due individui. Le mutazioni, risultanti dal taglio con l'endonucleasi *CEL I*, sono visibili come bande più corte rispetto al prodotto di PCR atteso, che è localizzato sulla parte superiore dei gel di acrilamide (Fig. 4.19, 4.21, 4.24 e 4.25). In totale sono stati identificati 33 pool che, presumibilmente, contengono mutazioni (Tab. 4.9). Le 66 linee che componevano i pool sono state riamplicate con gli oligonucleotidi non marcati ed i prodotti di PCR sequenziati per verificare se si trattassero di reali mutanti o di falsi positivi.

Utilizzando la coppia di oligonucleotidi Sgp-A1 F1 e Sgp-A1 R1 che produce un amplicone di 711 paia di basi, sono stati identificati 18 pool, ma soltanto 8 campioni sono risultati essere realmente mutanti.

Nella linea 27B (CADR1 4H) la mutazione cade sul sito di splicing (Fig. 4.20): la base Guanina del sito di giunzione AG è sostituita con l'Adenina. La linea 22A (CADR8 3C) ha un codone di stop in posizione prematura, dovuto alla sostituzione della base Guanina con l'Adenina (Fig. 4.20). La sostituzione della base G con l'A nel campione 12A (CADR1 9D) provoca la sostituzione dell'aminoacido Glicina con l'Acido Aspartico in posizione 481 (Fig. 4.20).

Le altre sostituzioni nucleotidiche identificate non provocano cambiamenti a livello amminoacidico, perché cadono sul terzo nucleotide del codone o nelle regioni introniche.

Tabella 4.9 Resoconto dei pool di probabili mutanti identificati utilizzando le quattro coppie di oligonucleotidi Sgp-D1 F1 e R1, Sgp-A1 F1 e R1, Sgp-B1 F1 e R1, Sgp-B1 F2 e R2.

SGP-D1 F1R1		SGP-A1 F1R1		SGP-B1 F1R1		SGP-B1 F2R2	
1	CADR1 7,8 E	12	CADR1 9,10D	26	CADR4 3,4D	27	CADR1 3,4H
2	CADR3 9,10C	13	CADR1 11,12 A			31	CADR6 9,10C
3	CADR3 9,10H	14	CADR1 11,12 C			32	CADR6 9,10F
4	CADR4 1,2 C	15	CADR2 9,10D				
5	CADR4 11,12C	16	CADR2 9,10G				
6	CADR7 9,10B	17	CADR3 3,4F				
7	CADR7 11,12F	18	CADR3 7,8 C				
8	CADR8 9,10H	19	CADR3 7,8 F				
9	CADR11 7,8B	20	CADR5 5,6C				
10	CADR11 11,12C	21	CADR5 9,10C				
11	CADR12 5,6B	22	CADR8 3,4C				
33	CADR4 11,12F	23	CADR9 5,6E				
		24	CADR10 1,2G				
		25	CADR10 9,10B				
		28	CADR11 3,4A				
		29	CADR6 3,4G				
		30	CAD6 5,6G				

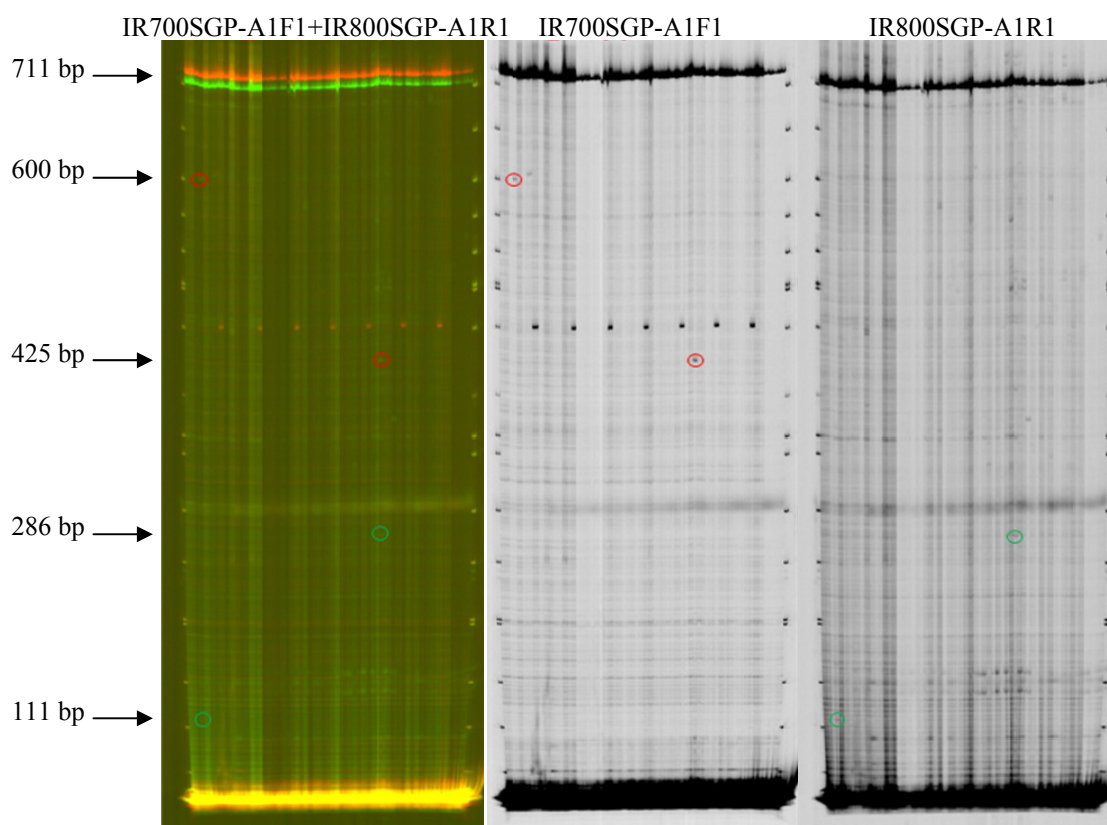


Figura 4.19 Identificazione di mutazioni indotte mediante la tecnica del TILLING utilizzando la coppia di oligonucleotidi Sgp-A1 F1 e Sgp-A1 R1 specifici per l'omeoallele *Sgp-A1*. Nel primo pannello è riportata l'immagine ottenuta osservando l'assorbimento agli infrarossi a 700 nm e 800 nm contemporaneamente. Negli altri due pannelli è riportato l'assorbimento nei singoli canali. Le box rosse e verdi indicano le bande degli eteroduplex in seguito alla digestione con l'enzima *CEL I*. La somma delle bande nella stessa linea dà il frammento atteso di 711 paia di basi. Le bande polimorfiche vengono cercate ingrandendo le dimensioni del gel ed è preferibile fare questa ricerca nei singoli canali, in quanto le immagini sono più nitide.

```

Wt  ATTCCCTCGATCAAGTTATTAGACGGATCAAATGTGGTACAGTGCCATGGCTAGTTGCTTGGAGTCACCTTTTAAGCTAGG
12A  -----
16B  -----
20A  -----
22A  -----
24B  -----
25A  -----
27B  -----
29B  -----

Wt  TCGCTTGCCATCACGCTTTGTGTTAAGCGCTTGGGGTCGCTTTTGCTCAATTTGTATTTTGTGTTATGTGTTTTAGTT
12A  -----
16B  -----
20A  -----
22A  -----
24B  -----
25A  -----A-----
27B  -----
29B  -----

Wt  ATGTAGCCTGAACCTTCTGGACTTAGTTTTTCTCTATAATGATCACATGCTTTGGTCAGTTATTCCTTTCTTGGGTAC
12A  -----
16B  -----
20A  -----
22A  -----
24B  -----T-----
25A  -----
27B  -----
29B  -----

Wt  TCCGTTGGGCTAATTCTTTCTCTTGATTGATGTGTATATGCAGGGCCGTGGCCCAGTAGATGAATTCCCGTTCACCGAG
12A  -----A-----
16B  -----
20A  -----
22A  -----
24B  -----
25A  -----
27B  -----A-----
29B  -----

Wt  TTGCCTGAGCACTACCTGGAACACTTCAGACTGTACGACCCCGTGGGTGGTGAGCACGCCAACTACTTCGCCGCCGGCCT
12A  -----
16B  -----
20A  -----
22A  -----
24B  -----
25A  -----
27B  -----
29B  -----

Wt  GAAGATGGCGGACCAGGTTGTCGTGGTGAGCCCCGGGTACCTGTGGGAGCTCAAGACGGTGGAGGGCGGCTGGGGGGCTTC
12A  -----
16B  -----
20A  -----A-----
22A  -----A-----A-----
24B  -----
25A  -----
27B  -----
29B  -----A-----

Wt  ACGACATCATACGGCAGAACGACTGGAAGACCCGCGGCATCGTCAACGGCATCGACAACATGGAGTGGAACCCCGAGGTG
12A  -----
16B  -----T-----
20A  -----
22A  -----
24B  -----
25A  -----
27B  -----
29B  -----

Wt  GACGTCCACCTCCAGTCGGACGGCTACACCAACTTCTCCC
12A  -----
16B  -----
20A  -----
22A  -----
24B  -----
25A  -----
27B  -----
29B  -----

```

Figura 4.20 Allineamento delle sequenze nucleotidiche dei mutanti individuati utilizzando la coppia di oligonucleotidi Sgp-A1 F1 e Sgp-A1 R1.

Dalle analisi effettuate con la coppia di oligonucleotidi specifica per l'omeoallele *Sgp-D1*, Sgp-D1 F1 e Sgp-D1 R1, sono stati identificati 12 pool, ma soltanto 7 contenevano realmente un mutante (Fig. 4.21 e 4.22).

In totale sono state identificate 4 mutazioni missenso, che hanno provocato cambiamenti puntiformi sulla sequenza aminoacidica primaria della proteina Sgp-D1 (Fig. 4.23). Le altre sostituzioni nucleotidiche non producono nessuna variazione sulla sequenza proteica.

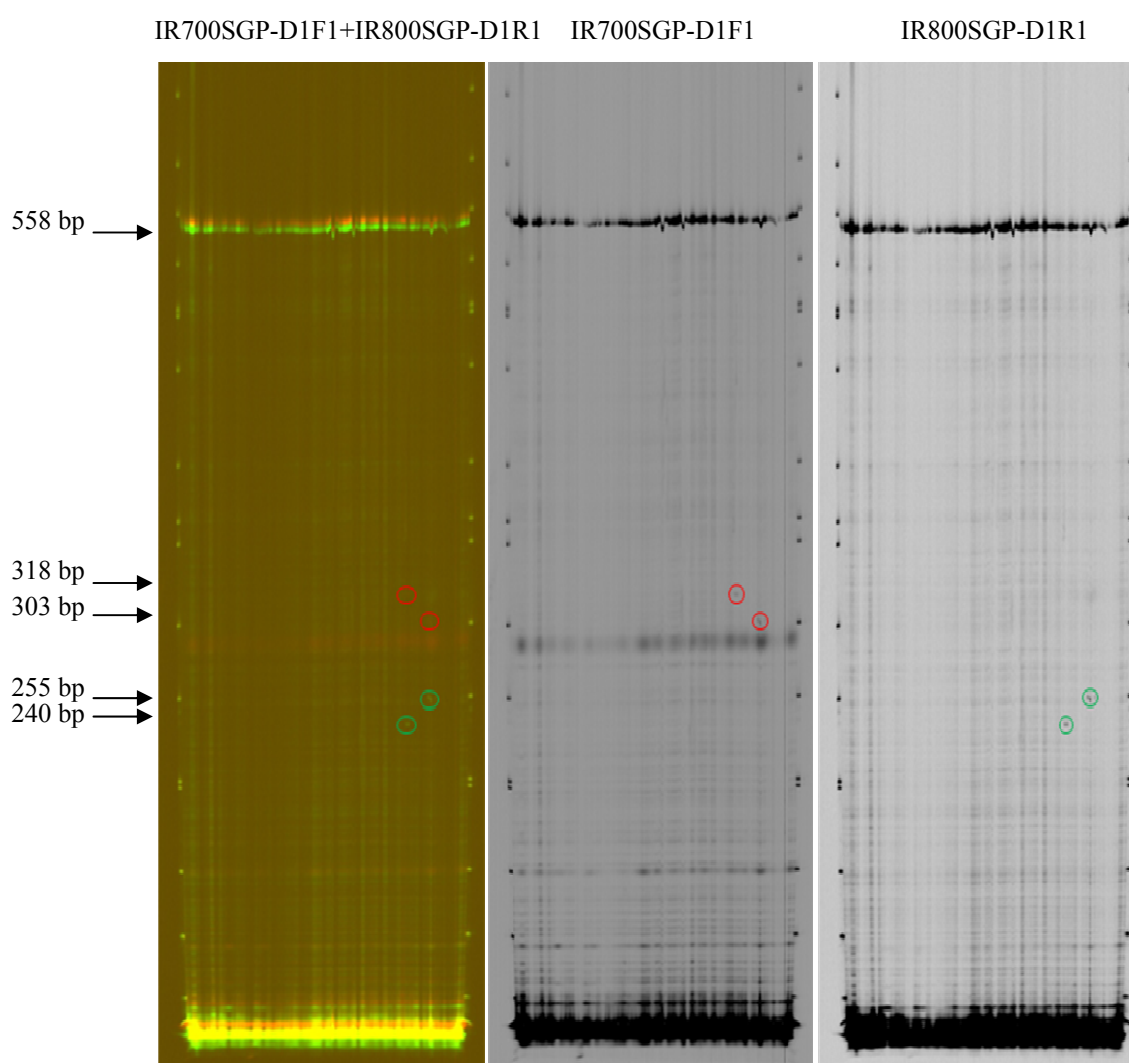


Figura 4.21 Identificazione di mutazioni indotte mediante la tecnica del TILLING utilizzando la coppia di oligonucleotidi specifici per l'omeoallele *Sgp-D1*, SGP-D1 F1 e SGP-D1 R1. Nel primo pannello è riportata l'immagine ottenuta osservando l'assorbimento agli infrarossi a 700 nm e 800 nm contemporaneamente. Negli altri due pannelli è riportato l'assorbimento nei singoli canali. Le box rosse e verdi indicano le bande degli eteroduplex in seguito alla digestione con l'enzima *CEL I*. La somma delle bande più corte, presenti nella stessa linea ed evidenziate con i cerchi rossi e verdi, corrisponde alla banda attesa di 558 paia di basi.

```

wt  TTTAGTGTGTTTTTTTGTCTGTCAGGATATGGAAGTGAATTATTTCCATGCTTATATCGATGGAGTTGATTTGTG
2B  -----
3B  -----
7B  -----
8A  -----
9B  -----
10A -----
11A -----T-----

wt  TTCATTGACGCTCCTCTCTCCGACACCGTCAGGAAGACATTTATGGGGGCAGCAGACAGGTTAATCTTCTATAT
2B  -----
3B  -----
7B  -----A-----
8A  -----
9B  -----
10A -----
11A -----

wt  GTTGGTGTGTTGATTGCACTGATAAACTGAGAACAAGCCAAGGCCTACTGACTGGCATATGATTACACATTTTATT
2B  -----
3B  -----
7B  -----
8A  -----
9B  -----
10A -----
11A -----

wt  TTTTCAGGAAATTATGAAGCGCATGATTTTGTCTCTGCAAGGCCGCTGTTGAGGTATCTCTCCAACCTCAATTGACA
2B  -----A-----
3B  -----T-----
7B  -----
8A  -----
9B  -----
10A -----T-----
11A -----

wt  ACCTATTACCACTATACAAATTATGTGTATGCATGTATTTCAACAGATACATAATCTCTTGTGAAGTGCATATATA
2B  -----
3B  -----
7B  -----
8A  -----
9B  -----
10A -----
11A -----

wt  CTAATAACATTTC AATACCTTACATGCACATTTGGTCAAGCGTTATGATTAACTTCTGA
2B  -----
3B  -----
7B  -----
8A  -----T-----
9B  -----
10A -----
11A -----

```

Figura 4.22 Allineamento delle sequenze nucleotidiche dei mutanti identificati nel gene *Sgp-DI*.

```

wt  DMEVNYFHAYIDGVDFVFDAPLFRHRQEDIYGGSRQEIMKRMILFCKAAVEVPWHVPCGGVPYGDGNL
2B  -----K-----
3B  -----
7B  -----N-----
9B  -----I-----
10A -----C-----

```

Figura 4.23 Allineamento delle sequenze aminoacidiche dei mutanti identificati nel gene *Sgp-DI*.

Per quanto riguarda il gene *Sgp-B1* sono state trovate le condizioni ottimali per le analisi TILLING per due coppie di oligonucleotidi (*Sgp-B1* F1 e *Sgp-B1* R1; *Sgp-B1* F2 e *Sgp-B1* R2) (Fig. 4.24 e Fig.4.25). Utilizzando la seconda coppia di oligonucleotidi sono stati identificati 2 pool contenuti bande polimorfiche, ma soltanto la linea 32B (CADR6 10F) è risultata avere una sostituzione della base Citosina con la Timina, che ha provocato un cambiamento a livello amminoacidico in posizione 494 con la sostituzione della Prolina con la Serina.

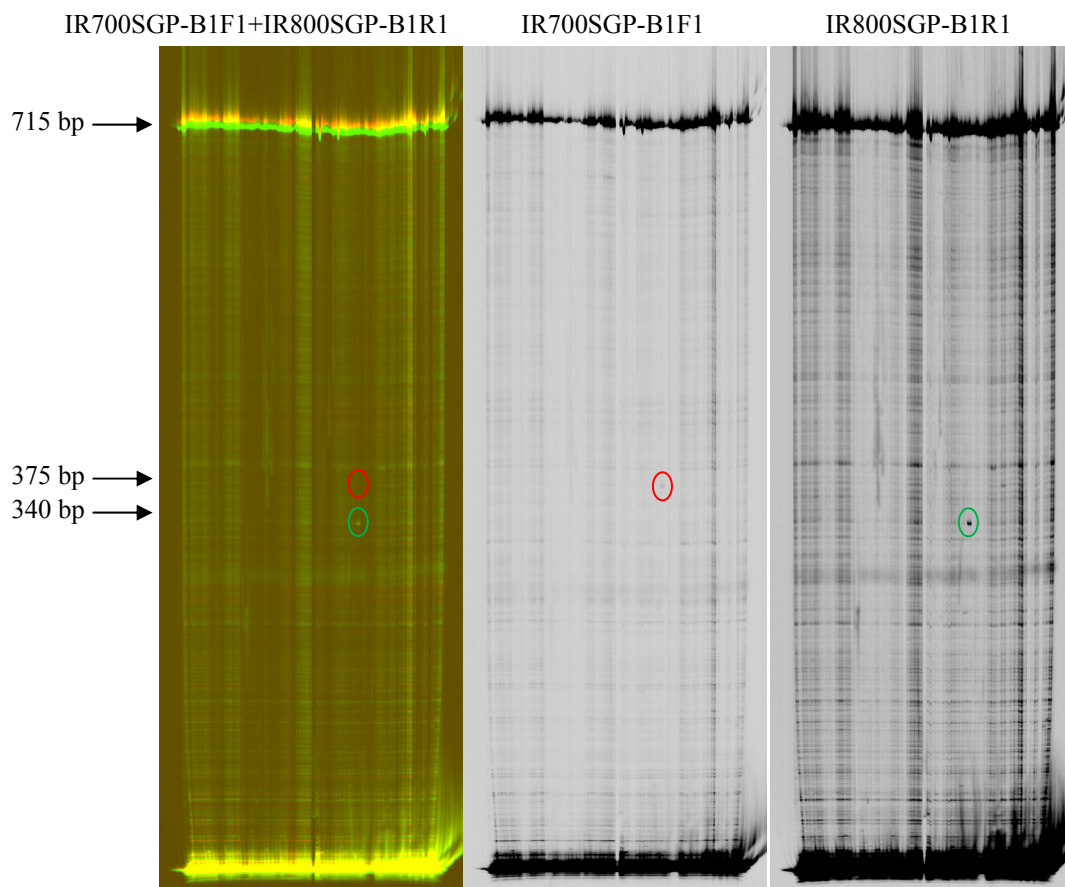


Figura 4.24 Identificazione di mutazioni indotte mediante la tecnica del TILLING utilizzando una coppia di oligonucleotidi specifici per l'omeoallele *Sgp-B1*, SGP-B1 F1 e SGP-B1 R1. Nel primo pannello è riportata l'immagine ottenuta osservando l'assorbimento agli infrarossi a 700 nm e 800 nm contemporaneamente. Negli altri due pannelli è riportato l'assorbimento nei singoli canali. Le box rosse e verdi indicano le bande degli eteroduplex in seguito alla digestione con l'enzima *CEL I*. La somma delle bande più corte, presenti nella stessa linea e evidenziate con i cerchi rossi e verdi, corrisponde alla banda attesa di 714 paia di basi.

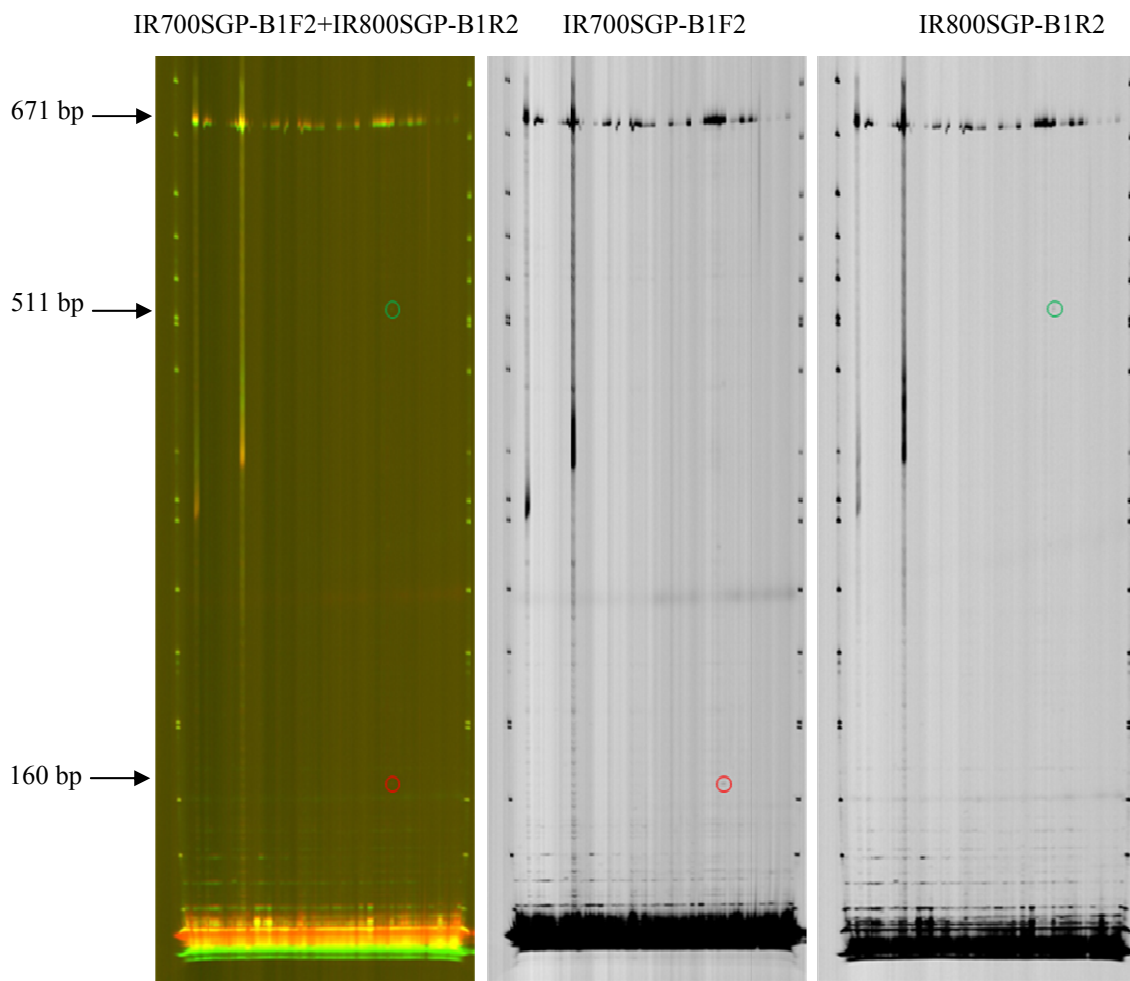


Figura 2.25 Identificazione di mutazioni indotte mediante la tecnica del TILLING utilizzando una coppia di oligonucleotidi specifici per l'omeoallele *Sgp-B1*, SGP-B1 F2 e SGP-B1 R2. Nel primo pannello è riportata l'immagine ottenuta osservando l'assorbimento agli infrarossi a 700 nm e 800 nm contemporaneamente. Negli altri due pannelli è riportato l'assorbimento nei singoli canali. Le box rosse e verdi indicano le bande degli eteroduplex in seguito alla digestione con l'enzima *CEL I*. La somma delle bande più corte, presenti nella stessa linea e evidenziate con i cerchi rossi e verdi, corrisponde alla banda attesa di 671 paia di basi.

La tecnica del TILLING è un potente mezzo non solo per verificare la funzione di un gene, ma soprattutto per produrre nuove varianti alleliche. Questo aspetto è di grande interesse sia per il miglioramento genetico che per studi sulla struttura-funzione di proteine di interesse. Inoltre, a differenza degli approcci transgenici, le linee mutagenizzate identificate possono essere utilizzate per la costituzione di varietà commerciali senza i problemi connessi all'impiego delle piante geneticamente modificate.

4.2.2.2 Identificazione di mutanti nulli per i geni *Sgp-1* mediante screening con gel SDS-PAGE

Parallelamente alle analisi TILLING sono state condotte analisi SDS-PAGE per identificare, tramite analisi delle proteine Sgp-1, mutazioni a carico dei corrispondenti geni. In totale sono state analizzate 500 linee della popolazione mutagenizzata sopra descritta allevate a Martonvasar (Ungheria).

Da queste analisi sono stati identificati 3 linee *Sgp-A1* nulli, 1 linea *Sgp-B1* nulli e 7 linee *Sgp-D1* nulli (Fig. 4.26).

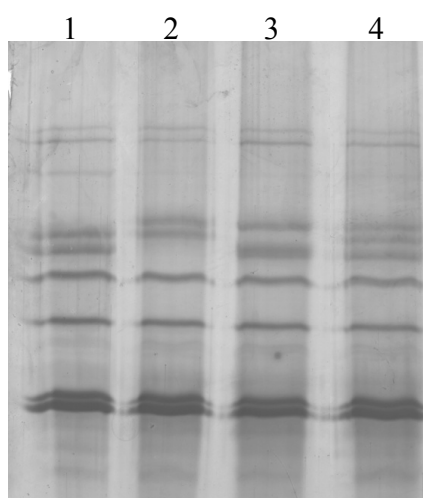


Figura 4.26 SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli estratte da semi di frumento tenero cultivar Cadenza trattati con EMS 1) Mutante *Sgp-A1*⁻, 2) *Sgp-B1*⁻, 3) *Sgp-D1*⁻, 4) Cadenza parentale.

4.2.3 Sovraespressione del gene *Wx-B1*

Un'altra strategia seguita per ottenere linee di frumento duro con amido ad alto contenuto di amilosio ha previsto la sovraespressione di uno dei due geni GBSSI responsabili della sintesi dell'amilosio. E' stata scelto il gene che codifica per l'amido sintasi *Wx-B1* perché dalle nostre analisi (vedi paragrafi 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4) risulta che tale enzima ha un ruolo predominante nella sintesi dell'amilosio rispetto alle altre isoforme.

4.2.3.1 Isolamento e clonaggio del gene *Wx-B1*

Il gene è stato isolato mediante RT-PCR su RNA estratto da cariossidi immature (20 DPA) della cultivar di frumento duro Svevo. Per l'amplificazione si è provato ad utilizzare la coppia di oligonucleotidi, *XhoWxF* e *XbaWxR*, che amplifica solo la regione codificante e che aggiunge i siti di restrizione *XhoI* e *XbaI*, rispettivamente al 5' e al 3' del gene; ma non è stato ottenuto l'amplicone atteso. Così è stata identificata la coppia di oligonucleotidi, *Wx3F* e *Wx1R*, che ha condizioni di PCR migliori ma che amplifica, oltre al gene, anche una porzione delle regioni 5'UTR e 3'UTR. Il gene è stato quindi clonato nel vettore pGem-T Easy (Promega) e successivamente riamplicato con la coppia di primer *XhoWxF* e *XbaWxR*. Il prodotto di PCR, un amplicone di 1815 paia di basi, è stato direttamente digerito con gli enzimi di restrizione *XhoI* e *XbaI* e clonato nel vettore pRDPT5, digerito con *Sall* (lascia estremità adesive compatibili con quelle lasciate da *XhoI*) e *XbaI*.

Una parte del costrutto pRDPT5+*Wx-B1* (Fig. 4.27 A), corrispondente al promotore ed al terminatore, ed il gene *Wx-B1* sono stati sequenziati (Fig. 4.28; Fig. 4.29 e Fig.4.30). Il sequenziamento è stato effettuato in entrambe le direzioni per due volte per assicurarsi che non fossero state prodotte mutazioni durante l'amplificazione di PCR o durante la replicazione del plasmide nei batteri.

La sequenza amminoacidica della proteina dedotta ha mostrato un'identità del 100% con una proteina waxy (n° accessione BAA88512) di frumento duro presente in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

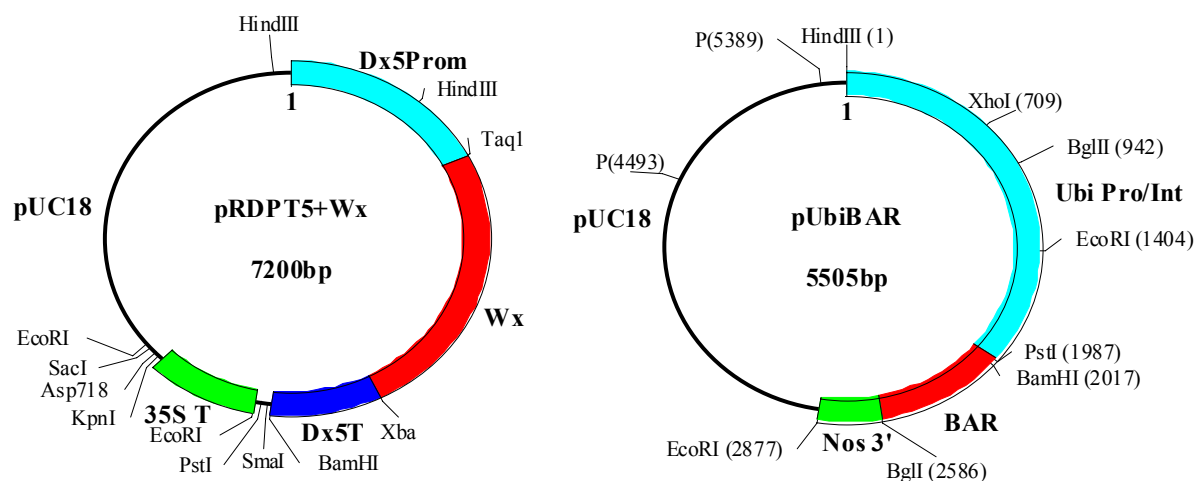


Figura 4.27 Costrutti utilizzati per la trasformazione A) pRDPT+Wx e B) pUbi::BAR.

1	GCATGCAAAT	ATGCAACATA	ATTTCTTTTT	TACTTGGCTA	ATTATATTTG	ATAAATATTT
61	CACAGATATA	CAATAATCAA	ACACAATAAA	TCATATGTGT	TTTTAGTTTT	AGTTCTCATA
121	TCCAAATATA	CAATAGCTAA	CCAAATCTCA	TCGGGAAGTT	AGCCATGCCG	AGGTAGGTTG
181	TTGCCGGAAT	GTTTTTAGTT	TTAGTTCTCA	TACAACCAA	TCTCATTTCA	ATATATAAAA
241	CATTCCGGCA	ACAAC TTGTG	GCGTACATCT	AGTTACAAGG	GAATATTAGT	GATGGCGTGA
301	GCAAGCGATA	AGGCCAAGGA	GAGAAGAAGT	GCATCGTCTA	CGGAGGCCAG	GGAAAGACAA
361	TGGACATGCA	GAGAGGCAGG	GGCGGGGAAG	AAACACTTGG	AGATCATAGA	AGAAGATAAG
421	AGGTTAAACA	TAGGAGGAGG	ATATAATGGA	CAATTAAATC	TGCGTTAGTT	GAAGTCATTT
481	GGGAAGTAAA	CAAATTTTCT	ATTCTGTGTA	AACCAAACTA	TTTGACGCGG	ATTTTCTCTG
541	AAGATCCTAT	ATTAATTTTA	GACATGGTTT	GGCTAGTTCA	TTTGTCGTGA	AAAGGTGTTT
601	CCATAAGTCC	AAAATTCTAC	CAACTTTTTT	GTATGGCACG	TCATAGCATA	GATAGATGTT
661	GTGAGTCACT	GGATAGATAT	TGTGAGTCAT	AGCATGGATT	CGTGTGCTG	GAAATCCAAC
721	TACATGACAA	GCAACAAAAC	CTGAAATGGG	CTTTAGGAGT	TAACAATTTA	CTTGTTCCAT
781	GCAGGCTACC	TTCCACTACT	CGACATGCTT	AGAAGCTTTG	AGTGGCCGTA	GATTTGCAAA
841	AGCAATGGCT	AACAGACACA	TATTCTGCCA	AACCCCAAGA	AGGATAATCA	CTTTTCTTAG
901	ATAAAAAAGA	ACAGACCAAT	ATACAAACAT	CCACACTTCT	GCAAACAATA	CATCAGAACT
961	AGGATTACGC	CGATTACGTG	GCTTTAGCAG	ACTGTCCAAA	AATCTGTTTT	GCAAAGCTCC
1021	AATTGCTCCT	TGCTTATCCA	GCTTCTTTTG	TGTTGGCAAA	CTGCGCTTTT	CCAACCGATT
1081	TTGTTCTTCT	CGCGCTTTCT	TCTTAGGCTA	AACAAACCTC	ACCGTGCACG	CAGCCATGGT
1141	CCTGAACCTT	CACCTCGTCC	CTATAAAAGC	CTAGCCAACC	TTCACAATCT	TATCATCACC
1201	CACAACACCG	AGCACCACAA	ACTAGAGATC	AATTCATGA	TAGTCCACC	

Figura 4.28 Sequenza nucleotidica del promotore (Dx5Prom) del gene che codifica per la glutenina ad alto peso molecolare Dx5.

```

1      ATGGCGGCTCTGGTCACGTCCCAGCTCGCCACCTCCGGCACCGTCTCGGCATCACCGAC
1      M A A L V T S Q L A T S G T V L G I T D
61     AGGTTCCGGCGTGACAGTTTCCAGGGCGTGAGGCCCGGAACCCGGCGGATGCGGCCCTC
21     R F R R A G F Q G V R P R N P A D A A L
121    GTCATGAGGACTATCGGAGCGAGCGCCCGCCGAAGCAAAGCCGGAAGCGCACCGCGG
41     V M R T I G A S A A P K Q S R K A H R G
181    AGCCGGCGGTGCTCTCCATGGTGGTGC CGGCCACGGGCAGCGCGGCATGAACCTCGTG
61     S R R C L S M V V R A T G S G G M N L V
241    TTCGTCGGCGCCGAGATGGCGCCCTGGAGCAAGACCGGCGGCTCGGCGACGTCCTCGGA
81     F V G A E M A P W S K T G G L G D V L G
301    GGCCTCCCCCAGCCATGGCCGCCAACGGTCACCGGGTCATGGTCATCTCCCCGCGCTAC
101    G L P P A M A A N G H R V M V I S P R Y
361    GACCAGTACAAGGACGCCTGGGACACCAGCGTCGTCTCCGAGATCAAGGTCGCGGACGAG
121    D Q Y K D A W D T S V V S E I K V A D E
421    TACGAGAGGGTGAGGTACTTCCACTGCTACAAGCGCGGGGTGGACCGCGTGTTCGTCGAC
141    Y E R V R Y F H C Y K R G V D R V F V D
481    CACCCGTGCTTCTCTGGAGAAGGTCCGGGGCAAGACCAAGGAGAAGATCTACGGGCCCCGAT
161    H P C F L E K V R G K T K E K I Y G P D
541    GCCGGCACCGACTACGAGGACAACAGCTACGCTTCAGCCTGCTCTGCCAGGCAGCGCTG
181    A G T D Y E D N Q L R F S L L C Q A A L
601    GAAGCACCAGGATCCTGGACCTCAACAACAACCCATACTTTTCTGGACCCTACGGGGAG
201    E A P R I L D L N N N P Y F S G P Y G E
661    GACGTGGTGTTCGTGTGCAACGATTGGCACACGGGCCTTCTGGCCTGCTACCTCAAGAGC
221    D V V F V C N D W H T G L A C Y L K S
721    AACTACGTCCTCAATGGCATCTATATGACGGCCAAGGTGGCGTTCTGCATCCACAACATC
241    N Y Q S N G I Y M T A K V A F C I H N I
781    TCGTACCAGGGCCGCTTCTCCTTCGACGACTTCGCGCAGCTCAACCTGCCCCGACAGGTTT
261    S Y Q G R F S F D D F A Q L N L P D R F
841    AAGTCGTCCTTCGACTTCATCGACGGCTACGACAAGCCGGTGGAGGGGCGCAAGATCAAC
281    K S S F D F I D G Y D K P V E G R K I N
901    TGGATGAAGGCCGGGATCCTGCAGGCCGACAAGGTGCTGACGGTGAGCCCCCTACTACGCT
301    W M K A G I L Q A D K V L T V S P Y Y A
961    GAGGAGCTCATCTCCGGCGAAGCCAGGGGCTGCGAGCTCGACAACATCATGCGCCTCACG
321    E E L I S G E A R G C E L D N I M R L T
1021   GGCATCACCGGCATCGTCAACGGCATGGACGTCAGCGAGTGGGACCCACCAAGGACAAG
341    G I T G I V N G M D V S E W D P T K D K
1081   TTCCTCGCCGTCAACTACGACGTCACCACCGCTTGGAGGGGAAGGCGCTGAACAAGGAG
361    F L A V N Y D V T T A L E G K A L N K E
1141   GCGCTGCAGGCCGAGGTGGGGCTGCCGGTGGACCGGAAGGTGCCCTGGTGGCGTTTCATC
381    A L Q A E V G L P V D R K V P L V A F I
1201   GGCAGGCTGGAGGAGCAGAAGGGCCCCGACGTGATGATCGCCGCCATCCCGGAGATCTTG
401    G R L E E Q K G P D V M I A A I P E I L
1261   AAGGAGGAGACGTCCAGATCGTTCTCCTGGGCACCGGGAAGAAGAAGTTTGAGCGGCTG
421    K E E D V Q I V L L G T G K K K F E R L
1321   CTCAAGAGCGTGGAGGAGAAGTTCCCGAACAAGGTGAGGGCCGTGGTCAAGTTCAACGCG
441    L K S V E E K F P N K V R A V V R F N A
1381   CCGCTGGCTCACCAGATGATGGCTGGCGCCGACGTGCTCGCCGTCACCAGCCGCTTCGAG
461    P L A H Q M M A G A D V L A V T S R F E
1441   CCCTGTGGCCTCATCCAGCTCCAGGGGATGCGCTACGGAACGCCGTGCGCGTGCGCGTCC
481    P C G G L I Q L Q G M R Y G T P C A C A C
1501   ACCGGCGGGCTCGTCGACACTATCGTGGAGGGCAAGACCGGGTTCACATGGGGCCGCTC
501    T G G L V D T I V E G K T G F H M G R L
1561   AGCGTCGACTGTAATGTGGTGAACCGGCCGACGTGAAGAAGGTGGTGACCACCCTGAAG
521    S V D C N V V E P A D V K K V V T T L K
1621   CGCGCCGTCAAGGTCGTCCGCACGCCGGCGTACCATGGGATGGTCAAGAACTGCATGATA
541    R A V K V V G T P A Y H G M V K N C M I
1681   CAGGATCTCTCCTGGAAGGGTCCTGCCAAGAACTGGGAGGACGTGCTTTTGGAAGTGGGT
561    Q D L S W K G P A K N W E D V L L E L G
1741   GTCGAGGGGAGCGAGCCGGGGGTGTCGCGGAAGAGATTGCGCCGCTCGCCATGGAGAAC
581    V E G S E P G V I G E E I A P L A M E N
1801   GTCGCCGCTCCCTGA
601    V A A P *

```

Figura 4.29 Sequenza nucleotidica e amminoacidica dedotta del gene *Wx-B1* isolato mediante RT-PCR ed utilizzato per la trasformazione del frumento duro cultivar Svevo.

```

1      TCTAGAACTC TCTGCAGCTC GCATGGTGCT TAGGCATGCA TGCACCTTAG CTATACAATA
61     AATGTGACGT GTGTTACACAG TTTTTCATGT AACTAGAGTA AAGCCCAGTA ATAATGCAAA
121    ATGAAAAGCT TTTCTGGCTA AAAAAAGAAC AAAACTGGTG CTATATGGTA TGTGCTGCAT
181    GTCTCAGCTC ATTGTCAGCC ACTGAATGCG AACAGACTCC TATATTTTGC ATGCGAAAAA
241    AGAGGGTGTG GCAATATCCC TGGCTAAAAC TAACAACAGT TAGAAGGAAA AAAGAACAGA
301    CCAAAAATGG CTTCTTGGTT TGAGACCTAT CATCATCCAA GCAAGCCTCC AAGGGAAAGG
361    GAAACCGCCA CATTCTTCGG GTGCAGATTA GGGATACGAG AGAACAATTG TCGCTCACC
421    TGTGCCTCCT GCCGCTCCTT CTTACCGCCG GTGAAAATTC TTATCCGGTG ATCGTAATGA
481    TCGGCACGAG AGTGCTCGCC CACTCTCGCG TCGATCCAGC AATTCGATGG GGTGCTGCTG
541    CTCGTGGATT CGTGGTATTC GCACCGTGAA ATGCAGCAGC ATACGCCTCG GGTGCTGCTG
601    CTCGTGGGTT CATGGTCTTC GCACCGTGAA ATGCAGCAGC ATACGCCTCG GGTGCTGCTG
661    CTCGTGGGTT CATGGTCTTC GCACCGTGAA ATGCAGCAGC ATACGCCTCG GATCC

```

Figura 4.30 Sequenza nucleotidica del terminatore (Dx5T) del gene che codifica per la glutenina ad alto peso molecolare Dx5.

4.2.3.2 Produzione delle piante transgeniche

Per la trasformazione è stato scelto il metodo biolistico. In totale sono stati co-bombardati con i plasmidi pRDPT+Wx-B1 e pUBI::BAR (Fig. 4.27) circa 1500 embrioni di due differenti genotipi di frumento duro, Svevo e Svevo *waxy*.

Il plasmide pRDPT+Wx-B1 ha il promotore ed il terminatore della subunità gluteninica ad alto peso molecolare Dx5 ed è stato scelto per l'espressione proprio perchè è endosperma specifico, in quanto non volevamo alterare il metabolismo degli zuccheri nella pianta.

Il plasmide pUBI::BAR contiene, invece, il gene *bar* per la selezione delle piante trasformate su terreno contenente l'erbicida Bialaphos. In questo costrutto il gene *bar* è sotto il controllo del promotore dell'ubiquitina di mais *Ubi1* (Fig. 4.27).

In totale, dalla rigenerazione dei calli su terreno di coltura contenenti il bialaphos, sono state ottenute 60 linee rigeneranti: 26 piante dalla trasformazione della cultivar Svevo e 34 piante dalla trasformazione della linea Svevo *waxy* (Tab. 4.10).

4.2.3.3 Selezione delle piante transgeniche

La presenza del transgene nelle piante T₀ è stata verificata mediante PCR utilizzando una coppia di oligonucleotidi specifica per il costrutto pRDPT+Wx-B1. L'oligonucleotide DxPrF si appaia all'interno del promotore e quello Wx-B1 Rev si appaia, invece, all'interno del gene *Wx-B1*. La porzione amplificata da questa coppia di oligonucleotidi comprende 500 paia di basi della regione del promotore e 400 paia di basi del gene *waxy* (Fig. 4.31). In totale sono state identificate 18 linee transgeniche; 5 linee ottenute dalla trasformazione della cultivar Svevo e 13 linee della linea Svevo *waxy* (Tab. 4.10).

Nelle piante che sono risultate positive è stata verificata la presenza del gene *bar* mediante PCR utilizzando la coppia di oligonucleotidi BAR1 e BAR2, che amplificano una regione di 405 paia di basi (Fig.4.32). Le amplificazioni sono state effettuate su DNA genomico estratto dalle foglie delle linee rigenerate e dal controllo negativo rappresentato dalla cv. Svevo.

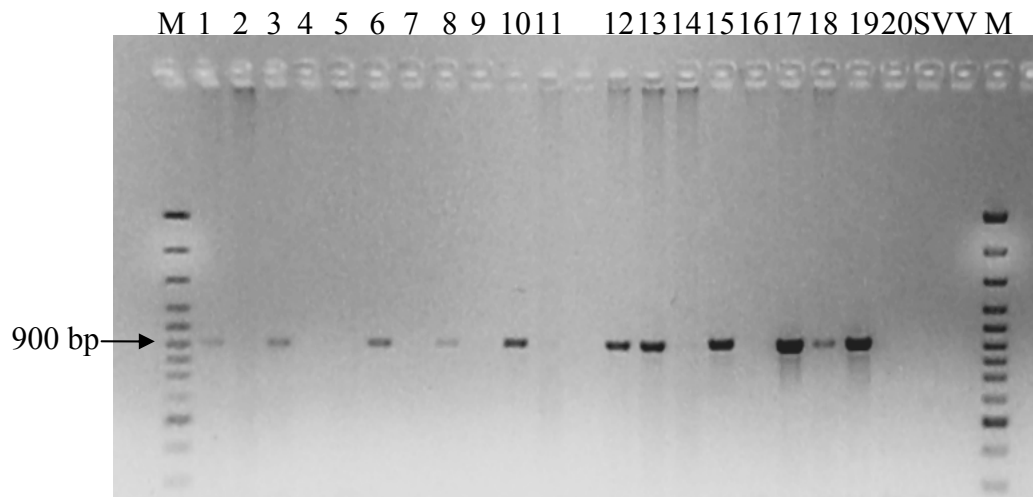


Figura 4.31 Separazione su gel di agarosio all'1.2% del prodotto PCR ottenuto con la coppia di oligonucleotidi DxPrF e Wx-B1 Rev da DNA estratto su una porzione di foglia. M, marcatore di pesi molecolari 100 bp; SV, Svevo; V, controllo negativo costituito da acqua; 1-20, alcune delle linee rigenerate su terreno selettivo nella generazione T₀.

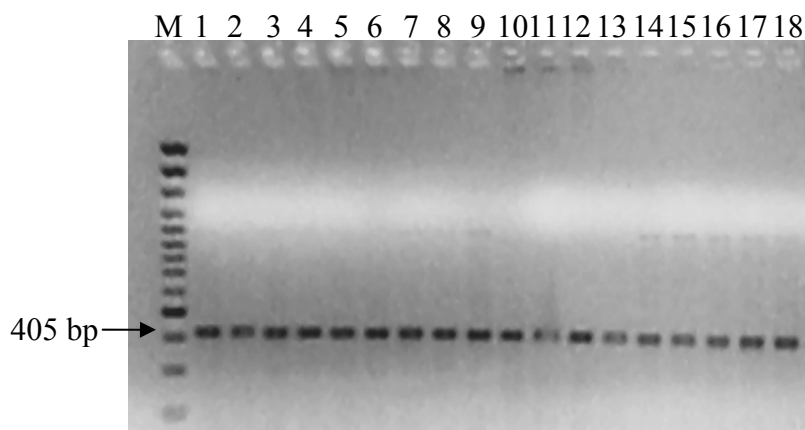


Figura 4.32 Separazione su gel di agarosio all'1.2% del prodotto di PCR ottenuto con la coppia di oligonucleotidi BAR1/BAR2. L'amplicone atteso è di 405 paia di basi.

Tabella 4.10 Piante rigenerate dalla trasformazione di embrioni di frumento duro Svevo (MJ11 e MJ12) e Svevo *waxy* (MJ10). I segni + e – indicano, rispettivamente, la presenza e l'assenza del costrutto utilizzato per la sovraespressione del gene *waxy* e del costrutto pUBI::BAR.

Num	Acc	BAR	Wx	Num	Acc	BAR	Wx
1	MJ10-9b(1)	+	+	31	MJ10-24a	+	-
2	MJ11-1	+	-	32	MJ10-24		+
3	MJ10-7		+	33	MJ10-17a	+	-
4	MJ10-4(1)		-	34	MJ10-21	+	-
5	MJ10-6		-	35	MJ10-16		+
6	MJ12-1		+	36	MJ12-5	+	-
7	MJ11-2b(1)		-	37	MJ10-23	+	-
8	MJ10-12		+	38	MJ10-8		-
9	MJ10-5		-	39	MJ11-5(1)	+	-
10	MJ10-10		+	40	MJ11-5(2)	+	-
11	MJ11-2a		+	41	MJ10-19	+	+
12	MJ10-2a		+	42	MJ12-6a		-
13	MJ10-2(2)		+	43	MJ10-35		-
14	MJ10-13(1)	+	-	44	MJ10-41		-
15	MJ10-4(2)	+	+	45	MJ12-8		-
16	MJ10-13(2)		-	46	MJ12-9		-
17	MJ11-3		+	47	MJ10-39		-
18	MJ10-11b	+	-	48	MJ11-8	+	+
19	MJ10-2(1)		+	49	MJ11-12	+	+
20	MJ10-21a	+	-	50	MJ11-10a		-
21	MJ12-5a	+	-	51	MJ11-9		-
22	MJ10-21b	+	-	52	MJ12-6		-
23	MJ11-2c	+	-	53	MJ10-31		-
24	MJ11-7	+	-	54	MJ10-34		-
25	MJ10-14	+	+	55	MJ10-36	-	-
26	MJ10-18	+	-	56	MJ11-15	-	-
27	MJ10-20	+	-	57	MJ10-37	-	-
28	MJ11-6	+	-	58	MJ10-41a	-	-
29	MJ11-7a	+	-	59	MJ12-14	-	-
30	MJ12-4		-	60	MJ12-12	-	-

4.2.3.4 Caratterizzazione delle piante transgeniche ottenute dal genotipo Svevo

Dalle analisi SDS-PAGE solo due (MJ11-8 e MJ11-12) delle 5 linee transgeniche, generate dalla trasformazione della cultivar Svevo, risultavano sovraesprimere la proteina *waxy* (Fig. 4.33; linee 1 e 2).

Le analisi densitometriche effettuate sulle proteine legate ai granuli estratte dalle cariossidi delle piante T₁ hanno confermato la sovraespressione della proteina Wx-B1 mostrando un incremento da 3 a 4 volte rispetto a quanto osservato in Svevo (Fig 4.34; Tab 4.11).

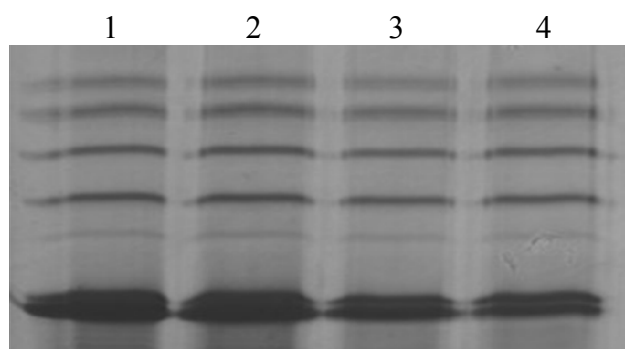


Figura 4.33 SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli estratte da mezzo seme. 1, 2 e 3 linee transgeniche waxy T₀ generate dalla trasformazione del genotipo Svevo. 4) Svevo.

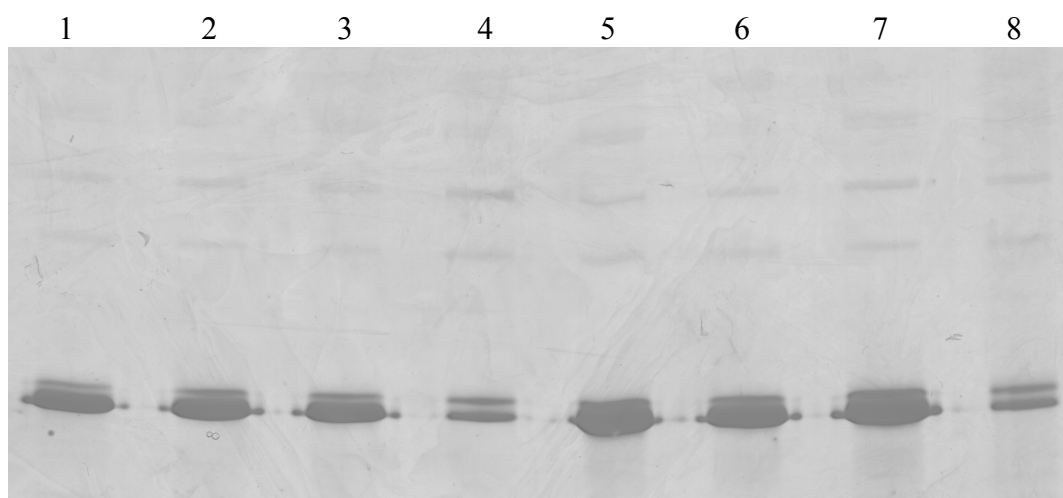


Figura 4.34 SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli estratte da mezzo seme. 1, 2, 3, 5, 6 e 7 linee transgeniche waxy T₁ generate dalla trasformazione del genotipo Svevo. 4 e 8 Svevo.

Tabella 4.11 Analisi densitometrica della proteina Wx-B1. Le linee 4 e 8 corrispondono alle analisi condotte sulle proteine Wx-B1 estratte dal controllo (Svevo). Nelle altre linee sono riportati i valori di intensità relativi alle proteine Wx-B1 estratte dalle cariossidi transgeniche della linea MJ11-12.

1	2	3	4	5	6	7	8
Net Int.	Net Int.	Net Int.	Net Int.	Net Int.	Net Int.	Net Int.	Net Int.
646400	608826	578202	202331	740254	672932	757198	197421

A livello fenotipico non sono state osservate differenze tra le linee transgeniche e la cultivar Svevo, sia per quanto riguarda la struttura della pianta che per quella della cariosside.

Sulla generazione T₂ della linea MJ11-12 sono state eseguite delle analisi per stimare il contenuto di amilosio, ma non sono stati riscontrati cambiamenti rispetto alla cultivar Svevo.

Le caratteristiche chimico-fisiche dell'amido presenti in questa linea transgenica sono state valutate attraverso analisi RVA. Anche in questo caso non sono state notate differenze rispetto a Svevo (Fig. 4.35). L'assenza di differenze in contenuto in amilosio e RVA potrebbe essere dovuto al fatto che l'ADP-glucosio costituisce un fattore limitante per gli enzimi waxy, dato che c'è una competizione per questo substrato tra gli enzimi coinvolti nella sintesi dell'amilosio e quelli della sintesi dell'amilopectina.

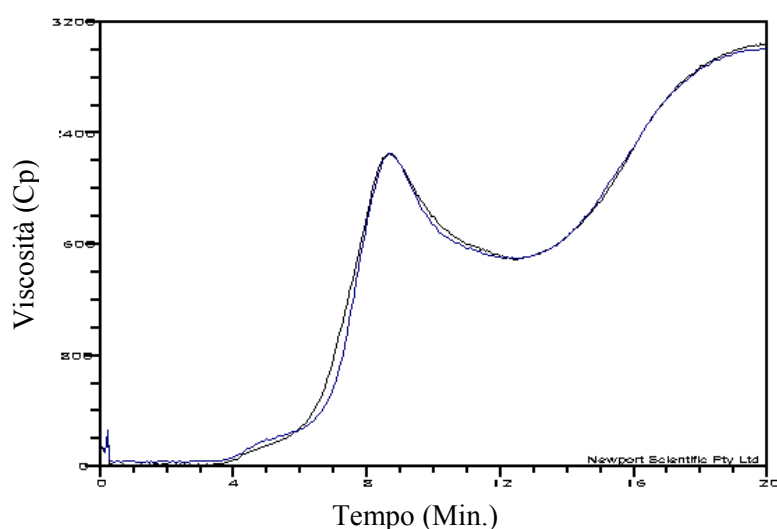


Figura 4.35 Profilo RVA della linea transgenica MJ11-12 e del controllo Svevo. Non è stata notata nessuna differenza a livello di viscosità tra i due campioni analizzati, sembrano infatti essere due repliche perfette.

4.2.3.5 Caratterizzazione delle piante transgeniche ottenute dal genotipo Svevo waxy

Il genotipo Svevo *waxy* è stato scelto per la sovraespressione del gene *Wx-B1* per due motivi: 1) come controllo per verificare se il costrutto fosse funzionante attraverso la ricomparsa della proteina waxy tra le proteine legate ai granuli; 2) per produrre linee transgeniche con differenti quantità di amilosio,

dipendenti dal numero di copie del transgene inserite. Sui semi delle 13 linee transgeniche prodotte è stata condotta un'analisi fenotipica (Fig. 4.36).

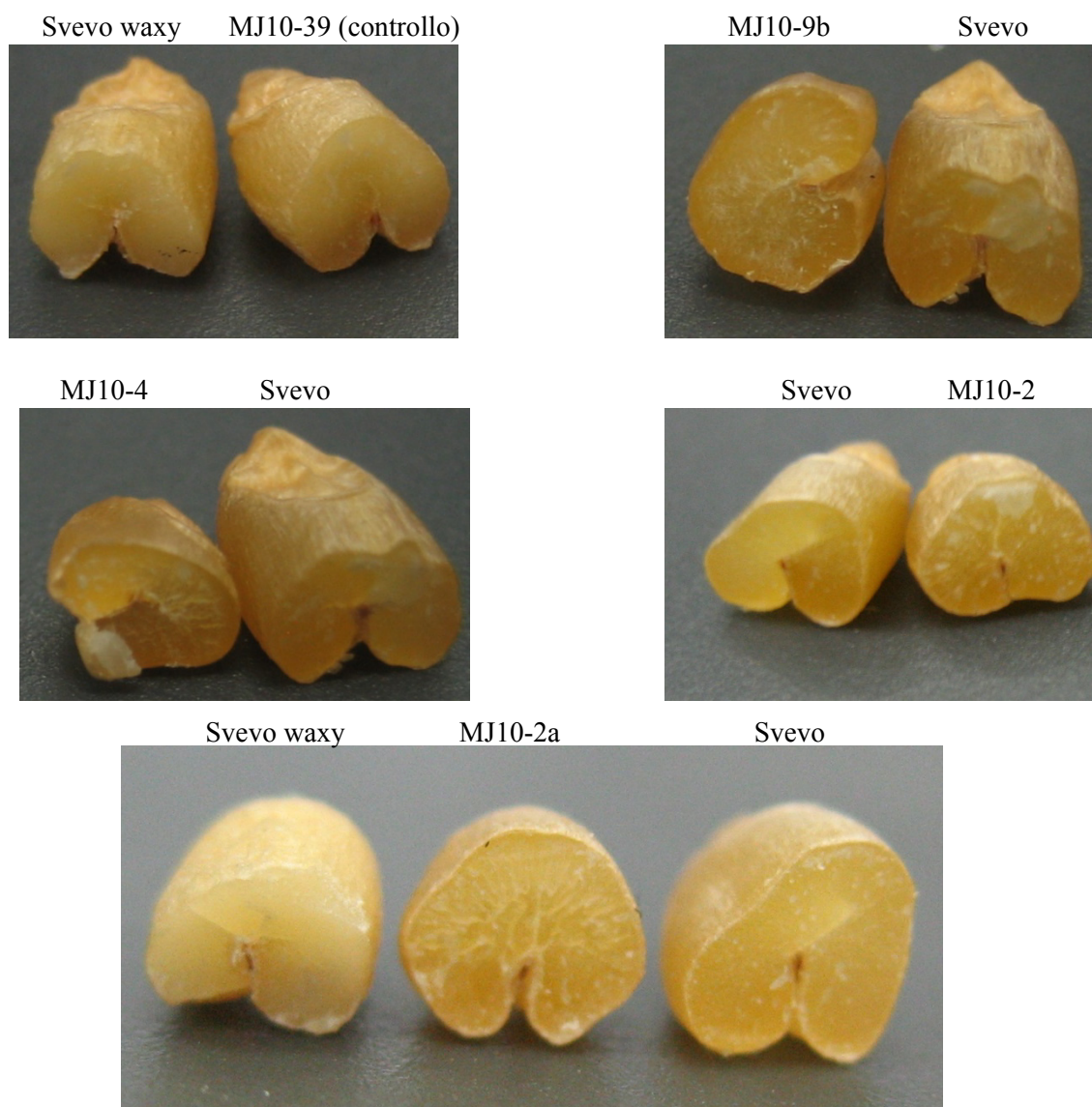


Figura 4.36 Analisi fenotipica su mezze cariossidi delle linee transgeniche ottenute dalla trasformazione di Svevo waxy. Si nota, chiaramente, come le cariossidi transgeniche hanno un fenotipo più simile a Svevo che a Svevo waxy.

Le cariossidi della linea Svevo *waxy* presentano un caratteristico aspetto ceroso e sono facilmente distinguibili da quelle della cultivar Svevo, che hanno un aspetto vitreo.

Nelle piante sovraesprimenti la proteina Wx-B1 era atteso il ripristino del fenotipo vitreo tipico del frumento duro, che sintetizza amilosio. Nella figura 4.36 sono riportate mezze cariossidi di alcune delle linee transgeniche ottenute: il fenotipo vitreo di queste cariossidi conferma la presenza della proteina waxy. La presenza del transgene in queste linee è stata confermata sia da analisi PCR che da analisi Southern blotting (Fig. 4.37).

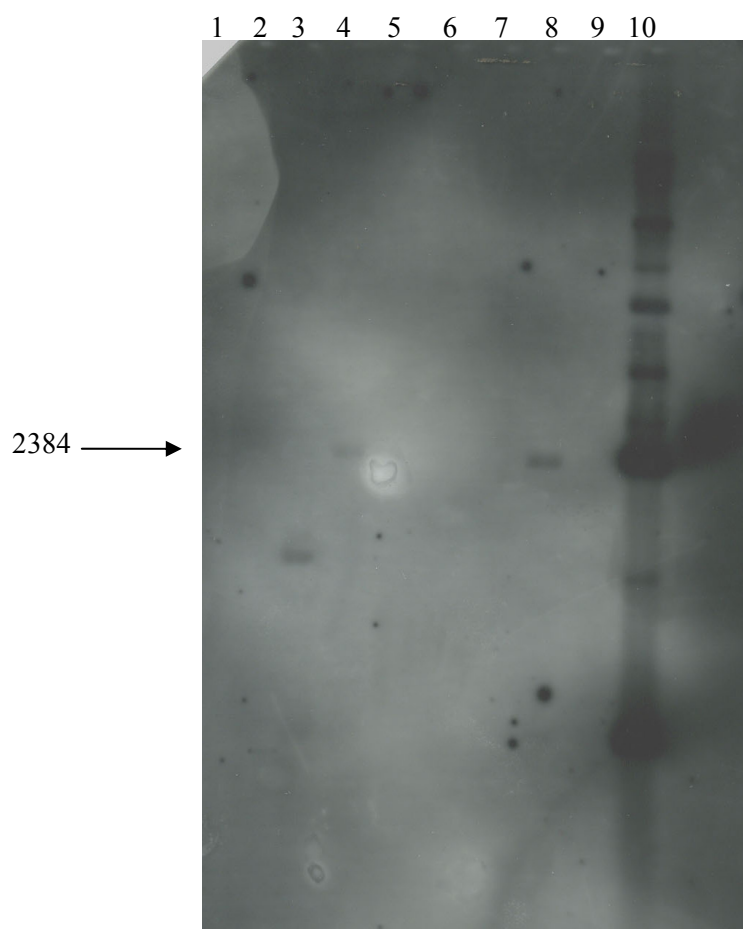


Figura 4.37. Analisi Southern blot di alcune delle linee transgeniche MJ10 che ripristinano il fenotipo vitreo. Il DNA genomico è stato digerito con l'enzima HindIII che taglia il costrutto in 3 punti e produce tre frammenti, di cui uno di 2384 bp corrispondente ad una porzione del promotore, al gene *Wx-B1* ed una porzione del terminatore. Per l'ibridazione è stata utilizzata la sonda ottenuta dall'amplificazione con gli oligonucleotidi Dx5F e Dx5R. La linea 1 corrisponde al controllo negativo (Svevo). Nei pozzetti 4, 8 e 10, corrispondenti alle linee MJ10-2, MJ10-9b e MJ10-2a, c'è la banda attesa di 2384 bp. Nel pozzetto 3, corrispondente alla linea MJ10-7, c'è l'ibridazione ma la banda risulta essere di circa 1600-1700 bp, mostrando una delezione di circa 600-700 bp: infatti in questa linea il fenotipo non risulta essere ripristinato.

Le proteine estratte dai granuli di amido delle cariossidi transgeniche sono state analizzate mediante SDS-PAGE. Dato che nei semi delle piante transgeniche era stato ripristinato il fenotipo normale, ci si aspettava che, in queste linee, la proteina Wx-B1 fosse presente sui granuli. Ma in tutte le cariossidi analizzate (5 per ognuna delle 13 linee transgeniche), la proteina Wx-B1 non è stata trovata tra le proteine legate ai granuli (Fig. 4.38). Nelle cariossidi transgeniche è presente sicuramente attività waxy poiché il fenotipo è tipico delle piante che sintetizzano amilosio, quindi è stato ipotizzato che la proteina sovraespressa possa essere localizzata nella frazione solubile e non sui granuli. Una possibile spiegazione a questo evento è che il promotore utilizzato per la trasformazione ha una cinetica differente rispetto a quella del gene waxy e, quindi, la proteina transgenica sintetizzata tardivamente non riesce più a legarsi sul granulo crescente.

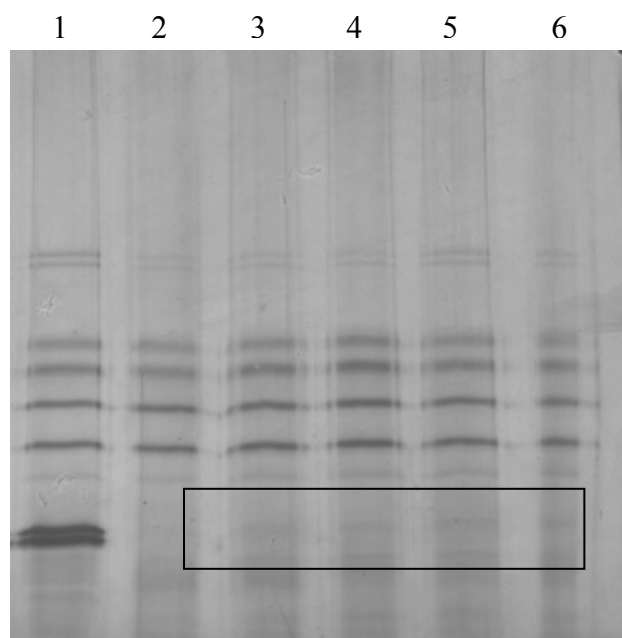


Figura 4.38 SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli estratte dai mezzi semi delle linee transgeniche ottenute dalla trasformazione del frumento duro Svevo *waxy*. 1 Svevo, 2 Svevo *Waxy*, 3, 4, 5 e 6 linee transgeniche.

4.2.4 Silenziamento dei geni che codificano per enzimi di ramificazione di classe IIa mediante RNA interference

Un'altra strategia adottata per ottenere linee con un elevato contenuto di amilosio ha previsto il silenziamento dei geni coinvolti nella sintesi dell'amilopectina. Regina *et al.* (2006) hanno prodotto delle linee transgeniche "high amylose" di frumento tenero in cui i geni che codificano per gli enzimi BEIIa sono stati silenziati mediante RNAi.

In questo lavoro di Tesi, similamente, sono stati silenziati, mediante RNAi, i geni che codificano per questi enzimi in due differenti cultivar di frumento duro e con due differenti tecniche di trasformazione. Gli embrioni della cultivar Svevo sono stati trasformati attraverso il metodo biolistico; quelli della cultivar Ofanto mediante la tecnica che prevede l'utilizzo dell' *Agrobacterium tumefaciens*.

4.2.4.1 Trasformazione genetica del frumento duro mediante metodo biolistico

4.2.4.1.1 Preparazione del costrutto

Per il silenziamento genico degli enzimi di ramificazione di classe IIa, un frammento del gene *SBEIIa* (536 bp), corrispondente ai primi 3 esoni, ed il 3° introne del gene *SBEIIa* (514 bp) sono stati isolati, rispettivamente, mediante RT-PCR da RNA estratto da cariossidi immature (7 DPA) della cultivar di frumento duro Svevo e mediante PCR sul DNA genomico della medesima cultivar. Il frammento di 536 paia di basi è stato amplificato con la coppia di oligonucleotidi SalXbacDNAF e XhoKpncDNAR, che aggiungono alle estremità 5' e 3' dell'amplicone i siti di restrizione *Sall*-*Xba*I e *Xho*I-*Kpn*I. Il frammento di 514 bp è stato, invece, amplificato con gli olinucleotidi SalKpnIntF e XbaXhoIntR, che aggiungono i siti di restrizione *Sall*-*Kpn*I e *Xba*I-*Xho*I alle estremità 5' e 3' dell'amplicone. Sfruttando i siti di restrizione introdotti è stato possibile, quindi, inserire il cDNA, corrispondente ai primi 3 esoni, nel plasmide pRDPT sia in direzione senso che antisenso. I due frammenti sono distanziati dall'introne, che svolge, quindi, il ruolo di *loop* (Fig.4.39).

L'intera cassetta è stata sequenziata per verificare che non ci fossero delezioni o sostituzioni di basi (Fig.4.40).

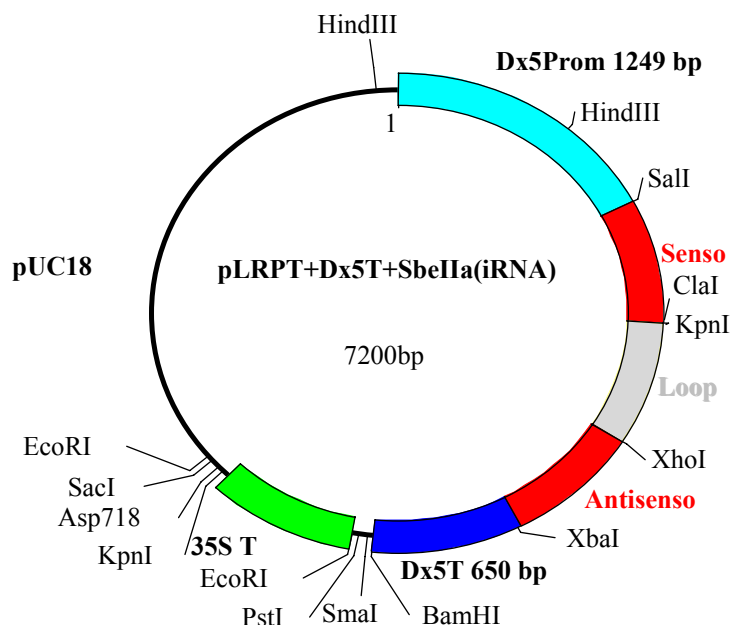


Figura 4.39 Costrutto utilizzato per la trasformazione con il metodo biolistico per il silenziamento genico mediante RNA *interference* dei geni che codificano per gli enzimi di ramificazione di classe IIa.

```

1      GCGGGTTGAG TGAGATCTGG GCCACTGACC GACTCACTCG CTGCGCGGGG ATGGCGACGT
61     TCGCGGTGTC CGGCGCGACC CTCGGTGTGG CGCGGCCCGC CAGCGCCGGC GGCGGACTGC
121    TGCGATCCGG CTCGAGACGG AGGGGCAGGG TGGACTTGCC GTCGCTGCTC CTCAGGAAGA
181    AGGACTCCTC TCGCGCCGTC CTGAGCCGCG CGGCCTCTCC AGGGAAGGTC CTGGTGCCCTG
241    ACGGTGAGAG CGACGACTTG GCGGCCACTC CAGCGCAACC CGAAGAATTA CAGATACCTG
301    AAGATATCGA GGAGCAAACG GCTGAAGTGA ACATGACAGG GGGGACCGCA GAGAAACTTG
361    AATCTTCAGA ACCGACTCAG GGCATTGTGG AAACAATCAC TGATGGTGTA ACCAAAGGAG
421    TTAAGGAACT AGTCGCGGGG GAGAAACCGC GAGTTGTCCC AAAACCAGGA GATGGGCAGA
481    AAATATACGA GATTGACCCA ACGCTGAAAG ATTTTCGGAG CCATCTTGAC TACCGAATCG
541    ATGGTACCGC AGAAAAATATA CGAGATTGAC CCAACGCTGA AAGATTTTCG GAGCCATCTT
601    GACTACCGGT AATGCCTACC CGCCTACTTT CGCTCATTTT GAATTAAGGT CCTTTCGTCA
661    TGCAAATTTG GGAACATCA AAGAGACAAA GACTAGGGAC CACTATTTCT TACAGTTCCC
721    CTCATGGTCT GAGAATATGC TGGGACGTAG ATGTATAATT GATGGCTACA ATTTGCTCAT
781    AATTACGATA CAAATAACTG TCTCTGAGCA CTGCAATTAC AGAGTGCGAA ACTGATTAAA
841    ATGTGATAGA TGGGTTATAG ATTTTACTTT GCTAATTCCT CTACCAAATT CCTGGGGAAA
901    AAAATCTACC AGTTGGGCAA CTTAGTTTCT TATCTTTGTT GCCTCTTTGT TTTGGGGAAA
961    ACACACTGCT AAATTTGAAT GATTTTGGGT ATGCCTCCGT GGATTCAACT AGATACAGCG
1021   AATACAGGAG AATTCGTGCT GCTATTGACC AACATGAAGG GGCTCGAGTC GGTAGTCAAG
1081   ATGGCTCCGA AAATCTTTCA GCGTTGGGTC AATCTCGTAT ATTTTCTGCC CATCTCCTGG
1141   TTTTGGGACA ACTCGCGGTT TCTCCCCCGC GACTAGTTCC TTAACTCCTT TGGTTACACC
1201   ATCAGTGATT GTTTCACAA TGCCCTGAGT CGGTTCTGAA GATTCAAGTT TCTCTGCGGT
1261   CCCCCCTGTC ATGTTCACTT CAGCCGTTTG CTCTCGATA TCTTCAGGTA TCTGTAATTC
1321   TTCGGGTTGC GCTGGAGTGG CCGCCAAGTC GTCGCTCTCA CCGTCAGGCA CCAGGACCTT
1381   CCCTGGAGAG GCCGCGCGGC TCAGGACGGC GCGAGAGGAG TCCTTCTTCC TGAGGAGCAG
1441   CGACGGCAAG TCCACCCTGC CCTCCGCTC CGAGCCGGAT CGCAGCAGTC CGCCGCCGGC
1501   GCTGGCGGGC CGCGCCACAC CGAGGGTCGC GCCGGACACC GCGAACGTCG CCATCCCCGC
1561   GCAGCGAGTG AGTCGGTCAG TGGCCCAGAT CCACTCAAC CCGC

```

Figura 4.40 Sequenza nucleotidica della cassetta senso-loop-antisense inserita nel plasmide pRDPT5 per il silenziamento dei geni *SbeIIa*.

4.2.4.1.2 Trasformazione genetica

Circa 3000 embrioni della cultivar di frumento duro Svevo sono stati co-trasformati con i costrutti pRDPT+SBEIIa (RNAi) e pUBI::BAR mediante il metodo biolistico. Dalla trasformazione sono state rigenerate 124 piante, di cui sono risultate transgeniche 48 (Tab. 4.12). Lo screening è stato effettuato con una coppia di oligonucleotidi specifici per una porzione del promotore Dx5Prom (Dx5F e Dx5R), che amplifica una regione di 495 paia di basi (Fig. 4.41) e con una coppia specifica per il gene *bar*, che amplifica una regione di 405 paia di basi (Fig. 4.42). Con quest'ultima coppia sono state analizzate solo 30 delle 124 piante rigenerate.

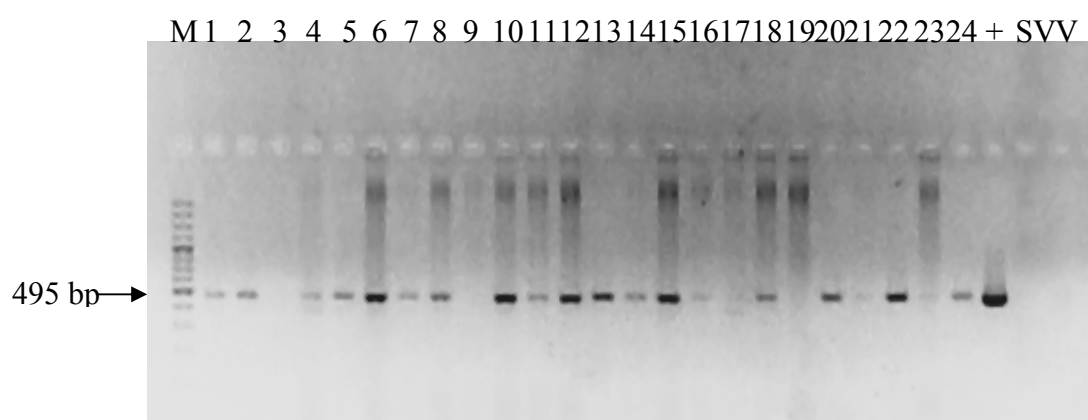


Figura 4.41 Separazione su gel di agarosio all'1.2% del prodotto PCR ottenuto con la coppia di oligonucleotidi Dx5F e Dx5R da DNA estratto su una porzione di foglia. M, marcatore di pesi molecolari 100 bp; SV, Svevo; V, controllo negativo costituito da acqua; + controllo positivo costituito dal plasmide pRDPT+SBEIIa (RNAi); 1-24, alcune delle linee rigenerate su terreno selettivo nella generazione T₀.

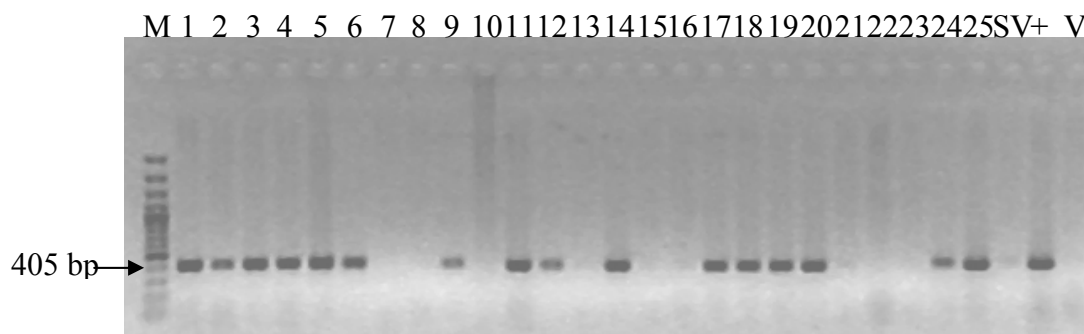


Figura 4.42 Separazione su gel di agarosio all'1.2% del prodotto di PCR ottenuto con la coppia di oligonucleotidi BAR1/BAR2. M, marcatore di pesi molecolari 100 bp; SV, Svevo; V, controllo negativo costituito da acqua; + controllo positivo costituito dal plasmide pUBI::BAR; 1-25, alcune delle linee rigenerate su terreno selettivo nella generazione T₀.

Tabella 4.12 Tabella riassuntiva delle piante transgeniche rigenerate dalla trasformazione con il costrutto pRDPT+SBEIIa(RNAi). Le analisi per individuare il gene *bar* non sono state condotte su tutte le linee rigenerate, ma ne sono state scelte, casualmente, 30.

camp	pianta	culmo	Gene target	UBI::BAR	camp	pianta	culmo	Gene target	UBI::BAR
1	MJ-16-1		+	+	77	MJ-16-81		-	
2	MJ-16-2	I	-	+	78	MJ-16-87	I	-	
3		II	-	+	79		II	-	
4	MJ-16-2a	I	-		80	MJ-16-88		-	
5		II	-	-	81	MJ-16-90		+	
6	MJ-16-3a	I	+		82	MJ-16-92		+	
7		II	+		83	MJ-16-94a		-	
8	MJ-16-4a		-	-	84	MJ-16-95		+	
9	MJ-16-4b		-	+	85	MJ-16-95a	I	-	
10	MJ-16-5a		-	-	86		II	-	
11	MJ-16-6b		-	-	87	MJ-16-96	I	+	
12	MJ-16-8a		-	-	88		II	+	
13	MJ-16-8c		+	+	89	MJ-16-97		-	
14	MJ-16-10		-		90	MJ-16-98		+	+
15	MJ-16-13b		-		91	MJ-16-99		-	
16	MJ-16-15		-		92	MJ-16-100		-	
17	MJ-16-17	I	-		93	MJ-16-102		-	
18		II	-		94	MJ-16-104		+	
19	MJ-16-18	I	-		95	MJ-16-106		+	
20		II	-		96	MJ-16-111		-	
21	MJ-16-20a		-	-	97	MJ-16-112		+	
22	MJ-16-20b		+		98	MJ-16-114		+	
23	MJ-16-21		-		99	MJ-16-115		-	
24	MJ-16-22b		-		100	MJ-16-116		+	+
25	MJ-16-26		-		101	MJ-16-118		-	
26	MJ-16-27		+		102	MJ-16-119		+	
27	MJ-16-28		-		103	MJ-16-120		-	-
28	MJ-16-32	I	+		104	MJ-16-123		-	
29		II	-		105	MJ-16-124a		-	
30	MJ-16-33	I	-	+	106	MJ-16-127		+	+
31		II	-	+	107	MJ-16-128		-	
32	MJ-16-35		-		108	MJ-16-130		-	-
33	MJ-16-38		-		109	MJ-16-131		+	+
34	MJ-16-38a		-		110	MJ-16-134		-	
35	MJ-16-38b		+		111	MJ-16-134a		-	
36	MJ-16-39		+	+	112	MJ-16-135		-	
37	MJ-16-41b		-		113	MJ-16-136	I	-	
38	MJ-16-41c		-		114		II	-	
39	MJ-16-44	I	+		115	MJ-16-139a		-	
40		II	-		116	MJ-16-140	I	+	
41	MJ-16-45		-		117		II	+	
42	MJ-16-46		-	-	118	MJ-16-141		-	
43	MJ-16-47		-		119	MJ-16-144	I	-	
44	MJ-16-49	I	+		120		II	+	
45		II	-		121	MJ-16-145	I	-	
46	MJ-16-50		+		122		II	-	
47	MJ-16-51		-		123	MJ-16-147		-	
48	MJ-16-54a		+		124	MJ-16-149		+	
49	MJ-16-54b		-		125	MJ-16-150	I	+	
50	MJ-16-55a	I	-		126		II	+	
51		II	-		127	MJ-16-154		+	
52	MJ-16-56		-	+	128	MJ-16-157	I	+	
53	MJ-16-57		-		129		II	-	
54	MJ-16-58c		-		130	MJ-16-159		+	
55	MJ-16-58d		-		131	MJ-16-161	I	+	
56	MJ-16-59	I	+		132		II	-	
57		II	-		133	MJ-16-166		+	
58	MJ-16-60a	I	+	+	134	MJ-16-170		+	
59		II	-	-	135	MJ-16-170a		+	
60	MJ-16-61	I	-	-	136	MJ-16-176	I	+	
61		II	-	+	137		II	+	
62	MJ-16-63		-		138	MJ-16-177		-	
63	MJ-16-64	I	+		139	MJ-16-178		-	
64		II	-		140	MJ-16-189		+	
65	MJ-16-66		-		141	MJ-16-191		+	
66	MJ-16-68		-		142	MJ-16-192		-	
67	MJ-16-69		+		143	MJ-16-193		+	
68	MJ-16-70		-		144	MJ-16-195		+	
69	MJ-16-71		-		145	MJ-16-199		+	
70	MJ-16-73		-		146	MJ-16-200	I	-	
71	MJ-16-74		-		147		II	+	
72	MJ-16-75		-		148	MJ-16-207		-	
73	MJ-16-77		+		149	MJ-16-209		-	
74	MJ-16-78		-	+	150	MJ-16-213		-	
75	MJ-16-79		-		151	MJ-16-214a		-	
76	MJ-16-80		-		152	MJ-16-215		-	

4.2.4.1.3 Analisi SDS-PAGE delle piante transgeniche

Le isoforme BEIIa sono presenti, essenzialmente, nella frazione solubile, ma Regina *et al.* (2006) hanno dimostrato che, anche, le proteine BEIIb (enzimi legati ai granuli e corrispondenti alle proteine Sgp-2) risultavano assenti nelle linee transgeniche in seguito al silenziamento con l'RNAi dei geni *BEIIa*. Quindi, tramite SDS-PAGE, sono state analizzate le proteine legate ai granuli estratte dalle cariossidi transgeniche ottenute dalle piante T₀ risultate positive alle analisi PCR.

Sono stati analizzati in totale 18 semi: 4 provenienti dalla pianta transgenica MJ-16-119; 4 da MJ-16-114; 2 da MJ-16-170a; 4 da MJ-16-112 e 4 da MJ-16-92.

Ci aspettavamo di evidenziare una minore intensità delle bande relative alle proteine Sgp-2, corrispondenti agli enzimi di ramificazione, ed, invece, sono comparse due bande anomale, nella regione compresa tra le proteine Sgp-2 e Sgp-3 (Fig. 4.43).

Dato che le isoforme SBEIIa, che abbiamo silenziato in questo lavoro, sono, principalmente, presenti nella frazione solubile, saranno necessarie ulteriori analisi per dimostrare l'assenza di queste proteine nelle piante transgeniche prodotte, utilizzando un anticorpo specifico.

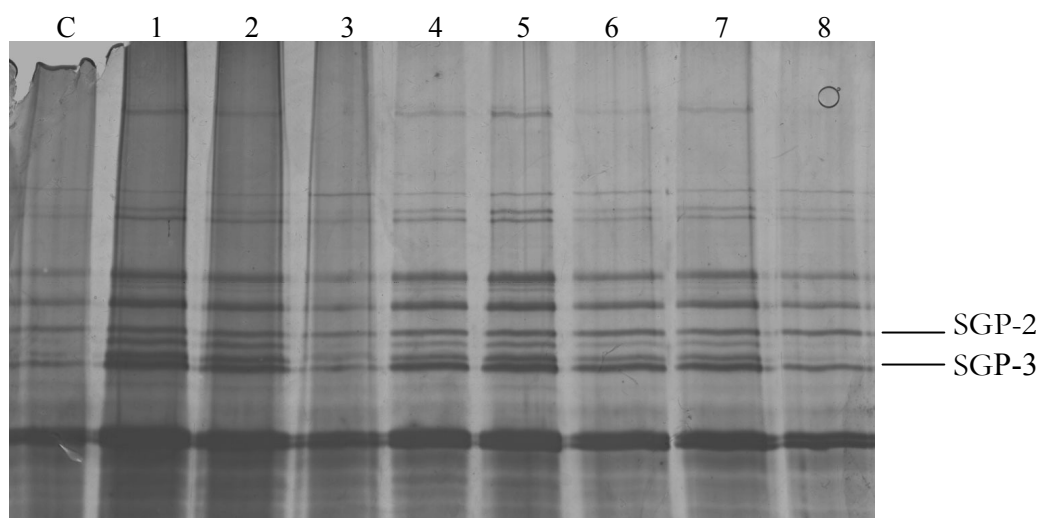


Figura 4.43 Fenotipo elettroforetico delle proteine legate ai granuli estratte dalle cariossidi transgeniche ottenute dalla trasformazione del frumento duro Svevo. C è il controllo (Svevo). I campioni che mostrano un *pattern* anomalo sono i numeri 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.

4.2.4.2 Trasformazione mediante *A. tumefaciens*

4.2.4.2.1 Preparazione del costrutto

La cassetta utilizzata per il silenziamento con il metodo biolistico, costituita dal promotore Dx5, dal frammento SbeIIa (RNAi) e dal terminatore della subunità Dx5, è stata inserita nel vettore pG-UB (digerito con l'enzima *Sma*I e defosforilato) attraverso un taglio enzimatico del plasmide pRDPT5+SBEIIa (RNAi) con gli enzimi di restrizione *Sma*I e *Hpa*I. Il vettore pG-UB ci è stato fornito dal centro di ricerca di Rothamsted (Harpenden, Uk) ed ha al suo interno il gene *bar* sotto il promotore dell'ubiquitina. Il plasmide pG-UB+SBEIIa (RNAi) è stato inserito insieme al plasmide pAL154 nel ceppo virulento AGL1 di agrobatterio mediante elettroporazione. Nella figura 4.44 sono riportati i due plasmidi utilizzati per la trasformazione del frumento duro cv Ofanto.

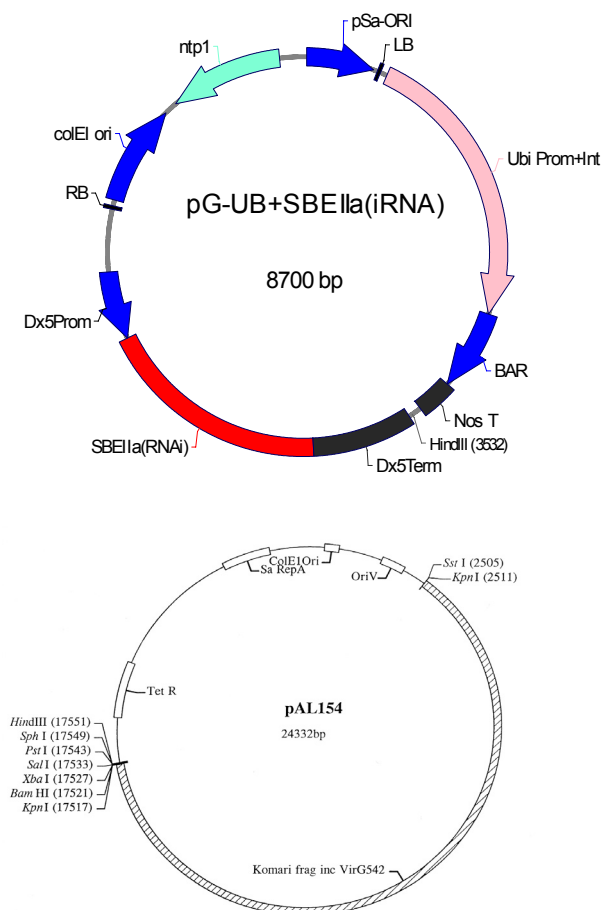


Figura 4.44 Costrutti utilizzati per la trasformazione con l'agrobatterio. **A)** pG-UB+SBEIIa (RNAi). L'espressione del gene *bar* è controllata dal promotore dell'ubiquitina (Ubi Prom), mentre l'espressione del costrutto (SBEIIa RNAi) per il silenziamento dei geni di ramificazione è sotto un promotore endosperma specifico, quello della Dx5. **B)** pAL154. Plasmide che contiene il frammento di Komari per incrementare la virulenza del ceppo e favorire il trasferimento del T-DNA.

4.2.4.2.2 Produzione delle piante transgeniche

1759 embrioni isolati dalla cultivar di frumento duro Ofanto sono stati trasformati con una soluzione in cui è stato risospeso l'agrobatterio contenente i costrutti pUB-G+SBEIIa(RNAi) e pAL154. Dalla trasformazione sono stati rigenerati 955 embrioni, da cui sono state ottenute 13 piante transgeniche, di cui 4 probabili piante sorelle (Tab.4.13). La presenza del costrutto è stata verificata utilizzando una coppia di oligonucleotidi specifica per il costrutto che amplifica un frammento di 495 bp, corrispondente ad una porzione del promotore Dx5Prom, ed una specifica per il gene *bar* (BAR1 e BAR2), che amplifica un frammento di 405 paia di basi (Fig. 4.45). In due piante è stata riscontrata la presenza del gene *bar* ma non quella del promotore della cassetta SBEIIa (RNAi). Una probabile spiegazione a questo evento inatteso è che durante la replicazione del DNA sia avvenuta una ricombinazione che ha portato alla delezione di una parte della cassetta SBEIIa; questi eventi accadono spesso quando ci sono sequenze ripetute invertite. Naturalmente saranno necessarie ulteriori analisi (PCR, Southern blot e sequenziamento) per comprendere che evento si è verificato in queste due linee transgeniche.

Attualmente le piante transgeniche T₀ prodotte sono in camera di crescita presso il centro di ricerca di Rothamsted. La presenza del transgene sarà confermata nelle generazioni successive e l'assenza dell'enzima SBEIIa tra le proteine della frazione solubile sarà verificato attraverso l'uso di un anticorpo specifico per questo enzima.

Tabella 4.13 Resoconto della trasformazione della cultivar Ofanto mediante *A. tumefaciens*.

Piante	N° tot. di embrioni	N° tot. di embrioni rigenerati	N° tot. piante transg.
A424	217	76	1
A426	317	155	1
A428	177	116	3
A430	358	190	1
A431	372	230	5
A432	318	188	2

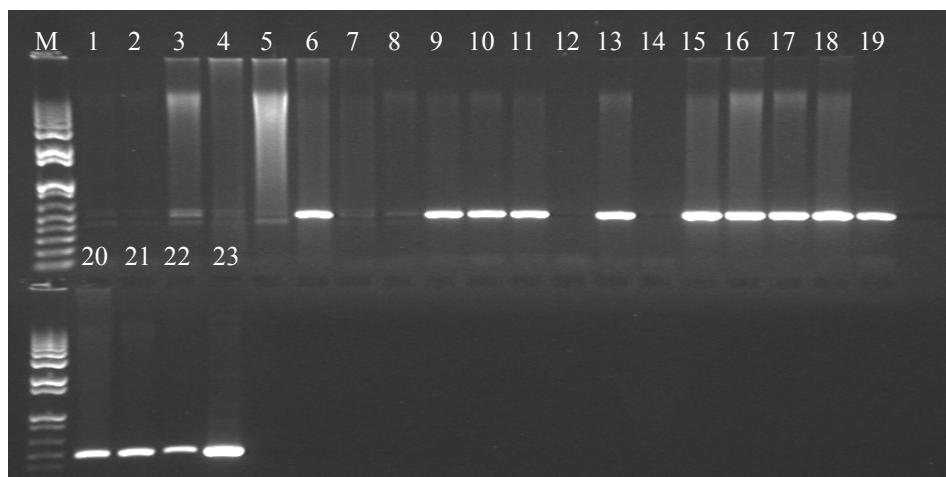
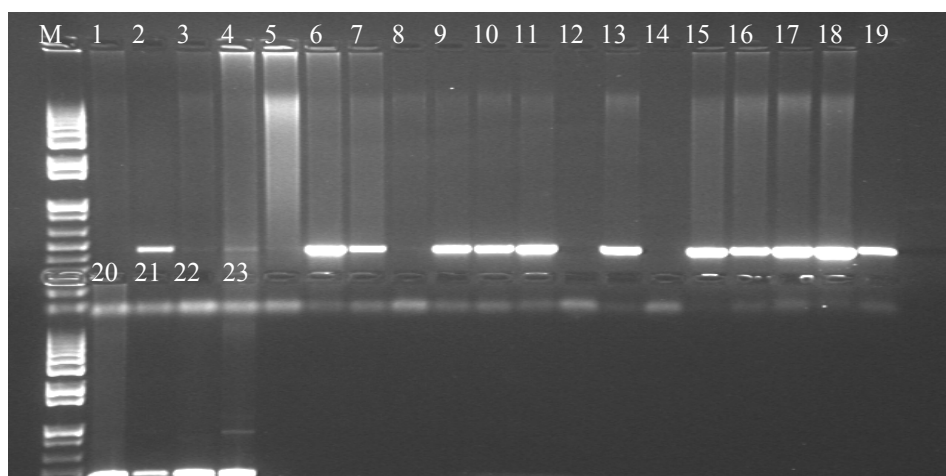
A**B**

Figura 4.45 Separazione su gel di agarosio all'1.2% del prodotto PCR ottenuto con la coppia di oligonucleotidi Dx5F e Dx5R (**A**) e con la coppia BAR1 e BAR2 (**B**) da DNA estratto su una porzione di foglia delle piante T_0 . M, marcatore di pesi molecolari 100 bp; 1) A424Of controllo, 2) A424 Of1 P1a, 3) A424 Of2 P1a, 4) A424 Of2 P2a, 5) A426Of controllo, 6) A426 Of1 P1a, 7) A426 Of1 P3a, 8) A428 Of controllo, 9) A428 Of1 P1a, 10) A 428 Of1 P2a, 11) A 428 Of2 P1, 12) A430 controllo, 13) A430 Of6 P1, 14) A431 Of1 P2, 15) A431 Of4 P1a, 16) A431 Of4 P2a, 17) A431 Of4 P3a, 18) A431 Of4 P4, 19) A431 Of4 P5, 20) A431 Of3 P1, 21) A432 Of1 P1a, 22) A432 Of1 P2a, 23) controllo positivo costituito dal plasmide pGUB+SBEIIa(RNAi).

CONCLUSIONI

5 CONCLUSIONI

Nell'ultimo decennio l'interesse nei confronti dell'amido è notevolmente cresciuto sia per le applicazioni industriali che per la possibilità di produrre alimenti funzionali. A livello industriale l'amido trova applicazione in numerosi settori ed è un componente essenziale di un'ampia gamma di prodotti. Quindi, si sta cercando di modificare la sua composizione per produrre amidi con proprietà specifiche per le diverse applicazioni che sono fortemente richieste dall'industrie di settore.

Una miglior comprensione del ruolo dei geni coinvolti nelle vie biosintetiche dell'amido ha aperto degli orizzonti impensabili fino a qualche anno fa ed ha permesso di intervenire in modo mirato per modificare la composizione dell'amido. Durante questo lavoro di Tesi sono stati utilizzati diversi approcci per ottenere amido con caratteristiche innovative, tra cui tecniche tradizionali, la mutagenesi e la trasformazione genetica. Grazie a queste tecniche è stato possibile produrre amido con nuove caratteristiche chimico fisiche, alterando il rapporto tra amilosio e amilopectina.

Un metodo utilizzato è stato quello di produrre delle linee prive delle diverse isoforme per le varie classi enzimatiche, incrociando mediante tecniche tradizionali mutanti naturali identificati nel germoplasma mondiale. Sono stati così ottenuti dei set di mutanti parziali e completi (con tutte le combinazioni alleliche possibili) nei geni che codificano per le amido sintasi *Waxy* e per le amido sintasi *Sgp-1* in frumento duro (cv Svevo) e tenero (linea N11). I mutanti nulli completi *Waxy* e *Sgp-1* presentano un contenuto di amilosio, rispettivamente, del 2-3% e del 35-42%; quindi la porzione di amilosio risulta essere notevolmente diminuita nel mutante *Waxy* (- 91% nel frumento duro e - 96% nel frumento tenero) e considerevolmente aumentata nel mutante *Sgp-1* (+ 90% nel frumento duro e + 30 % nel frumento tenero). Di grande interesse, per le possibili applicazioni industriali, sono i mutanti parziali che hanno un contenuto di amilosio intermedio tra le linee complete e le linee parentali, variabile tra l'1 e il 42%.

Gli amidi a basso contenuto di amilosio possono essere utilizzati nell'industria alimentare poiché gli alimenti da forno e surgelati prodotti con queste linee risultano avere una migliore consistenza e conservabilità (Ellis *et al.*, 1998; Fredriksson *et al.*, 1998; Graybosch, 1998; Slattery *et al.*, 2000; Bhattacharya *et al.*, 2002); inoltre, il pane prodotto con miscele di farine waxy e normali mostrano una "shelf-life" migliore (Hakakawa *et al.*, 2004).

Dal punto di vista applicativo gli amidi ad alto contenuto di amilosio sono, sicuramente, più interessanti, sia per l'influenza benefica che hanno sulla salute umana sia per la produzione di numerosi prodotti, tra cui la pasta e gli snack fritti (Slattery *et al.*, 2000; Soh *et al.*, 2006). La pasta prodotta con semola "high amylose" (+10% di amilosio) assorbe meno acqua durante la cottura mostrando un nervo migliore.

Le proprietà tecnologiche e la qualità delle farine di frumento duro e tenero prodotte e caratterizzate in questo lavoro saranno analizzate nei prossimi anni e per quanto riguarda le linee ad alto contenuto di amilosio saranno valutati anche i possibili effetti benefici sulla salute umana.

Nelle linee *Sgp-1* complete di frumento duro e tenero è stato riscontrato un'alta percentuale di amilosio ma a scapito della resa: infatti i semi risultano essere molto piccoli e raggrinziti. Questo evento potrebbe essere dovuto all'assenza delle proteine Sgp-1 o a caratteri indesiderati che sono stati trasferiti con l'incrocio dal mutante naturale alla cultivar Svevo ed alla linea N11. L'identificazione di mutanti indotti su una cultivar di élite di frumento tenero (Cadenza) e l'incrocio per ottenere il genotipo triplo nulli ci permetterà di verificare se nei semi delle linee Sgp-1 nulli la mancanza delle proteine Sgp-1 provoca una forte diminuzione nella sintesi dell'amido o se quel carattere è dovuto all'incrocio con i mutanti naturali. Lo screening effettuato con la tecnica del TILLING e mediante SDS-PAGE ha portato all'identificazione di mutanti nulli e di nuove varianti alleliche nei geni *Sgp-1*. Le analisi di queste mutazioni puntiformi sono particolarmente utili per studi sulla struttura-funzione di queste amido sintasi e per comprendere quali sono i siti catalitici e i siti di legame ai granuli di amido.

La trasformazione del frumento duro (Svevo) con il gene *Wx-B1* non ha avuto i risultati sperati, in quanto non sono stati riscontrati cambiamenti significativi nel contenuto di amilosio e nelle proprietà chimico-fisiche dell'amido, nonostante la proteina Wx-B1 sia sovraespressa dalle 3 alle 4 volte rispetto al controllo. Una possibile spiegazione è che c'è una carenza di substrato (ADP-Glucosio) per cui l'incremento dell'enzima non produce nessuna variazione. Sarà, quindi, interessante incrociare le linee sovraesprimenti il gene *Wx-B1* con i mutanti *Sgp-1* completi di frumento duro. Se, realmente, l'ADP-Glucosio è limitante, le piante prodotte da questo incrocio dovrebbero avere a disposizione un maggior quantitativo di substrato e, di conseguenza, dovrebbero produrre amidi con un contenuto di amilosio più elevato di quello riscontrato nel genotipo *Sgp-1* completo.

Nelle linee transgeniche sovraesprimenti la proteina Wx-B1 ottenute dalla trasformazione della linea Svevo *Waxy* è stata riscontrato il ripristino del fenotipo Svevo, tipico di semi che hanno un contenuto di amilosio normale, ma non è stata trovata la proteina legata ai granuli. Abbiamo ipotizzato che il promotore della glutenina Dx5 utilizzato per la trasformazione ha una cinetica differente rispetto al promotore del gene *Wx-B1*, così la proteina viene sintetizzata tardivamente e non riesce più a legarsi ai granuli e potrebbe essere presente nella frazione solubile. Questo aspetto verrà approfondito con l'utilizzo di un anticorpo specifico per la proteina waxy, che ci permetterà di stabilire se la proteina transgenica è localizzata nella frazione solubile.

L'ultimo approccio che abbiamo utilizzato per ottenere delle linee di frumento duro ad alto contenuto di amilosio è stato il silenziamento dei geni codificanti per gli enzimi di ramificazione SBEIIa mediante RNAi. Regina *et al.* (2006) con il medesimo approccio in frumento tenero sono riusciti a

produrre piante transgeniche in cui il rapporto tra amilosio ed amilopectina è praticamente invertito (3 a 1 invece che 1 a 3). Per la trasformazione sono state utilizzate due differenti tecniche: la cultivar Svevo è stata trasformata col metodo biolistico e la cultivar Ofanto con l'*Agrobacterium tumefaciens*; sarà interessante valutare l'efficienza del silenziamento dovuto alle due tecniche e se, quindi, l'inserimento di più copie (metodo biolistico) o di una singola copia (Agrobatterio) ha differenti effetti sull'espressione del gene *target*. Ci attendiamo che le linee prodotte abbiano un contenuto di amilosio molto alto (> 70%); questo aspetto sarà investigato negli anni successivi e saranno, inoltre, valutate le caratteristiche chimico-fisiche e le proprietà tecnologiche delle farine transgeniche.

Il gene *BEIIa* è presente, principalmente, nella frazione solubile ma Regina *et al.* (2006) hanno riscontrato che con l'RNAi venivano silenziati anche i geni *BEIIb* che codificano per proteine Sgp-2 localizzate sui granuli di amido. Ci aspettavamo, quindi, di evidenziare una minore intensità delle bande Sgp-2, ed, invece, sono comparse due bande anomale, nella regione compresa tra le proteine Sgp-2 e Sgp-3. Queste analisi sono state effettuate sulle cariossidi delle piante T₀ e sarà necessario confermare questi dati sulle generazioni successive, verificando l'assenza della proteina BEIIa mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

BIBLIOGRAFIA

6 BIBLIOGRAFIA

- Ainsworth C., Clark J., Balsdon J.** (1993). Expression, organization and structure of the genes encoding the waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat. *Plant Mol. Biol.* **22**: 67-82.
- Ainsworth C. , Tarvis M., Clark J.** (1993). Isolation and analysis of a cDNA clone encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat. *Plant Mol. Biol.* **23**: 23-33.
- Altpeter F., Baisakh N., Beachy R., Bock R., Capell T., Christou P., Daniell H., Datta K., Datta S., Dix P.J., Fauquet C., Kohli A., Mooibroek H., Nicholson L., Nguyen T.T., Nugent G., Raemakers K., Romano A., Somers D.A., Stoger E., Taylor N., Visser R.** (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Mol. Breeding* **15**: 305–327.
- Båga M., Nair R.B., Repellin A., Scoles G.J., Chibbar R.N.** (2000). Isolation of a cDNA encoding a granule-bound 152-kilodalton starch-branching enzyme in wheat1. *Plant Physiol.* **124**: 253–264.
- Båga M., Glaze S., Mallard C. S., Chibbar R. N.** (1999a). A starch-branching enzyme gene in wheat produces alternatively spliced transcripts. *Plant Molec. Biol.* **40**: 1019-1030.
- Båga M., Repellin A., Demeke T., Caswell K., Leung N., Abdel-aal E.S.M., Hucl P., Chibbar R.N.** (1999b). Wheat starch modification through biotechnology. *Starch* **51**: 111-116.
- Baldwin P.M.** (2001). Starch granule-associated proteins and polypeptides: A review. *Starch* **53**: 475-503.
- Ball S.G., van de Wal M.H.B.J., Visser R.G.F.** (1998). Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in Plant Sci.* **3**: 462-467.
- Ball S.G. and Morell M.K.** (2003). From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Ann..Rev. Plant Biol.* **54**: 207-233.
- Ballicora M.A., Iglesias A.A., Preiss J.** (2004). ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Regulatory Enzyme for Plant Starch Synthesis. *Photosyn. Res.* **79**: 1-24.
- Balmer Y., Vensel W.H., Cai N., Manieri W., Schurmann P., Hurkman W. J., Buchanan B.B.** (2006). A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 2988-2993.
- Bhattacharya M., Erazo-Castrejón S.V., Doehlert D.C., McMullen M.S.** (2002). Staling of bread as affected by waxy wheat flour blends. *Cereal Chem.* **79**: 178-182.

- Bhave M., Morris C.F.** (2008). Molecular genetics of puroindolines and related genes: regulation of expression, membrane binding properties and applications. *Plant Mol. Biol.* **66**: 221-231.
- Blauth S.L., Kim K.N., Klucinec J., Shannon J.C., Thompson D., Gultinan M.** (2002). Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (sbe1) in *Zea mays* L. *Plant Mol. Biol.* **48**: 287-297.
- Blauth S.L., Yao Y., Klucinec J.D., Shannon J.C., Thompson D.B., Gultinan M.J.** (2001). Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn. *Plant Physiol.* **125**: 1396-1405.
- Blechl A.E. and Anderson O.D.** (1996). Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nat. Biotechnol.* **14**(7): 875-879.
- Blennow A., Engelsén S.B., Nielsen T.H., Baunsgaard L., Mikkelsen R.** (2002). Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends Plant Sci.* **7**: 445-450.
- Blennow A., Hansen M., Schulz A., Jørgensen J., Donald A.M., Sanderson J.** (2003). The molecular deposition of transgenically modified starch in the starch granule as imaged by functional microscopy. *J. Struct. Biol.* **143**: 229-241.
- Bligh H.F.J.** (1999). Genetic Manipulation of starch Biosynthesis: Progress and Potential. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **16**: 177-201.
- Boggini G., Cattaneo M., Paganoni C., Vaccino P.** (2001). Genetic variation for waxy proteins and starch properties in Italian wheat germoplasm. *Euphytica* **119**: 111-114.
- Boren M., Larsson H., Falk A., Jansson C.** (2004). The Barley Starch Granule Proteome - Internalized Granule Polypeptides of the Mature Endosperm. *Plant Sci.* **166**: 617-626.
- Bresolin N.S., Li Z., Kosar-Hashemi B., Tetlow I.J., Chatterjee M., Rahman S., Morell M.K., Howitt C.A.** (2005). Characterisation of disproportionating enzyme from wheat endosperm. *Planta* **224**(1): 20-31.
- Brown I.L.** (1994). High amylose starches - new developments in human nutrition. *Proc. Nutr. Soc. Aust.* **18**: 33-39.
- Brown I.L., Macnamara S., Power L.J., Hazzard K., Mcnaught K.J.** (2000). The use of high amylose maize starch in the preparation of nutritional foods. *Food Aust.* **52**: 22-26.
- Brown I.L., Wang X., Topping D.L., Playne M.J., Conway P.L.** (1998). High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria. *Food Aust.* **50**: 603-610.

- Brown M.A., Storlien L.H., Brown I.L.** (2003). Cooking attenuates the ability of high-amylose meals to reduce plasma insulin concentrations in rats. *Br. J. Nutr.* **90**: 823–827.
- Bulèon A., Colonna P., Planchot V., Ball, S.** (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**: 85–112.
- Burton R.A., Bewley J.D., Smith A.M., Bhattacharyya M.K., Tatge H., Ring S., Bull V., Hamilton W.D.O., Martin C.** (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *Plant J.* **7**: 3-15.
- Burton R.A., Jenner H., Carrangis L., Fahy B., Fincher G.B., Hylton C., Laurie D.A., Parker M., Waite D., van Wegen S., Verhoeven T., Denyer K.** (2002a). Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J.* **31**: 97-112.
- Burton R.A., Johnson P.E., Beckles D.M., Fincher G.B., Jenner H.L., Naldrett M.J., Denyer K.** (2002b). Characterization of the genes encoding the cytosolic and plastidial forms of ADP-glucose pyrophosphorylase in wheat endosperm. *Plant Physiol.* **130**: 1464-1475.
- Bustos R., Fahy B., Hylton C.M., Seale R., Nebane N.M., Edwards A., Martin C., Smith A.M.** (2004). Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 2215-20.
- Champ M.J.** (2004). Physiological aspects of resistant starch and *in vivo* measurements. *J. A.O.A.C.* **87** (3): 749–55.
- Chao S., Sharp P.J., Worland A.J., Warham E.J., Koebner R.M.D., Gale M.D.** (1989). RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* **78**: 495–504.
- Chibbar R.N., Båga M., Ganeshan S., Hucl P.J., Limin A., Perron C., Ratnayaka I., Kapoor A., Verma V., Fowler D.B.** (2005). Carbohydrate Modification to Add Value to Wheat Grain. In *Third International Wheat Quality Conference*, Manhattan, Kansas, Usa pp 75-84.
- Chiodelli E., and Le Meste M.** (2002). Effect of small and large wheat starch granule on thermomechanical behavior of starch. *Cereal Chem.* **79**: 286-293.
- Colbert T., Till B.J., Tompa R., Reynolds S., Steine M.N., Yeung A.T., McCallum C.M., Comai L. and Henikoff S.** (2001). Highthroughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.* **126**: 480–484.

- Colleoni C., Dauvillee D., Mouille G., Buleon A., Gallant D., Bouchet B., Morell M., Samuel M., Delrue B., Dhulst C., Bliard C., Nuzillard J.M., Ball S.** (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 M.C., Lienard L., Wattebled 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.
- Craig J., Lloyd J.R., Tomlinson K., Barber L., Edwards A., Wang T.L., Martin C., Hedley C. L., Smith A.M.**, (1998). Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* **10**: 413-426.
- Critchley J.H., Zeeman S.C., Takaha T., Smith A.M., Smith S.M.** (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis. *Plant J.* **26**: 89-100.
- Danilova S.A.** (2007). The technologies for genetic transformation of cereals. *Russian J. Plant Physiol.* **54(5)**: 569-581.
- Darlington H.F., Tecsí L., Harris N., Griggs D.L., Cantrell I.C., Shewry P. R.** (2000). Starch granule associated proteins in barley and wheat. *J. Cereal Sci.* **32**: 21-29.
- de la Riva G.A., Gonzalez-Cabrera J., Vazquez-Padron R., Ayra-Pardo C.** (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electron. J. Biotechnol.* **1**: 1-16.
- Delatte T., Trevisan M., Parker M.L., Zeeman S.C.** (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.
- Delcour J.A., Vansteelandt J., Hythier M.C., Abecassis J.** (2000a). Fractionation and reconstitution experiments provide insight into the role of starch gelatinization and pasting properties in pasta. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3774–3778.
- Delcour J.A., Vansteelandt J., Hythier M.C., Abecassis J., Sindic M., Deroanne C.** (2000b). Fractionation and reconstitution experiments provide insight into the role of gluten and starch interactions in pasta quality. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3767–3773.

- Delvalle D., Dumez S., Wattebled F., Roldan I., Planchot V., Berbezy P., Colonna P., Vyas D., Chatterjee M., Ball S., Merida A., D'Hulst C.** (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 A. M.** (1996). The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiol.* **112**: 779-785.
- Denyer K., Hylton C.M., Jenner C.F., Smith, A.M.** (1995). Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm. *Planta* **196**: 256-265.
- Denyer K., Waite D., Edwards A., Martin C., Smith, A. M.** (1999a). Interaction with amylopectin influences the ability of granule-bound starch synthase I to elongate malto-oligosaccharides. *Biochem. J.* **342**: 647-653.
- Denyer K., Waite D., Motawia S., Moller B.L., Smith A.M.** (1999b). Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochem. J.* **340**: 183-191.
- Dexter J.E., and Matsuo R.R.** (1979). Effect of starch on pasta dough rheology and spaghetti cooking quality. *Cereal Chem.* **56(3)**: 190–195.
- Dian W., Jiang H., Wu P.** (2005). Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. *J. Exp. Bot.* **56**: 623-32.
- Dian W., Jiang H., Chen Q., Liu F., Wu P.** (2003). Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm. *Planta* **218**: 261-8.
- Dickinson D.B. and Preiss, J.** (1969). ADP glucose pyrophosphorylase from maize endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* **130**: 119-28.
- D'Ovidio R. and Anderson O.D.** (1994). PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality. *Theor. Appl. Genet.* **88**: 759–763.
- D'Ovidio R. and 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 Breeding* **115**: 413–415.
- Duwening E., Steup M., Willmitzer L. Kossman J.** (1997). Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *Plant J.* **12**: 323-333.

- Dvorak J., Di Terlizzi P., Zhang H.B., Resta P.** (1993). The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* **36**: 21-31.
- Edwards A., Vincken J.P., Suurs L., Visser, R.G.F., Zeeman S., Smith A., Martin C.** (2002). Discrete forms of amylose are synthesized by isoforms of GBSSl in pea. *Plant Cell* **14**: 1767-1785.
- Ellis R.P., Cochrane M.P., Dale M.F.B., Duffus C.M., Lynn A., Morrison I.M., Prentice R.D.M., Swanston J.S., Tiller S.A.** (1998). Starch production and industrial use. *J. Sci. Food Agric.* **77**: 289-311.
- Englyst H.N., Kingman S.M., Cummings J.H.** (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* **46** (2): S33-50.
- Fannon J.E., Shull J.E., BeMiller J.N.** (1993). Interior channels of starch granules. *Cereal Chem.* **70**: 611-613.
- Fredriksson H., Silverio J., Andersson R., Eliasson A.C., Aman P.** (1998). The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydr. Polym.* **35**: 119-134.
- Fu Y.B., Ballicora M.A., Leykam J.F., Preiss, J.** (1998). Mechanism of reductive activation of potato tuber adp-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **273**: 25045-25052.
- Fujita N., Kubo A., Suh D.S., Wong K.S., Jane J.L., 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**: 1070-84.
- Gallant D.J., Bouchet B., Baldwin P.M.** (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organisation. *Carbohydr. Polym.* **32**: 177-191.
- Gao M., Fisher D.K., Kim K.N., Shannon J.C., Guiltinan M.J.** (1997). Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb - Isolation and characterization of a *Sbe2a* cDNA. *Plant Physiol.* **114**: 69-78.
- Gao M., Wanat J., Stinard P.S., James M.G., Myers, A.M.** (1998). Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell* **10**: 399-412.
- Genschel U., Abel G., Lorz H., Lutticke S.** (2002). The sugary-type isoamylase in wheat: tissue distribution and subcellular localisation. *Planta* **214**: 813-820.

- Gianibelli M.C., Sissons M.J., Batey I.L.** (2005). Effect of Source and Proportion of Waxy Starches on Pasta Cooking Quality. *Cereal Chem.* **82**: 321-327.
- Gibson T.S., Solah V.A., McCleary B.V.** (1996). A procedure to measure amylose in cereal starch and flour with ConA. *J. Cereal Sci.* **25**: 111-119.
- Gollan P., Smith K., Bhawe M.** (2007). *Gsp-I* genes comprise a multigene family in wheat that exhibits a unique combination of sequence diversity yet conservation. *J. Cereal Sci.* **45**: 184-198.
- Graybosch R.A., Peterson C.J., Hansen L.E., Rahman S., Mili A., Skerritt J.H.** (1998). Identification and characterization of U.S. wheats carrying nuli alleles at the wx loci. *Cereal Chem.* **75(1)**: 162-165.
- Greenwell P. and Scholfield J.D.** (1986). A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chem.* **63**: 379-380.
- Harn C., Knight M., Ramakrishnan A., Guan H.P., Keeling P.L., Wasserman B.P.** (1998). Isolation and characterization of the zSSIIa and zSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Mol. Biol.* **37**: 639-649.
- Hayakawa K., Tanaka K., Nakamura T., Endo S., Hoshino T.** (2004). End use quality of waxy wheat flour in various grain-based foods. *Cereal Chem.* **81**: 666-672.
- Hendriks J.H.M., Kolbe A., Gibon Y., Stitt M., Geigenberger P.** (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiol.* **133**: 838-849 .
- Hirose, T. and Terao T.** (2004). A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **220**: 9-16.
- Huber K.C. and BeMiller J.N.** (2000). Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydr. Polym.* **41**: 269-276.
- Imparl-Radosevich J.M., Nichols D.J., Li P., McKean A.L., Keeling P.L., Guan H.P.** (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 M.G., Robertson D.S., Myers A.M.** (1995). Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* **7**: 417-429.
- 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.

Jobling S.A., Schwall G.P., Westcott R.J., Sidebottom C.M., Debet M., Gidley M.J., 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 P.E., Patron N.J., Bottrill A.R., Dinges J.R., Fahy B. F., Parker M.L., Waite D. N., Denyer K. (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.

Jones H.W., Doherty A., Wu H. (2005). Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods* **1**: 5.

Kihara H. (1924). Cytologische und genetische studien bei wichtigen getreidearten mit besonderer rucksicht auf das verhalten der chromosomen und die sterilitat in den bastarden. *Men. Coli. Sci. Ser. B, Kyoto Imp. Univ., Kyoto*.

Kiribuchi-Otobe C., Nagamine T., Yanagisawa T., Ohnishi M., Yamaguchi I. (1997). Production of hexaploid wheats with waxy endosperm character. *Cereal Chem.* **74**: 72-74.

Konarev V.G. (1983). The nature and the origin of the wheat genome on the data of grain protein immunochemistry and electrophoresis. Proc. 6th. *Wheat Genet. Symp. Kyoto, Japan*, pp 65-75.

Kosar-Hasnemi B., Li Z., Larroque B O., Regina H., Yamamori C.M., Morell M.K., Rahman S. (2007). Multiple effects of the starch synthase II mutation in developing wheat endosperm. *Funct. Plant Biol.* **34**: 431–438.

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.

Kubo A., Rahman S., Utsumi Y., Li Z.Y., Mukai Y., Yamamoto M., Ugaki M., Harada K., Satoh H., Konik-Rose C., Morell M.K., Nakamura, Y. (2005). Complementation of Sugary-1 Phenotype in Rice Endosperm With the Wheat Isoamylase1 Gene in Supports a Direct Role for Isoamylase1 Amylopectin Biosynthesis. *Plant Physiol.* **137**: 43-56.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lafiandra D., Ciaffi M., Benedettelli S.** (1993). Seed storage proteins of wild wheat progenitors. In: *Biodiversity and wheat improvement*. Edited by A.B. Damania, ICARDA, J. Wilsey and sons, New York, pp 329-340.
- Lee M.R., Swanson B.G., Baik B.K.** (2001). Influence of amylose content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chem.* **78**: 701-706.
- Li Z.Y., Chu X.S., Mouille G., Yan L.L., Kosar-Hashemi B., Hey S., Napier J., Shewry P., Clarke B., Appels R., Morell M.K., Rahman S.** (1999). The localization and expression of the class II starch synthases of wheat. *Plant Physiol.* **120**: 1147-1155.
- Li Z.Y., Mouille G., Kosar-Hashemi B., Rahman S., Clarke B., Gale K.R., Appels R., Morell M.K.** (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.
- Martin C., Smith A.M.** (1995). Starch biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 971-985.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S.** (2000a). Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.* **18**: 455-457.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S.** (2000b). Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* **123**: 439-442.
- Merita 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.
- Mikkelsen R., Baunsgaard L., Blennow A.** (2004). Functional characterization of alpha-glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem. J.* **377**: 525-32.
- Miller T.E.** (1987). Systematics and evolution. In *Wheat breeding: its scientific basis*. Edit by F.G.H. Lupton. Chapman and Hall, London, pp 1-28.
- Miura H., Araki E., Tarui S.** (1999). Amylose synthesis capacity of the three *Wx* genes of wheat cv. Chinese Spring. *Euphytica* **108**: 91-95.
- Miura H., Tanii S.** (1994). Endosperm starch properties in several wheat cultivars preferred for Japanese noodles. *Euphytica* **72**: 171-175.
- 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., Wicckramasinghe M.H.A., Subasinghe R.M., Araki E., Komae K.** (2002). Development of near-isogenic lines of wheat carrying different null *Wx* alleles and their starch properties. *Euphytica* **123**: 353-359.
- 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 seeds. *J. Biol. Chem.* **268**: 19084-19091.
- Mohammadkhani A., Stoddard F.L., Marshall D.R.** (1998). Survey of amylose content in *Secale cereale*, *Triticum monococcum*, *T. turgidum* and *T. tauschii*. *J. Cereal Sci.* **28**: 273-280.
- Morell M.K., Rahman S., Regina A., Appels R., Li Z.** (2001). Wheat starch biosynthesis. *Euphytica* **119**: 55-58.
- Morell M.K., Blennow A., Kosar-Hashemi B., Samuel M. S.** (1997). Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. *Plant Physiol.* **113**: 201-208.
- Morell M.K., Kosar-Hashemi B., Cmiel M., Samuel M.S., Chandler P., Rahman S., Buleon A., Batey I.L., Li Z.Y.** (2003). Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant J.* **34**: 172-184.
- Morita N., Maeda T., Miyazaki M., Yamamori M., Miura H., Ohtsuka I.** (2002a). Effect of substitution of waxy-wheat flour for common flour on dough and baking properties. *Food Sci. Technol. Res.* **8**: 119-124.
- Morita N., Maeda T., Miyazaki M., Yamamori M., Miura H., Ohtsuka I.** (2002b). Dough and baking properties of high-amylose and waxy wheat flours. *Cereal Chem.* **79**: 491-495.
- Morrison W.R.** (1995). Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Chem.* **40**: 437-446.
- Morrison W.R., Gadan H.**, (1987). The amylose and lipid contents of starch granules in developing wheat endosperm. *J. Cereal Sci.* **5**: 263-275.
- Morrison W.R., Tester R.F., Snape C.E., Law R., Gidley M.J.**, (1993). Swelling and gelatinization of cereal starches. IV. Some effects of lipid-complexed amylose and free amylose in waxy and normal barley starches. *Cereal Chem.* **70**: 385-391.
- Mouille G., Maddelein M.L., Ball S.**, (1996). Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell* **8**: 1353-1366.

- Müller-Röber B.T., Kossmann J., Hannah L.C., Willmitzer L., Sonnewald U.** (1990) One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 136–146.
- Muir J.G., Birkett A., Brown I., Jones G., O'Dea K.** (1995). Food processing and maize variety affects amounts of starch escaping digestion in the small intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**: 82-89.
- Myers A.M., Morell M.K., James M.G., Ball S.G.** (2000). Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol.* **122**: 989-997.
- Nair R.B. , Baga M., Scoles G.J., Kartha K.K., Chibbar R.N.,** (1997). Isolation, characterization and expression analysis of a starch branching enzyme II cDNA from wheat. *Plant Sci.* **122**: 153-163.
- Nakamura T., Yamamori M., Hirano H., Hidaka S.** (1993). Decrease of Waxy (Wx) protein in two common wheat cultivars with low amylose content. *Plant Breeding* **111**: 99-105
- Nakamura T., Yamamori M., Hirano H., Hidaka S., Nagamine T.** (1995). Production of waxy (amylose-free) wheats. *Mol. Gen. Genet.* **248**: 253-259.
- 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.
- Nieto-Taladriz M.T., Rodriguez-Quijano M., Carrillo J.M.** (2000). Polymorphism of waxy proteins in Spanish durum wheats. *Plant Breeding* **119**: 277-279.
- 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.
- Nugent A.P.** (2005) Health properties of resistant starch. *Nutr. Bull.* **30**: 27-54.
- Nykanen A., Haley B., Zamore P.D.** (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**: 309-321.
- Orth R.A., Shellenberger J.A.** (1988). Origin, production, and utilization of wheat. In: *Wheat Chemistry and Tecnology*. Ed. Y. Pomeranz, American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, pp. 1-14.
- Osborne T.B.** (1924). The vegetable proteins. *Longmans Green & Co., London.*
- Parker M.L.** (1985). The relationship between A-type and B-type starch granules in the developing endosperm of wheat. *J. Cereal Sci.* **3**: 271-278.
- Parker R., Ring S.G.** (2001). Aspects of the physical chemistry of starch. *J. Cereal Sci.* **34**: 1-17.

- Park S.H., Chung O.K., Seib P.A.** (2005). Effects of varying weight ratios of large and small wheat starch granules on experimental straight-dough bread. *Cereal Chem.* **82**: 166-172.
- Peng M., Gao M., Baga M., Hucl P., Chibbar R.N.** (2000a). Starch-branching enzymes preferentially associated with A-type starch granules in wheat endosperm. *Plant Physiol.* **124**: 265-72.
- Pham Van Hung, Yamamori M., Morita N.** (2005). Formation of Enzyme-Resistant Starch in Bread as Affected by High-Amylose Wheat Flour Substitutions. *Cereal Chem.* **82**: 690-694.
- Pilling E. and Smith A.M.** (2003). Growth ring formation in the starch granules of potato tubers. *Plant Physiol.* **132**: 365-371.
- Planchot V., Roger P., Colonna P.** (2000). Suitability of starch granule porosity for biosynthesis and amylolysis susceptibility. *Starch* **52**: 333-339.
- Pollock C. and Preiss J.** (1980). The citrate-stimulated starch synthase of starchy maize kernels: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**: 578-588.
- Preiss J. and Sivak M.** (1996). Starch synthesis in sinks and sources. In: *Zamski E, Schaffter AA, eds. Photoassimilate distribution in plants and crops: sink-source relationships*. New York: Marcel Dekker. 63–96.
- Preiss J.** (1991). Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. In: *vol. 7, Ed. B. J. Mifflin, Oxford University Press*.
- Rahman S., Kosar-Hashemi B., Samuel M.S., Mili A., Abbott D.C., Skerritt J.H., Preiss J., Appels R., Morell M.** (1995). The major proteins of wheat endosperm starch granules. *Aust. J. Plant Physiol.* **22**: 793-803.
- Rahman S., Li Z., Batey L., Cochrane M.P., Appels R., Morell M.** (2000). Genetic alteration of starch functionality in wheat. *J. Cereal Sci.* **31**: 91-110.
- Rahman S., Li Z., Abrahams S., Abbott D., Appels R., Morell M.K.** (1999). Characterisation of a gene encoding wheat endosperm starch branching enzyme-I. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 156-163.
- Rahman S., Nakamura Y., Li Z., Clarke B., Fujita N., Mukai Y., Yamamoto M., Regina A., Tan Z., Kawasaki S., Morell M.K.** (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 M.K.** (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.

- Ranhotra G.S.** (1995). Wheat: contribution to world food supply and human nutrition. In: *Wheat production, properties and quality*. Ed. by Bushuk and Rasper Blackie Ac. and Prof.: 1-11.
- Regina A., Bird A., Topping D., Bowden S., Freeman J., Barsby T., Kosar-Hashemi B., Li Z., Rahman S., Morell M.K.** (2006). High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 3546-51.
- Regina A., Kosar-Hashemi B., Li Z., Pedler A., Mukai Y., Yamamoto M., Gale K., Sharp P.J., Morell M.K., 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 M.C., Konik-Rose C., Larroque O., Rahman S., Morell M.K.** (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.
- Ritte G., Lloyd J.R., Eckermann N., Rottmann A., Kossmann J., Steup M.** (2002). The starch-related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 7166-7171.
- Rodriguez-Quijani M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M.** (1998). Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheats. *Plant Breeding* **117**: 341-344.
- Roper H.** (2002). Renewable raw materials in Europe – industrial utilisation of starch and sugar. *NutraCos.* **1(3)**: 37–44.
- Sakamura T.** (1918). Kurze mitteilung uber die chromosomenzahlen und die verwandtschaftsverhaltnisse der *Triticum* arten. *Bot. Mag. Tokyo*, **32**: 151-154.
- Satoh H., Nishi A., Yamashita K., Takemoto Y., Tanaka Y., Hosaka Y., Sakurai A., Fujita N., Nakamura Y.** (2003). Starch-Branched Enzyme I-Deficient Mutation Specifically Affects the Structure and Properties of Starch in Rice Endosperm. *Plant Physiol.* **133**: 1111-1121.
- Schofield J.D. and Greenwell P.** (1987). Wheat starch granule proteins and their technological significance. In: *Morton ID (ed) Cereals in an European context*. Ellis Horwood, Chichester, pp 407-420.
- Schultz E.R.** (1913). Die geschichte der kultivierten getreide. *L. Neberts Verlag, Halle a.d.s.* vol.2.
- Schupp N. and Ziegler P.** (2004). The Relation of Starch Phosphorylases to Starch Metabolism in Wheat. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1471-1484.
- Schwarz D.S., Hutvagner G., Haley B., Zamore P.D.** (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* **10**: 537–548.

- Sears R.G. and Deckard E.L.** (1982). Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. *Crop Sci.* **22**: 546-550.
- Sebecic B. and Sebecic B.** (1995). Wheat flour starch granule-size distribution and rheological properties of dough. 2. Extensographic measurements. *Die Nahrung* **39**: 117-123.
- Sebecic B. and Sebecic B.** (1999). Wheat flour starch granule-size distribution and rheological properties of dough. 4. Farinographic measurements. *Starch* **51**: 445-449.
- Shannon J.C., Pien F.M., Cao H.P., Liu K.C.** (1998). Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplastidial synthesized ADP-glucose into amyloplasts of maize endosperms. *Plant Physiol.* **117**: 1235-1252.
- Shewry P., Halford N.G., Lafiandra D.** (2003). Genetics of wheat gluten proteins. In: *Advanced in Genetics*. Ed. by Hall J.C., Friedmann T. and Dunlap J.C., Academic Press. 111-184.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Forde J., Kreis M., Mifflin B.J.** (1986). The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *J.Cereal Sci.* **4**: 97-106.
- Shimbata T., Nakamura T., Vrinten P., Saito M., Yonemaru J., Seto Y., Yasuda H.** (2005). Mutations in wheat starch synthase II genes and PCR-based selection of a SGP-1 null line. *Theor. Appl. Genet.* **111**: 1072–1079.
- Sikka V.K., Choi S.B., Kavakli I.H., Sakulsingharoj C., Gupta S., Ito H., Okita T.W.** (2001). Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.* **161**: 461–468.
- Slade A.J., Fuerstenberg S.I., Loeffler D., Steine M.N., Facciotti D.** (2005). A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat. Biotechnol.* **23**: 75-81.
- Slattery C.J., Kavakli I.H., Okita T.W.** (2000). Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends in Plant Sci.* **5**: 291-298.
- Smidansky E.D., Clancy M., Meyer F.D., Lanning S.P., Blake N.K., Talbert L.E., Giroux M.J.** (2002). Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **99**: 1724–1729.
- Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B., Stoutjesdijk P.A., Green A.G., Waterhouse P.M.** (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407 (6802)**: 319–320.
- Soh H.N., Sisson M.J., 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.

- Stinard P.S., Robertson D.S., Schnable P.S.** (1993). Genetic isolation, cloning, and analysis of a mutator-induced, dominant antimorph of the maize amylose extender1 locus. *Plant Cell* **5**: 1555-1566.
- Stoddard F.L. and Sarker R.** (2000). Characterization of starch in *Aegilops* species. *Cereal Chem.* **77**: 445-447.
- Sun C.X., Sathish P., Ahlandsberg S., Jansson C.** (1998). The two genes encoding starch-branching enzymes IIa and IIb are differentially expressed in barley. *Plant Physiol.* **118**: 37-49.
- Suzuki G., Moriyama M., Fujioka K., Yamamoto M., Subrahmanyam N.C., Li, Z., Appels R., Morell M.K., Mukai Y., Rahman S.** (2003). The starch branching enzyme I locus from *Aegilops tauschii*, the donor of the D genome to wheat. *Funct. Integr. Genomics* **3**: 69-75.
- Tetlow I.J., Davies E.J., Vardy K.A., Bowsher C.G., Burrell M.M., Emes M.J.** (2003). Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of a plastidial isoform. *J. Exp. Bot.* **54**: 715–725.
- Tetlow I.J., Wait R., Lu Z., Akkasaeng R., Bowsher C.G., Esposito S., Kosar-Hashemi B., Morell M.K., Emes M.J.** (2004). Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell* **16**: 694-708.
- Thompson D. B.** (2000). On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydr. Polym.* **43**: 223-239.
- Thorbjornsen T., Villand P., Denyer K., Olsen O.A., Smith A.M.** (1996). Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *Plant J.* **10**: 243-250.
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., Mckibbin, R., Halford, N. G., and Geigenberger, P.,** (2003). Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J.* **35**: 490-500.
- Till B.J., Reynolds S.H., Weil C., Springer N., Burtner C., Young K., Bowers E., Codomo C.A., Enns L.C., Odden A.R., Greene E.A., Comai L., Henikoff S.** (2004) Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol* **4**: 12.
- Topping D.L., Gooden J.M., Brown I.L., Biebrick D.A., McGrath L., Trimble R.P., Choct M., Illman R.J.** (1997). A high amylose (amylomaize) starch raises proximal large bowel starch and increases colon length in pigs. *J. Nutr.* **127**: 615-622.

- Topping D.L., Morell M.K., King R.A., Li Z., Bird A.R., Noakes M.** (2003). Resistant Starch and Health - Himalaya 292, a Novel Barley Cultivar to Deliver Benefits to Consumers. *Starch* **55**: 539-545.
- Tsai C.Y. and Nelson O.E.** (1966). Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Sci.* **151**: 341-343.
- Umemoto T. and Aoki N.** (2005). Single-Nucleotide Polymorphisms in Rice Starch Synthase Ila That Alter Starch Gelatinisation and Starch Association of the Enzyme. *Funct. Plant Biol.* **32**: 763-768.
- Umemoto T., Aoki N., Lin H.X., 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.
- Urbano M., Margiotta B., Colaprico G., Lafiandra D.** (2002). Waxy protein in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Plant Breeding.* **121**: 1-5.
- Vansteelandt J., Delcour, J.A.** (1998). Physical behavior of durum wheat starch (*Triticum durum*) during industrial pasta processing. *J. Agric. Food Chem.* **7** (46): 2499-2503.
- Vignaux N., Doehlert D.C., Elias E.M., McMullen M.S., Grant L.A., Kianian S.F.** (2005) Quality of spaghetti made from full and partial waxy durum wheat. *Cereal Chem.* **82**: 93–100.
- Vrinten P.L. and Nakamura T.** (2000). Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. *Plant Physiol.* **122**: 255-263 .
- Wang X., Conway P.L., Brown I.L., Evans A.J.** (1999). In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (amylomaize) starch granules by human colonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4848-4854.
- Wattebled F., Dong Y., Dumez S., Delvalle D., Planchot R., Berbezy P., Vyas D., Colonna P., Chatterjee M., Ball S., D'hulst C.** (2005). Mutants of Arabidopsis Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulate Phytoglycogen and an Abnormal Form of Amylopectin. *Plant Physiol.* **138**: 184-195.
- Weeks J.T., Anderson O.D., Blechl A.E.** (1993). Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* **102**: 1077-1084.
- Wurzburg, O.B.** (1986). Cross-linked starches. *Modified Starches: Properties and Uses* (Ed. O. B. Wurzburg) CRC Press: Boca Raton, FL.

- Yamamori M.** (1998). Selection of a wheat lacking a putative enzyme for starch synthesis, SGP-1. In: *Proceedings of the Ninth International Wheat Genetics Symposium*. A.E.Slinkard, Ed. University Extension Press, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada pp 300-302.
- 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., Quynh N.T.** (2000). Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 32-38.
- Yamamori M. and Endo T.R.** (1996). Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 275-281.
- 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.
- Yamanouchi H. and Nakamura Y.** (1992). Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme (Q- enzyme) in rice. *Plant Cell Physiol.* **33**: 985-991.
- Yao Y., Thompson D.B., Guiltinan M.J.** (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.
- Yasui T., Sasaki T., Matsuki J.** (1999). Milling and flour pasting properties of waxy endosperm mutant lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Sci. Food Agric.* **79**: 687-692.
- Yasui T., Sasaki T., Matsuki J., Yamamori M.** (1997). Waxy endosperm mutants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and their starch properties. *Breeding Sci.* **47**: 161-163.
- Yoo S.H. and Jane J.L.** (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 S.H. and Jane J.L.** (2002b). Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. *Carbohydr. Polym.* **49**: 297-305.
- Yun S.-H., Matheson N.K.** (1990). Estimation of amylose content of starch after precipitation of amylopectin by Concanavalin-A. *Starch/Starke* **42**: 302-305.

- Yuryev V.P., Krivandin A.V., Kiseleva V.I., Wasserman L.A., Genkina N.K., Fornal J., Blaszcak W., Schiraldi A.** (2004). Structural parameters of amylopectin clusters and semi-crystalline growth rings in wheat starches with different amylose content. *Carbohydr. Res.* **339**: 2683-91.
- Zeeman S.C., Umemoto T., Lue W.L., 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 M., Morris C.F., Batey I.L., Wrigley C.W.,** (1997). Sources of Variation for Starch Gelatinization, Pasting, and Gelation Properties in Wheat. *Cereal Chem.* **74**: 63-71.
- Zhang X., Colleoni C., Ratushna V., Sirghie-Colleoni M., James M.G., Myers A.M.** (2004). Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Mol. Biol.* **54**: 865-79.
- Zhao X.C., Sharp P.J.** (1996). An improved 1-D SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat waxy proteins. *J.Cereal Sci.* **23**: 191-193.
- Zohary D., Arlan J.R., Vardi A.** (1969). The wild diploid progenitors of wheat and their breeding value. *Euphytica*. **18**: 58-65.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare il Prof. Domenico Lafiandra che ha contribuito in modo determinante alla realizzazione di tutti i progetti trattati in questa Tesi.

Desidero, inoltre, ringraziare il Prof. Renato D'Ovidio per averci fornito il costrutto utilizzato per la trasformazione con il metodo biolistico, ma, soprattutto, per gli indispensabili consigli di Biologia Molecolare.

Vorrei, poi, ringraziare Michela Janni per gli esperimenti inerenti la trasformazione col metodo biolistico, Arianna Saliola Bucelli e Ermelinda Botticella per la collaborazione sulla parte proteica del lavoro, la Prof.ssa Stefania Masci per l'enorme disponibilità dimostrata nei miei confronti durante questi tre anni.

Ringrazio il Dipartimento di Plant Science del centro di ricerca di Rothamsted, il Prof. Peter Shewry, il Dott. Andy Phillips e il Dott. Huw Jones per avermi concesso l'opportunità di lavorare presso i loro laboratori e per le collaborazioni riguardo al TILLING e alla trasformazione con l'agrobatterio.

Un ringraziamento particolare è per i colleghi del laboratorio con cui giornalmente ho condiviso questa esperienza: Emanuele Cannarella, Michela Di Giovanni, Chiara Volpi, Paolo Laino, Paola Ferrante, Gabriella Razzino, Daniela Ferri e Daniela Panichi.

Desidero ringraziare la mia famiglia e le mie nonne, che mi sono state vicino e mi hanno sempre sostenuto durante gli studi.

Infine un grazie sentito va a Manuela Plutino che ha contribuito alla mia serenità permettendomi di affrontare i problemi con maggior forza e tranquillità.