



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE VEGETALI-XXII CICLO.

AGR-07

Mutagenesi applicata allo sviluppo di nuove varietà di
frumento: modificazione della composizione dell'amido e
miglioramento delle caratteristiche nutrizionali

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Masci

Firma

Tutor: Prof. Domenico Lafiandra

Firma.....

Dottoranda: Ermelinda Botticella

Firma

INDICE

1 INTRODUZIONE	7
1.1 La progettazione di nuove varietà cerealicole nel terzo millennio: questioni nuove e antiche ...	7
1.2 Alimenti funzionali: i cereali e la salute.....	8
1.3 Il frumento e le ragioni del suo successo	9
1.4 Evoluzione e domesticazione del frumento	10
1.4.1 I progenitori dei genomi.....	11
1.5 La qualità in relazione all'utilizzo finale	14
1.5.1 La durezza della cariosside	14
1.5.2 Il glutine.....	14
1.5.3 Il contenuto proteico totale	15
1.6 La qualità nutrizionale	16
1.6.1 Proteine.....	17
1.6.2 Lipidi	17
1.6.3 Vitamine, minerali e phytochemicals.....	17
1.6. 4 I carboidrati nel frumento: l'amido e le fibre alimentari e il loro ruolo nell'alimentazione.	18
1.6.5 L'amido resistente come fibra funzionale.....	21
1.6.6 La funzionalità dell'amido resistente nella salute umana.....	21
1.6.6.1 Il ruolo degli SCFA e il butirrato.....	21
1.6.6.2 RS e il cancro al colon.....	22
1.6.6.3 Indice glicemico, colesterolo nel sangue, assorbimento di minerali	22
1.6.7 Farine e semole di frumento.	23
1.7 Struttura e composizione chimica dell'amido.....	23
1.7.1 Composizione chimica.....	23
1.7.2 Struttura fisica dell'amido.....	24

1.7.3 L'unità strutturale dell'amido.....	25
1.7.4 Componenti associati ai granuli di amido	27
1.8 Biosintesi dell'amido	28
1.8.1 L'accumulo dell'amido nell'endosperma	29
1.8.2 La sintesi dell'ADP-glucosio	29
1.8.3 Il trasporto dell'ADP-glucosio nei plastidi	30
1.8.4 Sintesi dell'amilosio	30
1.8.5 Sintesi dell'amilopectina.....	32
1.8.5.1 Le amido sintasi di classe I (SSI)	32
1.8.5.2 Le amido sintasi di classe II (SSII)	33
1.8.5.3 Le amido sintasi di classe III (SSIII)	34
1.8.5.4 Le amido sintasi di classe IV.....	34
1.8.5.5 Gli enzimi di ramificazione di classe I (BEI)	35
1.8.5.5 Gli enzimi di ramificazione di classe II (BEIIa e BEIIb)	36
1.8.5.6 Gli enzimi di deramificazione	37
1.8.6 Il ruolo di altri geni nella sintesi dell'amido.....	39
1.8.7 L'espressione dei geni coinvolti nella sintesi dell'amido.....	39
1.8.8 Regolazione della biosintesi dell'amido	40
1.9 La funzionalità dell'amido	40
1.9.1 Rapid Visco Analyzer.....	40
1.9.2 I processi fisici.....	41
1.9.2.1 Gelatinizzazione: la perdita della struttura granulare.....	41
1.9.2.2 Retrogradazione	42
1.9.2.3 Retrogradazione dell'amilopectina	43
1.9.2.4 Gelificazione dell'amilosio	43
1.9.3 Interazioni Amilosio–amilopectina.....	44

1.9.4 I complessi amilosio-lipidi	45
1.9.5 La digestione enzimatica dell'amido	45
1.9.6 Relazione struttura-funzione nei granuli di tipo A e di tipo B.....	46
1.9.7 Il contenuto di amilosio e le proprietà di <i>pasting</i>	47
1.10 L'amido nei prodotti derivati da farine e semole di frumento.	47
1.10.1 Produzione e interesse degli amidi a basso contenuto di amilosio	48
1.10.2 Produzione e interesse degli amidi ad alto contenuto di amilosio	49
1.10.3 Effetto delle dimensioni dei granuli di amido	51
1.11 Applicazioni ed usi dell'amido nell'industrie non alimentari	52
1.12 Miglioramento genetico dei cereali	52
1.12.1 Le risorse genetiche	55
1.12.2 La Genomica Funzionale	56
1.12.2.1 RNA-interference nel frumento	57
1.12.2.2 La mutagenesi nella genetica inversa	58
1.13 TILLING	60
1.13.1 La popolazione mutagenizzata	60
1.13.2 Analisi Delle Mutazioni Nel TILLING	62
1.13.2.1 Il TILLING tradizionale.....	62
1.13.2.2 High resolution melting applicato al TILLING	64
1.13.2.3 Sequenziamento su larga scala	66
1.13.3 Il TILLING nei cereali	66
1.13.4 EcoTILLING.....	67
2 FINALITÀ	71
3 MATERIALI E METODI	75
3.1 Materiale vegetale	75
3.1.1 Set di linee waxy e parziali waxy di frumento tenero e duro.....	75

3.1.2 Set di le Sgp-1 nulli parziali e completi in frumento tenero e duro	75
3.1.3 Altri materiali vegetali	75
3.2 Estrazione Acidi Nucleici	76
3.2.1 Estrazione DNA genomico	76
3.2.2 Estrazione RNA totale dalle cariossidi	77
3.3 Metodo separazione acidi nucleici	78
3.3.1 Elettroforesi su gel di agarosio	78
3.4 Metodi per l'isolamento di frammenti genici.....	78
3.4.1 Disegno di oligonucleotidi genoma specifici	78
3.4.2 Amplificazione PCR	78
3.4.3 RT-PCR semiquantitativa	79
3.4.4 Estrazione e purificazione dei frammenti di DNA da gel di agarosio	79
3.4.5 Determinazione delle sequenze nucleotidiche	80
3.5 Isolamento dei geni <i>SBEIIa</i>	80
3.6 Identificazione e caratterizzazione dei polimorfismi negli omoeologhi <i>SBEIIa</i>	80
3.7 TILLING	81
3.7.1 Produzione di una popolazione di frumento tenero mutagenizzata con l'EMS.....	81
3.7.2 Generazione dei pool di DNA	81
3.7.3 Isolamento delle regioni geniche allele specifiche.....	82
3.7.4 Analisi HRM	83
3.8 PCR Marker Assisted Selection	85
3.9 Metodi per la determinazione delle proprietà chimico fisiche dell'amido	86
3.9.1 Isolamento e purificazione dell'amido	86
3.9.1.1 Dough Method.....	86
3.9.1.2 Isolamento dei granuli d'amido.....	86
3.9.2 Determinazione dell'amilosio.....	87

3.9.3 Analisi RVA (Rapid Visco Analyser).....	88
3.9.4 Misura del contenuto di β -glucani	89
3.9.5 Calorimetria differenziale a scansione differenziale	89
3.9.6 Analisi delle proteine legate ai granuli d'amido.....	89
3.9.6.1 Estrazione delle proteine legate ai granuli d'amido.....	89
3.9.6.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS	89
4 RISULTATI	93
4.1 Isolamento dei geni <i>SBEIIa-A</i> e <i>SBEIIa-B</i> da <i>Triticum aestivum</i>	93
4.2 Analisi delle sequenze nucleotidiche dei due geni.....	95
4.3 Caratterizzazione di una inserzione <i>U3-snRNA gene like</i> in <i>SBEIIa-A</i>	99
4.4 Caratterizzazione di un inserzione <i>transposon-like</i> in <i>SBEIIa-B</i>	100
4.5 Proteine SBEIIa	103
4.6 TILLING	105
4.6.1 Sviluppo di coppie di oligonucleotidi allele specifici per l'analisi di TILLING	105
4.6.2 Produzione degli ampliconi per l'analisi di High Resolution Melting.....	107
4.6.3 Dati qualitativi sull'applicazione dell'HRM nel TILLING	109
4.6.5 Mutazioni deleterie: nonsenso e <i>splicing</i>	120
4.6.6 Analisi delle mutazioni deleterie nella progenie M3	121
4.6.7 Espressione dei trascritti dell'allele target nei mutanti knock-out	124
4.6.8 Analisi delle proteine legate ai granuli nei mutanti <i>SBEIIa-A</i> ⁻ e <i>SBEIIa-B</i> ⁻	126
4.7 Caratterizzazione chimico-fisica di amido di frumento a basso e ad alto contenuto di amilosio	127
4.7.1 Messa a punto di un metodo di calibrazione per la determinazione dell' amilosio in frumenti <i>low</i> e <i>high amylose</i>	128
4.7.2 Caratterizzazione delle proprietà chimico fisiche dell'amido nelle linee di frumento Waxy	129
4.7.2.1 Determinazione del contenuto di amilosio waxy.....	129
4.7.1.2 Determinazione del contenuto in β -glucani nei genotipi Waxy.....	130

4.7.2.3 Analisi RVA delle linee Waxy	131
4.7.2.4 Analisi delle proprietà di gelatinizzazione dell'amido del set di parziali nulli waxy	132
4.7.3 Caratterizzazione di linee di frumento ad alto contenuto di amilosio	135
4.7.3.1 Determinazione del contenuto di amilosio	135
4.7.3.2 Analisi RVA delle linee nulli Sgp1 di frumento duro e tenero.	135
4.7.3.3 Determinazione del contenuto di amilosio e dei profili RVA delle linee transgeniche di frumento duro	137
5 DISCUSSIONE	141
6 CONCLUSIONI	153
7 BIBLIOGRAFIA	159
RINGRAZIAMENTI	186

ABSTRACT

Reserve starch represents the main component in wheat endosperm whose composition strongly influences the quality and nutritional value of wheat-based food products. A new challenge to develop novel wheat varieties with improved quality characteristics has recently been identified through the manipulation of starch composition. Starch is composed by two glucan polymers different in chains length and branching grade. The modulation of amylose/amylopectin ratio greatly affects wheat flour nutritional and processing properties. Currently many efforts focus on the objective of increasing the amylose fraction in cereal starches. Higher amylose content correlates with an increased amount of “resistant starch”, a particular starch fraction, considered to have beneficial effects on human health lowering the risk of important diseases.

Amylose and amylopectin are synthesized from a common substrate, ADP-glucose, by two distinct pathways. Amylose production involves one enzyme – Granule Bound Starch Synthase I (GBSSI)- whereas three classes of enzyme, known as starch synthases (SSs), branching (SBEs) and debranching enzymes (DBEs) take part to the synthesis of amylopectin.

Starch branching enzymes IIa are one of the main targets to increase amylose content in cereals. Recent studies, in bread and durum wheat, have shown that the RNA interference technology can result efficiently in the loss of SBEIIa functionality, leading to a drastic change of the amylose/amylopectin ratio.

The TILLING-Targeting Induced Lesions In Genomes-represents an effective reverse genetics tool for the production of novel allelic variants in valuable traits. In TILLING the combination of traditional chemical mutagenesis with high-throughput detection methods of point mutations has originated an attractive strategy both for functional genomics and breeding applications overcoming limits associated with transgenic issues.

In this work an EMS mutagenised population of bread wheat has been analyzed for the identification of SNPs (single nucleotide polymorphisms) of interest in the three homoeoalleles *SBEIIa* located in A, B and D genomes by a TILLING approach. The two genes *SBEIIa-A* and *SBEIIa-B* have been isolated and sequenced and polymorphic regions have been selected in order to design allele specific primer pairs to be used in TILLING.

The comparison of the three genes have led to the identification of several *transposon like* insertions. These elements have also been investigated in diploid and polyploid wheats in order to establish phylogenetic relationship.

Several targeted regions of the three *SBEIIa* genes have been analyzed in approximately two thousand wheat lines by High Resolution Melting technology, based on the comparison of the melting behaviours of the amplified PCR fragments. Fifty nine mutant genotypes have been characterized for *SBEIIa-A*, fourteen for *SBEIIa-B* and forty nine for *SBEIIa-D* confirming a mutation frequency of 1 SNP for each 36kb associated to the TILLING library. Most of the mutations described are localized in the coding region. Worthy of note two deleterious mutations have been identified in each of the three *SBEIIa* homoeoalleles. Two nonsense mutation localized, respectively, in the exon IX and exon XII, have been identified for *SBEIIa-A* gene; one nonsense mutation and one affecting a splicing site, have been found for each of the two alleles *SBEIIa-B* and *SBEIIa-D*. For all three homoeologues different missense mutations, causing the change of conserved residues located in catalytic domains of

SBEIIa enzymes, have been identified. Transcripts analysis of the two *SBEIIa-A* nonsense mutants revealed a drastic reduction of the gene expression compared to wild type genotype, indicating mRNA degradation by a NMD (Nonsense Mediated Decay) mechanism. *SBEIIa* single null genotypes have been selected in the M3 progenies by a PCR-Marker Assisted Selection assay based on the development of dCAPS primers. Electrophoretic analyses carried out in the *SBEIIa* single null mutants of A and B genomes have not detected any changes in the starch granule proteins profile. Moreover in this work, methods for the characterization chemical physical properties of starch have been optimized using wheat lines with an altered amylose/amylopectin ratio. These methods will be used to characterize the *SBEIIa* of complete and partial null genotypes.

RIASSUNTO

Il presente progetto di dottorato si inserisce in una linea di ricerca che punta al miglioramento delle caratteristiche tecnologiche e nutrizionali della farina di frumento attraverso la manipolazione genetica della composizione chimica dell'amido. L'amido è costituito da due polimeri glucanici, l'amilosio e l'amilopectina, che differiscono nella lunghezza delle catene e nel grado di ramificazione. La manipolazione del rapporto amilosio-amilopectina consente la produzione di amidi con nuove proprietà chimico-fisiche.

È stato dimostrato che l'aumento della percentuale di amido resistente, riscontrata negli "amidi ad alto contenuto di amilosio" (HAS), apporta notevoli benefici alla salute umana, riducendo il rischio di importanti malattie quali il cancro, il diabete, l'osteoporosi. La strategia utilizzata per l'ottenimento di HAS consiste nella manipolazione delle vie biosintetiche dei due polimeri che costituiscono l'amido, l'amilosio e l'amilopectina. I due polimeri sono sintetizzati attraverso vie biosintetiche distinte che condividono lo stesso substrato; la mancanza di attività di due classi di enzimi coinvolte nella sintesi dell'amilopectina, SSII e SBEIIa, è stato associato, in frumento, a genotipi caratterizzati da un notevole incremento della percentuale di amilosio. In particolare il silenziamento dell'enzima SBEIIa, attraverso RNA interference, ha permesso di ottenere linee di frumento con amidi costituiti per il 70% da amilosio rispetto a circa il 25 % dei genotipi normali.

Nel presente progetto di dottorato sono state generate nuove linee di frumento tenero caratterizzate dalla perdita di espressione degli alleli SBEIIa attraverso un approccio di genetica inversa basato sul TILLING.

La prima parte di questo lavoro è consistito nell'isolamento e sequenziamento dei due omoalleli *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* di frumento tenero localizzati rispettivamente sul braccio corto dei cromosomi 2AS e 2BS. L'allineamento delle sequenze genomiche dei tre alleli ha inoltre evidenziato la presenza di diverse inserzioni *transposon like*; sono stati condotti esperimenti finalizzati allo studio del grado di conservazione di tali elementi in diversi frumenti diploidi e poliploidi.

Mediante il confronto delle sequenze nucleotidiche dei tre omoalleli sono state identificate regioni geniche adatte al disegno di oligonucleotidi genoma specifici utilizzati nelle amplificazioni PCR degli esperimenti di TILLING. L'analisi di una popolazione mutagenizzata di frumento tenero, cv Cadenza, ha portato all'identificazione di numerose varianti alleliche per ciascuno dei tre geni. In totale sono stati identificati 59, 14 e 49 nuove varianti alleliche, rispettivamente per gli alleli *SBEIIa-A*, *SBEIIaB* e *SBEIIa-D*. In particolare, per ciascuno dei tre omoalleli, sono state identificate due mutazioni deleterie responsabili della perdita di espressione genica. Sono stati generati due genotipi caratterizzati dalla presenza di un codone di stop all'interno della regione codificante dell'allele *SBEIIa-A*; una mutazione in un sito di splicing e una non senso sono state identificate per ciascun dei due alleli *SBEIIa-B* e *SBEIIa-D*. L'analisi dei trascritti dell'allele del genoma A, nei due genotipi singoli nulli *SBEIIa-A*, ha evidenziato una drastica riduzione dell'espressione del gene rispetto al genotipo *wild type* indicando l'intervento di un meccanismo di degradazione dell'RNA messaggero noto come NMD (*Nonsense-Mediated RNA Decay*).

L'analisi della progenie M3 dei genotipi nulli *SBEIIa*, effettuata attraverso un saggio di tipo PCR-MAS (Marker Assisted Selection), ha permesso l'identificazione e la selezione di genotipi mutanti omozigoti. È stato avviato un programma di incrocio tra le linee nulli *SBEIIa* per la realizzazione di una "seria fenotipica" caratterizzata dalla riduzione o mancanza dell'enzima target e da diversi livelli di incremento del contenuto di amilosio.

Inoltre sono stati ottimizzati i protocolli di diverse metodiche di analisi delle proprietà chimico fisiche dell'amido utilizzando linee di frumento ad alto e a basso contenuto di amilosio. Tali metodiche saranno utilizzate per l'analisi dell'amido dei genotipi nulli completi e parziali *SBEIIa* generati in questo lavoro.

INTRODUZIONE

1 INTRODUZIONE

1.1 La progettazione di nuove varietà cerealicole nel terzo millennio: questioni nuove e antiche

La ricerca scientifica nel campo del miglioramento dei cereali è chiamata oggi a rispondere a numerose richieste, spesso urgenti, che coinvolgono importanti e diversi settori della vita sociale ed economica dell'intero pianeta. La scarsità di risorse idriche, ad esempio, ha dato origine ad un filone di ricerca orientato alla produzione di specie cerealicole resistenti alla siccità. L'aumento della produzione di biocarburanti dai cereali, dovuto alla crisi petrolifera e all'esigenza di reperire fonti energetiche alternative, ha contribuito alla riduzione della superficie coltivabile accentuando l'interesse per la produzione di specie ad alta produttività.

I cereali svolgono, direttamente o indirettamente, un ruolo primario nell'alimentazione umana e i tre maggiori cereali, mais, frumento e riso, forniscono circa il 75% dell'apporto calorico mondiale (Sands *et al.*, 2009). I vantaggi ad essi associati rispetto ad altre specie, pur valide fonti di energia (patata, banana, etc.), derivano dalla bassa percentuale di umidità che li caratterizza (12-15%) e ne determina una lunga conservabilità, minore suscettibilità al rischio microbiologico e una maggiore efficienza dei relativi processi di trasporto e di stoccaggio (Godwin *et al.*, 2009). L'emergenza fame e la continua crescita della popolazione nei paesi in via di sviluppo elevano ad obiettivo di primaria importanza l'aumento delle rese e della produttività in molti programmi di miglioramento dei cereali. La selezione delle piante per caratteristiche quali la resistenza a malattie e, in generale, rese elevate può, tuttavia, avvenire a discapito di importanti proprietà nutrizionali (Sands *et al.*, 2009).

Nei paesi industrializzati il cibo ha assunto una nuova funzione, oltre a quella nutritiva di base, che consiste nell'apporto di nuovi benefici alla salute umana e nella prevenzione di specifiche e importanti malattie (Charalampopoulos *et al.*, 2002). Malattie quali i disturbi cardiovascolari, il diabete di tipo II e il cancro al colon hanno raggiunto le dimensioni di un problema serio nei paesi occidentali (Jemal *et al.*, 2005) ed è provato che il rischio di queste patologie sia aggravato dall'obesità e che esista una correlazione positiva con la maggiore abbondanza di cibo derivante dall'industrializzazione (Mascie-Taylor e Karim, 2003). In questo contesto sta emergendo un nuovo mercato nel settore alimentare orientato alla produzione di alimenti che, al di là delle funzioni nutritive di base, siano in grado di apportare benefici alla salute umana e prevenire o ridurre il rischio di malattie croniche importanti. Questa categoria di prodotti alimentari è generalmente identificata con l'espressione "alimenti funzionali". La Commissione Europea sulla Scienza degli Alimenti Funzionali in Europa ha stabilito che un alimento può essere definito funzionale quando "al di là del valore nutrizionale è

scientificamente dimostrato che il suo consumo può svolgere un effetto benefico e mirato su una o più funzioni dell'organismo, contribuendo a preservare o migliorare lo stato di salute e di benessere e/o ridurre il rischio di malattia" (*Consensus meeting on scientific concept of Functional Food*, Madrid 1998).

1.2 Alimenti funzionali: i cereali e la salute

L'espressione "alimento funzionale" è stata coniugata in Giappone nel 1984 da scienziati che studiavano le relazioni esistenti tra la nutrizione, la soddisfazione sensoriale, la fortificazione e la modulazione dei sistemi fisiologici (Siró *et al.*, 2008). Nel 1991 il Ministero della Salute giapponese ha definito una nuova categoria di prodotti alimentari contrassegnati dalla sigla "FOSHU" (*FOod for Specified Health Uses*) regolata da una specifica normativa. In Europa gli alimenti funzionali non sono considerati una categoria distinta ma piuttosto un concetto e l'azione del Legislatore ha puntato a regolamentare l'utilizzo dei così detti "*health claims*", indicazioni sulla reale funzione salutistica dell'alimento, riportati sull'etichetta del prodotto (EC, 2006). Il Regolamento Europeo 1924/2006 stabilisce la necessità, per tutti gli Stati Membri, di pubblicare una lista di "*health claims*" autorizzati e, inoltre, di fornire i profili nutrizionali degli alimenti contrassegnati da etichette salutistiche. Molteplici sono le ragioni che rendono interessante la prospettiva di creare alimenti funzionali a base di cereali. I cereali sono alla base dell'alimentazione umana e ne rappresentano la maggiore fonte di energia grazie al loro elevato contenuto in carboidrati. L'aumento del consumo di cibi ad alto valore energetico nella società contemporanea è stato associato ad un incremento dell'incidenza di patologie croniche, non infettive, così dette "*diet-related*". In questo senso i cereali costituiscono un mezzo ideale sia per l'apporto di nuovi benefici che per la correzione di regimi alimentari errati, in quanto sono significativamente presenti nella dieta. L'attenzione per il binomio cereali e salute ha ricevuto un forte impulso dagli studi epidemiologici di comparazione dello stato di salute di popolazioni con abitudini alimentari differenti, basate sul consumo di alimenti a base di cereali integrali, in un caso, e di cereali raffinati nell'altro (Burkitt, 1970). Il consumo di cereali integrali è stato correlato positivamente alla prevenzione di malattie *diet related*, e tale funzione è stata attribuita essenzialmente alla frazione delle fibre alimentari. La categoria delle fibre comprende diversi tipi di carboidrati, presenti nelle pareti delle cellule vegetali, che non sono idrolizzabili dagli enzimi digestivi umani. Numerosi studi supportano il ruolo benefico delle fibre sulla salute, esercitato attraverso diversi effetti e funzionalità fisiologiche. Alle fibre è stata riconosciuta, inoltre, la capacità di svolgere una funzione prebiotica, ossia di agire come substrato della microflora batterica intestinale. Tale funzione è essenziale per il mantenimento della microflora e per la produzione di alcuni metaboliti a cui, recentemente, si è attribuito un ruolo fondamentale nella prevenzione di malattie a carico dell'apparato

digerente. Sebbene sia certo il contributo benefico delle fibre alimentari, non è stato chiarito in che percentuale questi componenti contribuiscano ad alcuni meccanismi importanti, quali la funzione prebiotica, e quali altri costituenti dei cereali siano implicati in tali funzioni (Topping, 2007). Recentemente si è sviluppata una intensa attività di ricerca che supporta un ruolo fondamentale nella prevenzione del cancro al colon di una particolare frazione di amido, normalmente presente in bassa percentuale nei prodotti alimentari, chiamata “amido resistente”. L’amido resistente presenta numerose caratteristiche simili a quelle delle fibre alimentari. Esso, in ragione della sua peculiare struttura chimico fisica, è resistente agli enzimi digestivi umani e viene fermentato dalla microflora batterica del colon. Grande interesse è attualmente concentrato sulla natura dei metaboliti prodotti dalla sua fermentazione (acidi grassi a catena corta, SCFA), in quanto questi ultimi sono stati associati a diversi effetti positivi sulla fisiologia umana. L’interesse per questo particolare tipo di amido è accentuato dalla presenza di alcuni vantaggi rispetto alle fibre. Le fibre vengono rimosse durante i processi di raffinamento dei cereali. Inoltre l’amido non comporta effetti negativi sulla palatabilità del prodotto alimentare, che rappresenta una questione da gestire, attraverso tecnologie opportune, nel caso delle fibre. Dal punto di vista fisiologico la possibilità di creare amidi a diverso grado di digeribilità risulta una prospettiva interessante per modulare l’indice glicemico degli alimenti con effetti di prevenzione di diverse patologie quali l’obesità, il diabete e i disturbi cardiovascolari. In tale contesto si è sviluppato un filone di ricerca che ha l’obiettivo di incrementare il contenuto di amido resistente nei prodotti alimentari derivati dai cereali. Le alternative possibili per realizzare tale obiettivo sono diverse e coinvolgono le tecnologie alimentari e l’attività di sviluppo di nuove varietà di cereali.

1.3 Il frumento e le ragioni del suo successo

In termini di produzione, frumento, riso e mais presentano un profilo paragonabile con un raccolto totale nel mondo rispettivamente pari a 607, 652 e 785 milioni di tonnellate nell’anno 2007 (<http://faostat.fao.org>). Le caratteristiche che rendono il frumento unico tra i cereali investono sia l’aspetto agronomico che quello qualitativo. Esistono circa 25000 varietà di frumento tenero in grado di crescere in una ampia diversità di ambienti temperati (Feldman, 1995). La produttività, in condizioni ottimali, può superare 10 ton/h reggendo bene il confronto con altri tipi di colture delle zone temperate (Shewry, 2009). La sua capacità di adattamento a diverse condizioni climatiche ed ambientali e la sua alta produttività rappresentano parte della chiave del successo del frumento nel mondo. Il frumento presenta un buon profilo nutrizionale ed è una fonte, oltre che di carboidrati, anche di alcuni amminoacidi essenziali, di minerali, vitamine e di alcune sostanze associate ad effetti benefici per la salute dette *phytochemicals*. La peculiarità maggiore del frumento tra i cereali è però

dovuta alle proprietà viscoelastiche uniche dei suoi impasti che permettono la produzione di una ampia varietà di prodotti quale pane e prodotti da forno, pasta, noodles e altri prodotti alimentari consumati in regioni più o meno estese del mondo. Queste proprietà dipendono dalla struttura e le interazioni tipiche delle proteine di riserva della cariosside che formano la frazione proteica del glutine.

1.4 Evoluzione e domesticazione del frumento

Le specie di frumento coltivato più importanti sono attualmente il frumento tenero (*Triticum aestivum*) e il frumento duro (*T. turgidum*) che costituiscono rispettivamente il 95% e il 5 % della coltivazione totale del frumento. Il frumento tenero, utilizzato per la produzione di pane e prodotti da forno, è un frumento esaploide caratterizzato dalla presenza di tre genomi (AABBDD). Il frumento duro, utilizzato prevalentemente per la produzione di pasta, è tetraploide e presenta i genomi AABB. Il frumento appartiene al genere *Triticum*, tribù *Triticeae*, famiglia *Graminaceae*. Grazie ad una moltitudine di dati archeologici e genetici è stato possibile tracciare in linea generale la storia dell'evoluzione dei frumenti coltivati. I primi frumenti ad essere coltivati sono state una specie tetraploide con genoma AABB (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides*) e una specie diploide con genoma AA (*T. monococcum* ssp. *aegilopsoides*) rispettivamente allevate nella regione meridionale del Levante (valle della Giordania) e in quella settentrionale (nel sud-est della Turchia) (Heun *et al.*, 1997; Dubcovsky e Dvorak, 2007), per poi diffondersi nella regione Medio Orientale circa 9000 anni fa, quando ha avuto origine il frumento esaploide (Fedman, 2001). Probabilmente anche il selvatico diploide *urartu* e il tetraploide *timophevii* sono stati coltivati inizialmente nella stessa regione. Solo tre di queste quattro specie si sono evolute in forme di frumento domesticato: da *T. dicoccoides* ha avuto origine *T. dicoccum*; da *T. boeoticum*, *T. monococcum*; da *araraticum*, *timophevii*.

I cambiamenti genetici responsabili dei tratti che differenziano le piante domestiche dai progenitori selvatici sono noti come “sindrome di domesticazione”. In frumento l'evento più importante della sindrome è stato la perdita della caratteristica di “dispersione dei semi” dovuta alla fragilità della rachide; ciò impedisce al vento di disperdere le cariossidi facilitandone la raccolta. I geni responsabili per tale caratteristica (*Br-brittle rachis*) sono stati localizzati sul cromosoma 3 del frumento tetraploide. Un altro tratto importante per la domesticazione del frumento è stato la perdita del glume “aderente alla cariosside” (*tenacious glume-gene Tg*) che ha portato al frumento *free-threshing*. Schulz (1913) elaborò, su base morfologica, la prima classificazione dei frumenti dividendo il genere *Triticum* in tre gruppi tassonomici: einkorn, emmer e dinkel. L'autore individuò, all'interno di ogni gruppo, specie selvatiche e coltivate; le specie coltivate furono ulteriormente suddivise in “vestite” e “nude” (Fig. 1.1). Schulz ipotizzò che le forme “nude” derivassero dalla specie coltivata “vestita”, che,

a sua volta, prendeva origine dal progenitore selvatico. Sakamura, (1918) dimostrò, su base citogenetica, che i tre gruppi identificati da Schultz differivano nel cariotipo: il gruppo einkorn è diploide ($2n=14$), il gruppo emmer è tetraploide ($2n=28$) e il gruppo dinkel è esaploide ($2n=42$). La moderna classificazione dei frumenti (Fig. 1.2) riconosce l'esistenza di due specie diploidi, *T. monococcum* e *T. urartu*, due specie tetraploidi *T. turgidum* e *T. timophevii* e due specie esaploidi *T. aestivum* e *T. zhukovskyi*.

Frumenti diploidi(2n)

I frumenti diploidi hanno avuto probabilmente un'origine monofiletica. *T. monococcum*, con la sue sottospecie selvatica ssp. *boeoticum* e coltivata ssp. *monococcum* (einkorn), e *T. urartu* producono ibridi sterili e per questa ragione sono state identificate come due specie biologicamente distinte (Johnson e Dhaliwal, 1976). Esse sono caratterizzate rispettivamente da genoma ($A^m A^m$) e ($A^u A^u$) dove l'apice denota la specificità del genoma di *T. monococcum*.

Frumenti poliploidi

I frumenti poliploidi rappresentano un tipico esempio di evoluzione attraverso l'alloploidia. La natura alloploidica di questi frumenti è stata verificata attraverso analisi citogenetiche di ibridi tra specie a diversi livelli di ploidia. Ogni specie poliploide può essere identificata come il prodotto di un'ibridizzazione seguita dal raddoppiamento cromosomico (anfiploidia). Si distinguono due gruppi di frumenti poliploidi designati come *turgidum-aestivum* e *timophevii*. Al primo gruppo appartengono i frumenti tetraploidi con genoma AABB (*T. turgidum*) e l'esaploide *aestivum* con genoma AABBDD. *T. turgidum* comprende la sottospecie selvatica ssp. *dicoccoides* e diverse forme coltivate. Il *T. dicoccoides* è stato identificato come il progenitore selvatico delle specie tetraploidi coltivate grazie all'intuizione di Kornicke (1889) e Aaronsohn (1910) che notarono la somiglianza morfologica di una specie selvatica, che cresceva spontaneamente nella regione di Israele, rispetto al noto emmer coltivato. Al secondo gruppo appartengono il tetraploide *T. timophevii* con genoma AAGG e l'esaploide $AAA^m A^m GG$ *T. zhukovskyi*. Il *T. timophevii* comprende la specie selvatica ssp. *araraticum* e il coltivato ssp. *timophevii*. L'alloploidia ha consentito la confluenza in un'unica pianta di genomi precedentemente adattati a condizioni ambientali differenti; questo processo è alla base della forte capacità di adattamento dei frumenti poliploidi ad ambienti molto differenti (Dubcovsky e Dvorak, 2007).

1.4.1 I progenitori dei genomi

I primi studi di filogenesi relativi ai tre genomi del frumento esaploide sono basati sullo studio dell'appaiamento cromosomico in ibridi interspecifici e analisi del cariotipo del frumento poliploide e

dei probabili donatori diploidi (Gupta *et al.*, 2008). Più recentemente tali studi si avvalgono della disponibilità di nuove risorse quali marcatori molecolari e sequenze di DNA. In figura 1.2 è riportata una schematizzazione della filogenesi dei frumenti coltivati. *T. urartu* è oggi considerato il candidato più probabile come progenitore del genoma A dei frumenti poliploidi (Dvorak *et al.*, 1988). I frumenti tetraploidi si sono originati per incrocio spontaneo tra *T. urartu* e una specie della sezione *Sitopsis* di *Aegilops*; *Ae. speltoides* (genoma SS) è considerato il progenitore più probabile dei genomi B e G dei frumenti poliploidi (Dvorak e Zhang., 1990). Tuttavia l'origine del genoma B è tutt'ora una questione non risolta a causa della sua divergenza significativa rispetto al genoma S di *Ae. speltoides* (Blake *et al.*, 1999). Infatti secondo alcuni autori, non è chiaro se *Ae. speltoides* sia la sola fonte del genoma B, o se il genoma sia il risultato dell'introgresione di diverse specie della sezione *Sitopsis* (Zohary e Feldman, 1962). Alcune speculazioni suggeriscono che il donatore del genoma B potrebbe aver perso la sua identità durante l'evoluzione e non essere attualmente identificabile. Kilian *et al.* (2007) hanno dimostrato che i genomi B e G hanno avuto due percorsi evolutivi indipendenti.

I frumenti esaploidi (AABBDD) si sono originati con un evento di ibridazione spontanea tra la specie coltivata *T. dicoccum* (AABB) e la specie diploide selvatica *Ae. tauschii* (sinomini *Ae. squarrosa*, *T. tauschii*) ssp. *strangulata* (McFadden e Sears, 1946; Kihara, 1944). Ciò è stato recentemente confermato dagli studi sulle sequenze di due geni *Acc-1* (plastid acetyl-CoA carboxylase) e *Pgk-1* (plastid 3-phosphoglycerate kinase) da Huang *et al.* (2002). La presenza, in frumento tenero, di più alleli per ciascun locus ha portato ad ipotizzare che il frumento tenero si sia originato da multipli eventi indipendenti di ibridazione tra il frumento tetraploide e diverse fonti di *Ae. tauschii* (Talbert e Blake, 2000). L'origine del frumento *T. zhukovski* è riconducibile ad un evento di ibridazione avvenuto tra il tetraploide *T. ssp. timophevii* e il diploide *monococcum*.

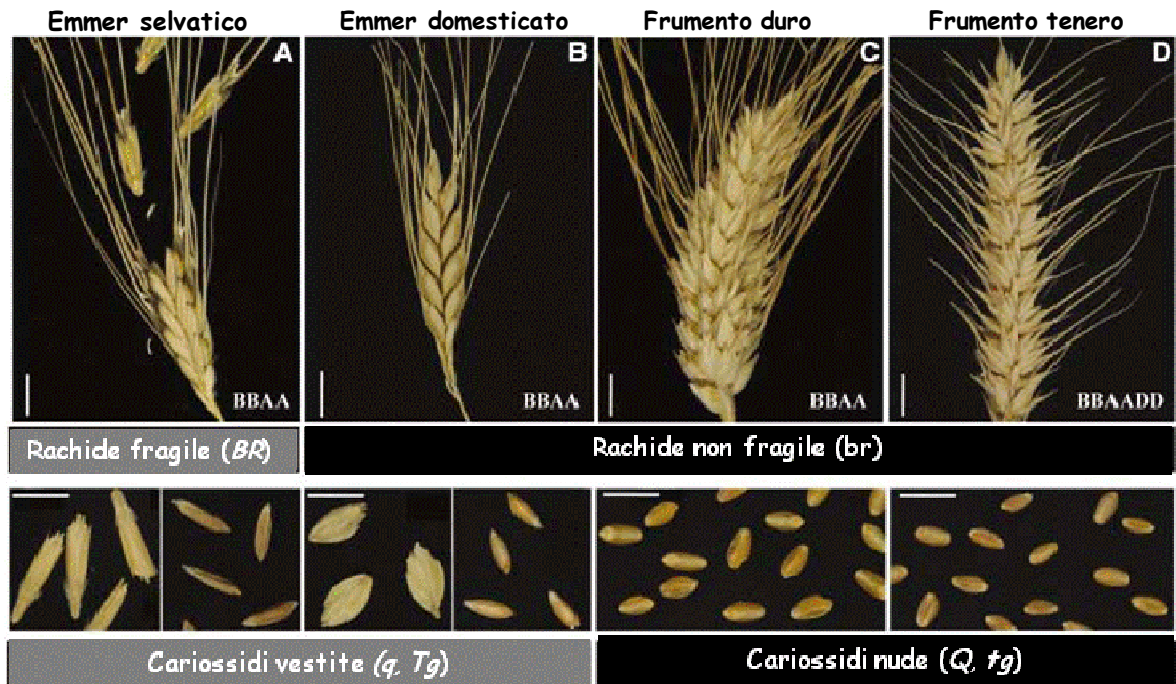


Figura 1.1. Spighe di frumento car atterizzate da (A) rachide fragile, (da B a D) rachide non fragile, (A e B) cariossidi vestite e (C e D) cariossidi nude. (A) emmer selvatico (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides*), (B) emmer domesticato (*T. turgidum* ssp. *dicoccon*), (C) frumento duro (*T. turgidum* ssp. *durum*), e (D) frumento tenero (*T. aestivum*). Simboli: Br, *brittle rachis*; Tg, *tenacious glumes*; e Q, *square head*. (modificata da Dubcovsky e Dvorak, 2007)

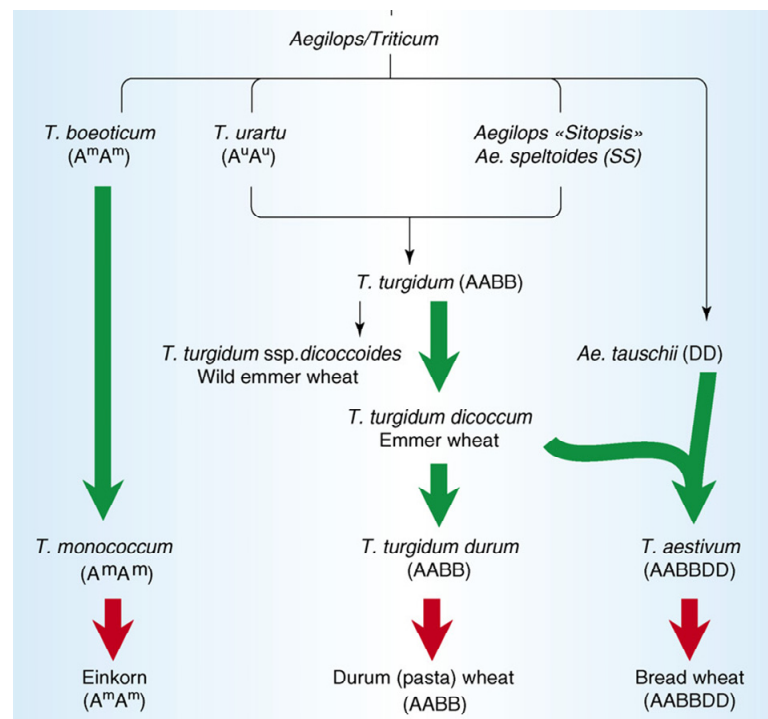


Figura 1.2. Schematizzazione della filogenesi dei frumenti coltivati (da Feuillet *et al.*, 2007).

1.5 La qualità in relazione all'utilizzo finale

La qualità del frumento è un concetto complesso che investe molteplici soggetti coinvolti nelle diverse fasi della filiera produttiva. In questa sede saranno discusse le caratteristiche qualitative del frumento in relazione al suo utilizzo finale nella produzione di alimenti destinati al consumo umano. L'enorme varietà di prodotti derivati dal frumento e la loro diffusione in paesi diversi hanno prodotto come conseguenza la necessità di definire la qualità in relazione allo specifico prodotto e alle preferenze dei consumatori. Tra i parametri maggiori alla base dei vari sistemi di classificazione della prestazione tecnologica del frumento vi sono la durezza (*texture*) della cariosside, la forza dell'impasto o glutine e il contenuto proteico totale.

1.5.1 La durezza della cariosside

La *texture* o durezza è definita come la resistenza fisica della cariosside di frumento alla rottura o al taglio durante la macinazione. Tale parametro influenza numerose proprietà quali la capacità di assorbimento di acqua dell'impasto e la velocità del processo di fermentazione utilizzato nella produzione del pane. Farine derivate da frumenti *hard* presentano, in seguito al processo di molitura, una maggiore percentuale di granuli di amido danneggiato che risulta più facilmente accessibile agli enzimi e all'acqua. È comunemente accettata l'ipotesi che la durezza dipenda dall'adesione tra i granuli di amido e la matrice proteica dell'endosperma (Darlington *et al.*, 2000). La presenza di una particolare classe di proteine, le friabiline, sulla superficie dei granuli di amido delle varietà *soft*, ne indebolisce l'associazione con la matrice proteica e determina la *softness* dell'endosperma (Baik e Ullrich, 2008). Le friabiline risultano meno abbondanti nelle varietà di frumento tenero *hard* (Bettge *et al.*, 1995; Greenblatt *et al.*, 1995; Morris *et al.*, 1994; Oda *et al.*, 1992) e assenti nel frumento duro. L'assenza di questa classe di proteine nel frumento duro dipende dal fatto che sono codificate da geni localizzati sul braccio corto del cromosoma 5D (Jolly *et al.*, 1993). Sono state identificati due polipeptidi appartenenti alla classe delle purindoline, detti PinA e PinB. Studi recenti hanno indicato che due geni, *pinA* e *pinB* sono coinvolti nel controllo della durezza della cariosside. Nei frumenti *hard* uno dei due alleli presenta una mutazione in grado di causare l'assenza della proteina, in particolare di PinA, o di modificare la capacità di legarsi ai granuli di amido del polipeptide PinB (Giroux e Morris, 1997, 1998).

1.5.2 Il glutine

Le proprietà viscoelastiche degli impasti derivati dalle farine di frumento costituiscono un parametro di primaria importanza per la qualità del prodotto finale. Tali proprietà rappresentano un requisito essenziale per la produzione della maggior parte dei prodotti derivati da frumento. Nel caso del pane lievitato esse sono responsabili dell'intrappolamento delle molecole di anidride carbonica derivate dalla fermentazione e determinano il volume del pane stesso. Il glutine è la frazione proteica

responsabile delle caratteristiche proprietà degli impasti di frumento. Esso deriva dall'associazione delle singole subunità proteiche attraverso legami forti di natura covalente (legami disolfuro) e non covalenti (legami H), e costituisce circa l' 80% delle proteine totali (Seilmeier, 1991). Esiste una intensa letteratura che ha come oggetto di studio il glutine e coinvolge studi a livello biochimico, genetico, biofisico e tecnologico a significare l'interesse ma anche la complessità dell'argomento. Esistono due classi di proteine principali che determinano le caratteristiche degli impasti: le glutenine e le gliadine.

In particolare le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare, *High Molecular Weight* (HMW), sono presenti in strutture polimeriche stabilizzate da ponti disolfuro. Il numero e il tipo di subunità proteica di questo gruppo è positivamente correlato alla quantità e alle dimensioni molecolari dei polimeri e quindi alla forza degli impasti (Shewry, 2003). Le HMW sono considerate il maggior determinante dell'elasticità del glutine; le proteine monomeriche (gliadine) sono maggiormente responsabili per l'estensibilità degli impasti. Le *Low Molecular Weight*, glutenine a basso peso molecolare, sono i fattori determinanti della qualità delle semole di frumento duro, utilizzate principalmente nei processi di pastificazione. In frumento duro, sono state identificate due varianti alleliche delle LMW-GS, la variante LMW-1 e la variante LMW-2 che comprendono più subunità gluteniniche. Le varietà che possiedono le LMW-2 risultano avere caratteristiche qualitative (pastificabilità) superiori rispetto alle varietà che contengono le LMW-1.

1.5.3 Il contenuto proteico totale

Il contenuto proteico delle varietà di frumento commerciali è in media tra il 12% e il 14%. Frumenti caratterizzati da valori del contenuto proteico molto bassi (< 9%) o molto alti (> 15%) non sono solitamente commercializzati. I frumenti ad alto contenuto proteico vengono spesso utilizzati in miscela con frumenti a basso contenuto proteico. Il contenuto proteico dipende dalla varietà di frumento, dalla fertilità del suolo e dalle condizioni climatiche. La forte dipendenza di tale parametro da fattori ambientali rappresenta una problematica rilevante nell'attività di selezione di nuove varietà di frumento. Il miglioramento genetico di questo carattere è stato condotto, anche tramite l'incrocio con specie selvatiche, come *T. urartu* e *T. dicoccoides*.

1.6 La qualità nutrizionale

La funzione del frumento nella nutrizione umana è determinata da due fattori primari, la composizione chimica della cariosside e il livello di consumo nella dieta della popolazione degli alimenti derivati. Una valutazione del valore nutritivo del frumento, effettuata esclusivamente in considerazione del primo parametro, porterebbe alla conclusione che esso possa essere essenzialmente una fonte di calorie, essendo costituito per oltre il 70% da amido la maggior fonte di carboidrati nell'alimentazione umana (Shewry, 2009). Il largo consumo di alimenti derivati da farine o semole di frumento ne determina l'importanza come fonte di principi nutritivi rappresentati in minore percentuale nella cariosside quali proteine, fibre, micronutrienti e vitamine. È necessario inoltre sottolineare che la relazione tra la compartimentazione della cariosside (Fig. 1.3) e dei suoi costituenti e i processi di trasformazione che essa subisce nell'industria alimentare, influenzano fortemente il profilo nutrizionale dei prodotti derivati.

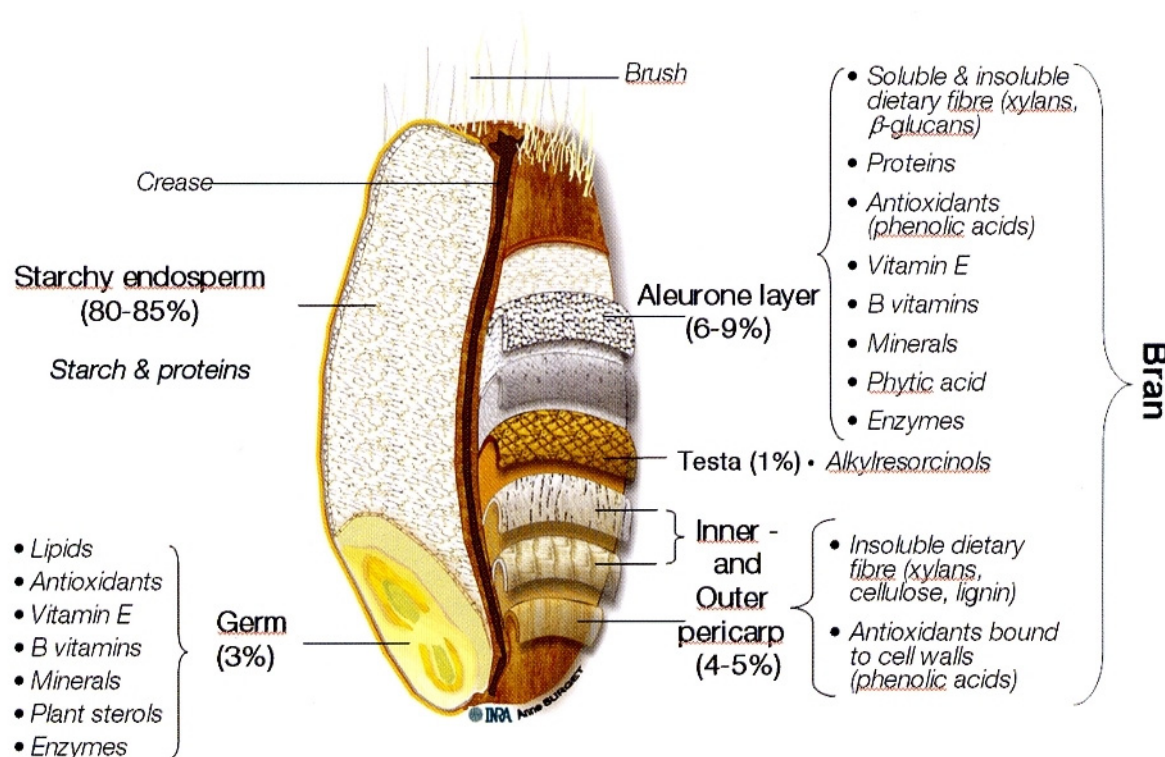


Figura 1.3. Struttura e componenti chimici della cariosside di frumento.

1.6.1 Proteine

Shewry e Halford (2002) hanno riportato che l'apporto proteico derivato dai cereali, sia nell'alimentazione umana che animale, è circa tre volte superiore a quello derivato dai legumi, caratterizzati da un contenuto proteico significativamente maggiore. Una caratteristica negativa delle proteine del frumento, e dei cereali più in generale, è rappresentata dalla carenza in alcuni amminoacidi essenziali tra cui la lisina. La selezione di varietà ricche in glutenine, proteine povere in lisina, ha avuto come conseguenza un ulteriore impoverimento in questo amminoacido essenziale. Una corretta valutazione del valore nutrizionale delle proteine di frumento deve considerare la misura in cui la deficienza in lisina sia compensata attraverso altre fonti (Bailey e Clark 1976). Inoltre l'apporto di lisina derivante dal frumento è sufficiente per le esigenze di un adulto, al contrario non lo è per i bambini (Dewettinck *et al.*, 2008).

1.6.2 Lipidi

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

1.6.3 Vitamine, minerali e phytochemicals

La deficienza nella dieta di alcuni minerali è causa di malattie importanti soprattutto nei paesi in via di sviluppo. Il frumento, soprattutto nella sua integralità, costituisce una buona fonte di minerali essenziali quali zinco, ferro e selenio. La selezione di varietà ad alta produttività è stata associata ad un significativo decremento della concentrazione di ferro e zinco nei cereali (Zhao *et al.*, 2009). Inoltre la biodisponibilità del ferro è limitata dalla sua localizzazione nello strato aleuronico della cariosside dove risulta complessato da un agente chelante che ne ostacola l'assorbimento nel tratto digestivo umano. L'apporto di selenio nella dieta è fondamentale per le sue proprietà antiossidanti, anticancerogene e antivirali. I cereali integrali forniscono un apporto significativo delle vitamine del gruppo B, in particolare tiamina, riboflavina, niacina. Il frumento è inoltre una discreta fonte di biotina

(10-100µg/100g) e di acido folico (30-90µg/100g). Essendo povero in lipidi esso tende ad essere povero in vitamine liposolubili quali, A, D, e K ma contiene valori apprezzabili di vitamina E (25 µg/g) (Dewettinck *et al.*, 2008). Studi di laboratorio hanno dimostrato che i cereali integrali per colazione hanno un contenuto di antiossidanti simile a quello di frutta e verdura (Miller *et al.*, 2000). Pur essendo presenti in piccole quantità, sostanze bioattive quali i flavonoidi suscitano notevole interesse da parte dei soggetti coinvolti nella produzione di alimenti a base di frumento. I cereali sono inoltre considerati una discreta fonte di fitoestrogeni, in particolare i lignani, che svolgono un ruolo di prevenzione di alcuni tipi di cancro negli adulti.

Vitamine, sostanze antiossidanti, minerali e proteine ricche in lisina sono presenti in percentuali apprezzabili nel germe e negli strati esterni della cariosside, frazioni rimosse durante la molitura con un guadagno nella palatabilità e una perdita nel valore nutritivo dei prodotti derivati. Tali considerazioni sono alcune delle ragioni alla base del rinnovato interesse per i cereali integrali o *whole grain*.

1.6. 4 I carboidrati nel frumento: l'amido e le fibre alimentari e il loro ruolo nell'alimentazione.

I carboidrati comprendono due macro categorie distinte sulla base del tipo di processamento che subiscono nell'apparato digerente umano (Fig. 1.4) (Dewettick *et al.*, 2008). L'amido (non resistente) e gli zuccheri solubili vengono digeriti e assorbiti dall'uomo. Al contrario le fibre alimentari risultano resistenti agli enzimi digestivi umani (Southgate, 1991). Le α -amilasi rappresentano la sola classe di enzimi umani, presenti nell'intestino tenue, in grado di metabolizzare i carboidrati complessi. Le fibre alimentari, che comprendono i *non-starch polysaccharides* (NSP) e gli oligosaccaridi (OS), sembrano resistere completamente alla digestione e, in ragione di ciò, sono definite come "componenti strutturali o essudativi della pianta non digeribili dagli enzimi digestivi umani" (Spiller, 1993). Tale resistenza è dovuta al tipo di legami presenti nella struttura del polisaccaride e alla presenza di monosaccaridi diversi dal glucosio. Gli NSP, la frazione maggiore delle fibre alimentari, sono classicamente distinti in solubili e non solubili, classificazione importante per alcuni interessanti effetti fisiologici. Il frumento è ricco in fibre insolubili alle quali è stato attribuito un ruolo maggiore nella prevenzione e cura della stipsi e patologie correlate. Diversi studi hanno dimostrato che tale effetto fisiologico è dose-dipendente ed è dovuto esclusivamente alla "presenza fisica" delle fibre che determina un aumento della massa fecale e ne velocizza il transito intestinale (Aldoori *et al.*, 1998).

Il consumo di alimenti ricchi in fibre solubili, quali prodotti derivati da orzo e avena, è stato associato alla riduzione del tasso di colesterolo nel sangue e alla prevenzione di patologie correlate, quali

malattie cardiovascolari (CHD) e diabete (Plaami, 1997). Tuttavia gli studi che mirano a chiarire il ruolo fisiologico delle fibre solubili non hanno dato risposte esaustive. È stato riportato che l'assunzione di cereali integrali, tra cui il frumento (povero in fibre solubili), determina un abbassamento del rischio di CHD in maniera dose dipendente. Al contrario l'assunzione di fibre alimentari e, in particolare, della crusca di frumento, non incide sul livello di colesterolo nel sangue (Truswell, 2002). È stato ipotizzato che la procedura di isolamento della frazione *soluble NSP* possa provocare modifiche importanti delle loro proprietà strutturali e fisiologiche. In generale è chiaro che l'assunzione di cereali integrali comporti effetti fisiologici che migliorano la salute e abbassano il rischio di alcune malattie, ma non sono state determinate tutte le relazioni di causa-effetto con i componenti della cariosside; è possibile che le fibre non rappresentino l'unico fattore di protezione dalle malattie cardiovascolari esercitato dai cereali integrali e prodotti derivati (Topping, 2007).

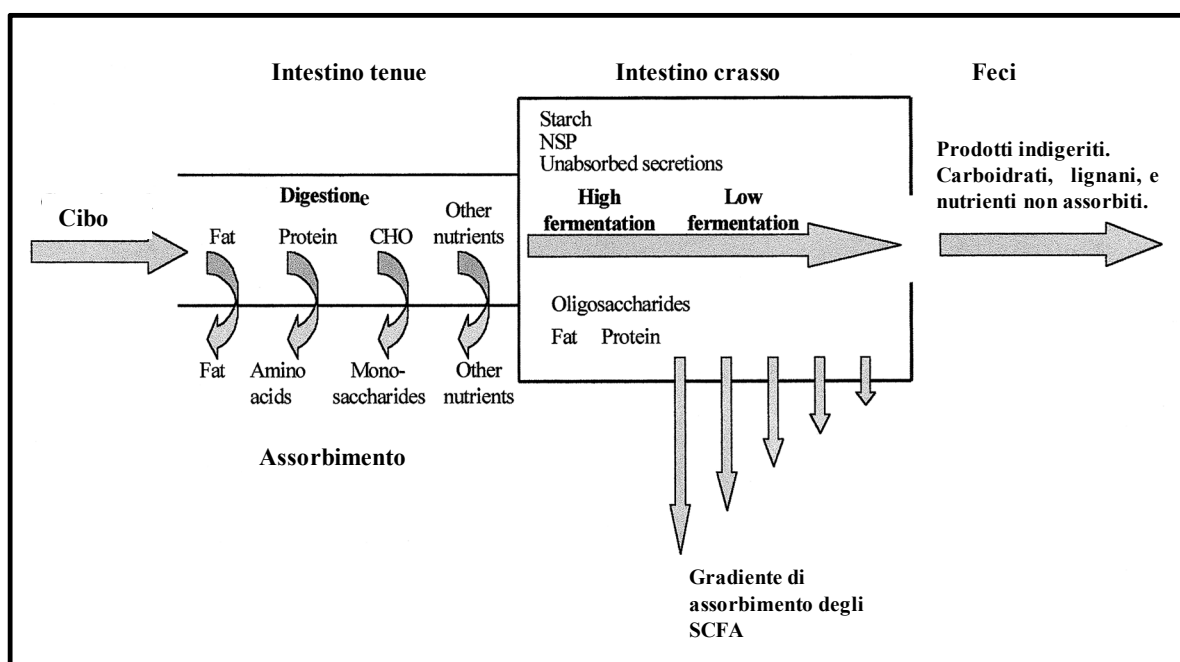


Figura 1.4. Rappresentazione delle relazioni tra il transito intestinale del cibo nel tratto gastrointestinale, la digestione dei nutrienti nell'intestino tenue e la fermentazione nell'intestino crasso. I componenti non digeriti dall'azione degli enzimi endogeni nell'intestino tenue vengono fermentati dalla flora batterica nell'intestino crasso. Il grado di fermentazione è elevato nel primo tratto dell'intestino crasso, così come la produzione di SCFA; il secondo tratto del colon è la regione con minore concentrazione di SCFA ed è la sede di maggior sviluppo delle patologie intestinali. (modificata da Topping *et al.*, 2001).

L'amido è il costituente maggiore della cariosside di frumento e rappresenta la maggiore fonte di energia nell'alimentazione umana e animale. Esso viene digerito nell'intestino tenue e ridotto a zuccheri semplici. La suscettibilità dell'amido all'attacco enzimatico da parte delle α -amilasi dipende dalla sua struttura chimico-fisica che presenta numerose varianti. In generale l'accesso alla sua struttura è determinato dalla presenza di legami α -1,4 glucosidici. Esiste una categoria di amidi definita "resistente" in ragione della sua non suscettibilità all'attacco degli enzimi digestivi umani. Con l'espressione "amido resistente" (*Resistant Starch*-RS) si intende l'amido e i prodotti della sua digestione che passano intatti nell'intestino crasso. Sono state definite quattro classi di amido resistente, in base alle caratteristiche strutturali dell'amido stesso o della matrice alimentare che lo contiene. L'amido resistente di classe 1 (RS1) è inaccessibile all'attacco enzimatico a causa del tessuto, organo o matrice alimentare che lo contengono. RS2 comprende due sottoclassi, RS2a corrisponde all'amido nel suo stato granulare non processato. Questo tipo di amido perde la sua resistenza durante il processo di cottura. RS2b corrisponde ad amidi caratterizzati da un alto contenuto di amilosio che sono in grado di mantenere una percentuale significativa di granuli intatti durante il processamento. RS3 si riferisce ad una frazione di amido che si forma durante la cottura del prodotto alimentare attraverso il processo di gelatinizzazione dei granuli di amido e riassociazione delle molecole di amilosio rilasciate (retrogradazione). La frazione di amido retrogradato (RS3) cresce al crescere della percentuale di amilosio. L'amilosio contribuisce quindi all'aumento della frazione di amido resistente attraverso due meccanismi differenti: contribuendo all'integrità dei granuli di amido nel prodotto alimentare processato e attraverso la retrogradazione dell'amilosio derivante dalla gelatinizzazione e dispersione dell'amido nell'alimento (Morell *et al.*, 2004). RS4 è l'amido chimicamente modificato attraverso reazioni di sostituzione (esterificazione, cross-linking).

In base alle sue caratteristiche nutrizionali l'amido è stato classificato anche come amido "glicemico" o "resistente". Gli amidi "glicemici" sono quelli che vengono idrolizzati a unità di glucosio nel tratto digestivo e possono essere *Rapidly Digestible Starch* (SDS) o *Slowly Digestible Starch* (RDS). Gli amidi RDS vengono rapidamente idrolizzati a glucosio nell'intestino tenue in circa 20 minuti e si trovano in cibi appena cotti come pane o patate dove la rottura dei granuli rende l'amido facilmente accessibile agli enzimi digestivi. La categoria SDS comprende amidi la cui digestione dura tra i 20 e 110 min ed è completa; essi si trovano nei cereali o sottoforma di granuli o come amido retrogradato (Sharma *et al.*, 2008). Nel paragrafo successivo saranno discussi gli effetti e i relativi meccanismi fisiologici dell'amido resistente e il loro impatto sulla salute umana.

1.6.5 L'amido resistente come fibra funzionale

L'amido resistente (*Resistant Starch-RS*) non è propriamente una fibra alimentare ma può essere considerato una "fibra funzionale" (Sharma *et al.*, 2008). Il metodo AOAC per l'analisi delle fibre, richiesto per l'etichettatura nutrizionale degli alimenti in USA, include, nel *total dietary fibre* (TDF), l'amido resistente. L'RS, nutrizionalmente, è molto più simile alle fibre che non all'amido stesso. Come le fibre esso ha un impatto positivo sulla salute del colon contribuendo all'aumento della velocità di riproduzione cellulare e diminuendo l'atrofia del colon. Inoltre l'amido resistente svolge un ruolo positivo nella modulazione della glicemia e del tasso di colesterolo nel sangue.

1.6.6 La funzionalità dell'amido resistente nella salute umana

1.6.6.1 Il ruolo degli SCFA e il butirrato

Diversi studi riportano che dal 30% al 70% di RS viene degradato ad acidi grassi a catena corta dalle amilasi batteriche. In particolare in frumento il 65% di RS3 è risultato degradato dalla flora intestinale. La flora batterica intestinale fermenta i carboidrati complessi non digeribili riducendoli, negli adulti, a SCFA, gas quali monossido di carbonio, idrogeno molecolare e metano ed energia sottoforma di calore (Cummings *et al.*, 1996). Gli SCFA prodotti in maggiore percentuale nell'uomo sono il butirrato, il propionato e l'acetato. Le caratteristiche più interessanti della fermentazione dell'RS riguardano la produzione elevata di butirrato e la bassa velocità del processo fermentativo. L'ambiente acido derivante dalla presenza degli SCFA promuove la crescita della flora batterica e inibisce la proliferazione di alcuni batteri patogeni. Inoltre l'abbassamento del pH comporta la ionizzazione di alcuni composti alcalini citotossici, quali ad esempio l'ammonio, inibendone l'assorbimento da parte dell'organismo (Bird *et al.*, 2000). Gli acidi grassi a catena corta costituiscono un metabolita essenziale per la salute delle cellule del colon: essi aumentano l'afflusso di sangue nel colon, abbassano il pH e aiutano a prevenire lo sviluppo di colonociti abnormali. Altri effetti degli SCFA sono la stimolazione della contrazione del colon che ne migliora il tono muscolare, l'ossigenazione e il trasporto dei nutrienti. Recentemente il butirrato ha focalizzato su di sé l'attenzione di molti per le sue proprietà peculiari nel mantenimento della salute del colon. È stato riportato che il butirrato è essenziale per il mantenimento di un fenotipo normale dei colonociti e che esso agisce attraverso meccanismi di riparazione del DNA danneggiato o di induzione di morte programmata in cellule trasformate (Candido, 1978). L'incorporazione di RS nelle soluzioni di reidratazioni per pazienti con diarrea ha accelerato i tempi di guarigioni e abbassato la perdita di acqua. La produzione e l'assorbimento di SCFA dall'amido resistente fornisce circa 1,7 Kcal per grammo all'organismo.

1.6.6.2 RS e il cancro al colon

Uno degli effetti più interessanti dell'amido resistente è il suo ruolo nella prevenzione di una patologia molto diffusa nei paesi industrializzati, il cancro al colon. A tal proposito esiste un'intensa attività di studio e ricerca che si pone alcuni interrogativi centrali: quali siano i meccanismi e la misura in cui l'RS contribuisca a tale prevenzione e quale sia il rapporto, in tale contesto, tra l'RS e i NSP. Diversi studi hanno dimostrato il ruolo del butirrato nella soppressione della crescita di cellule tumorali *in vitro*. Toden *et al.* (2007) hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione negativa tra la concentrazione di butirrato nell'intestino crasso, derivante dalla somministrazione di RS attraverso la dieta, e il livello di danneggiamento del DNA dei colonociti di ratti che erano stati in precedenza esposti a fattori di danneggiamento del genoma. Le Leu *et al.* (2005) hanno riportato un significativo ruolo di protezione del RS in topi in cui era stato indotto, chimicamente, un tumore al colon.

Topping, nella sua *review* del 2007, sottolinea che non esistono riscontri della possibilità che gli NSP dei cereali vengano fermentati nell'intestino. Inoltre egli punta l'attenzione sull'incapacità, della maggior parte degli studi eseguiti, di rilevare un effetto di protezione di tale componente delle fibre nella prevenzione del cancro al colon. Bingham *et al.* (2003) hanno dimostrato un effetto di prevenzione dose dipendente delle fibre alimentari rispetto al cancro. In tale studio il contenuto totale di fibre era stato stimato attraverso un metodo che, nel TDF (contenuto totale di fibre) include anche l'amido resistente. Topping conclude ipotizzando che l'amido resistente, piuttosto che i polisaccaridi non solubili, possa essere il maggiore responsabile dell'azione protettiva dei cereali integrali contro l'insorgenza del cancro.

1.6.6.3 Indice glicemico, colesterolo nel sangue, assorbimento di minerali

La presenza di percentuali significative di amido resistente contribuisce all'abbassamento dell'indice glicemico dell'alimento consumato. Cibi ricchi in RS rilasciano il glucosio lentamente, abbassando la produzione di insulina e aumentando l'utilizzo dei grassi di riserva dell'organismo. Per tali ragioni l'amido resistente può svolgere un ruolo positivo nella prevenzione di malattie quali il diabete e nel trattamento dell'obesità e nel controllo del peso corporeo (Nugent, 2005). Diversi studi hanno dimostrato che RS svolge una funzione prebiotica aumentando la sopravvivenza dei batteri acido lattici (LAB) assunti attraverso l'alimentazione (probiotici) (Brown *et al.*, 1998). Inoltre l'abbassamento del pH, derivante dalla sua fermentazione nell'intestino, determina una maggiore solubilità dei minerali favorendone l'assorbimento da parte dell'organismo. È stato riportato che RS svolge un ruolo positivo nell'ulcera, diverticolite e stipsi (Nugent, 2005).

1.6.7 Farine e semole di frumento.

La farina e la semola, rispettivamente ottenute dalla molitura del frumento tenero e del frumento duro, rappresentano l'ingrediente principale per la produzione degli alimenti a base di frumento. La farina viene recuperata, attraverso le moderne tecniche di molitura, con una resa del 60% del frumento macinato dopo aver rimosso il germe e la crusca. La farina (semola) è costituita principalmente da amido (ca 75%), acqua (ca 12-14%), e proteine (ca. 8-16%) e da costituenti minori quali NSP (2-3%), lipidi (ca 2%) e minerali (ca 1%). La qualità degli sfarinati di frumento dipende dalle caratteristiche e dalle percentuali dei singoli componenti. Le caratteristiche delle diverse tipologie di sfarinati sono definite da una specifica normativa nel nostro paese che disciplina la lavorazione e il commercio dei cereali, degli sfarinati, del pane e delle paste alimentari, stabilendo i limiti di alcuni parametri analitici. Tra i parametri definiti per legge, il tenore in sostanze minerali di una semola o di una farina può essere considerato come un indice della sua purezza, ossia della contaminazione da parte degli strati periferici. In Italia, il tasso in ceneri di semole e farine è fissato dalla legislazione. Nel caso del frumento duro la maggior parte degli sfarinati prodotti, circa il 90%, è destinata alla produzione di pasta alimentare; gli sfarinati di frumento tenero sono impiegati per una pluralità di prodotti lievitati da forno. In questo caso, la destinazione d'uso è stabilita sulla base delle caratteristiche qualitative della farina.

1.7 Struttura e composizione chimica dell'amido

L'amido, in natura, costituisce la maggiore forma di energia stoccata negli organismi vegetali superiori. L'amido di riserva nei cereali viene sintetizzato durante lo sviluppo e la maturazione dell'endosperma ed è utilizzato, attraverso un processo di degradazione e la produzione di alcuni metaboliti, durante la fase di germinazione della pianta quale fonte di carbonio ed energia. La struttura fisica identificativa dell'amido è il granulo, il livello di organizzazione di grado più elevato assunto dalla popolazione di molecole che lo compongono. I granuli sono una struttura semicristallina con dimensioni e forme caratteristiche di ciascuna specie.

1.7.1 Composizione chimica

Dal punto di vista chimico l'amido è un carboidrato costituito da popolazioni di polimeri di D-glucosio, storicamente classificate in due categorie distinte, l'amilosio e l'amilopectina, in base al grado di polimerizzazione (DP) e alla frequenza delle ramificazioni. In generale tutte le molecole di amido presentano esclusivamente molecole di D-glucosio unite da legami glucosidici α -1,4 e punti di ramificazione introdotti sulla struttura lineare attraverso legami α -1,6. Il termine amilosio è utilizzato

per identificare molecole caratterizzate da basso DP (grado di polimerizzazione) (< 3000) e con una frequenza di ramificazioni inferiore all'1%. L'amilopectina comprende molecole con $DP > 5000$ e un'elevata frequenza di punti di ramificazione (3-4%). Questo tipo di classificazione, seppur consolidata, non considera l'esistenza di molecole con caratteristiche intermedie il che ha portato a coniare nuove definizioni quali "intermediate starch" o "apparent amylose". Diversi studi hanno indagato sulla variabilità delle percentuali relative delle due classi di molecole in frumento, includendo nelle analisi, specie coltivate, selvatiche e progenitrici, e hanno concluso che l'amilosio rappresenta tra il 18 e il 35% dell'amido totale (amilopectina 65%-82%) (Zeng *et al.*, 1997; Mohammadkhani *et al.*, 1998; Stoddard e Sarker 2000). Il rapporto quantitativo amilosio-amilopectina è un fattore determinante delle proprietà chimico-fisiche dell'amido. Le dimensioni e il numero di ramificazioni delle molecole polimeriche rappresentano, in ultima analisi, i fattori primari che determinano le caratteristiche funzionali dell'amido.

1.7.2 Struttura fisica dell'amido

La composizione chimica elementare dell'amido non trova corrispondenza nella sua struttura, la cui complessità rende necessario l'utilizzo di particolari parametri per identificare i suoi componenti. Questi parametri risultano utili specialmente per l'analisi della struttura complessa dell'amilopectina.

Nell'amilopectina catene di glucosio di dimensioni minori sono raggruppate in strutture definite "clusters"; i singoli cluster sono interconnessi attraverso uno scheletro principale costituito da catene glucaniche di dimensioni maggiori. Nella nomenclatura classica (Peat *et al.*, 1952) si distinguono catene di tipo "A", non sostituite, e catene di gruppo "B" sostituite (Fig 1.5a). La macromolecola contiene anche una singola catena di tipo "C" caratterizzata da un gruppo riducente libero. Le catene di tipo B sono ulteriormente suddivise in catene di tipo "Ba" e catene di tipo "Bb", rispettivamente caratterizzate dalla presenza di almeno una sostituzione di una catena "A" e dalla sostituzione di sole catene "B" (Hizukuri e Maehara, 1990). Le catene di tipo B sono inoltre classificate in base alla posizione assunta rispetto al cluster; le catene B1 sono corte e compongono il cluster. All'interno di ciascun singola catena si distinguono segmenti definiti "catene esterne" o "catene interne" a seconda della posizione rispetto al punto di ramificazione più lontano dall'estremità riducente. Tutte le catene di tipo "A" sono catene esterne, le catene "B" comprendono catene esterne ed interne; l'insieme dei residui glucosidici da cui si sviluppano i punti di ramificazione costituiscono la "*total internal chain*" o "*core chain*" (Bertoft, 1991; Yun e Matheson, 1993). La definizione della struttura fine dell'amilopectina è stata possibile attraverso analisi basate su specifiche reazioni di idrolisi enzimatica dell'amido. Le informazioni sulla struttura dell'amilosio ad oggi disponibili non sono molto

dettagliate. Takeda *et al.* (1987) hanno riportato che l'amilosio dei cereali ha un DP tra 1000 e 2000. La figura 1.5b mostra la tipica struttura ad elica assunta dalla catene di amilosio.

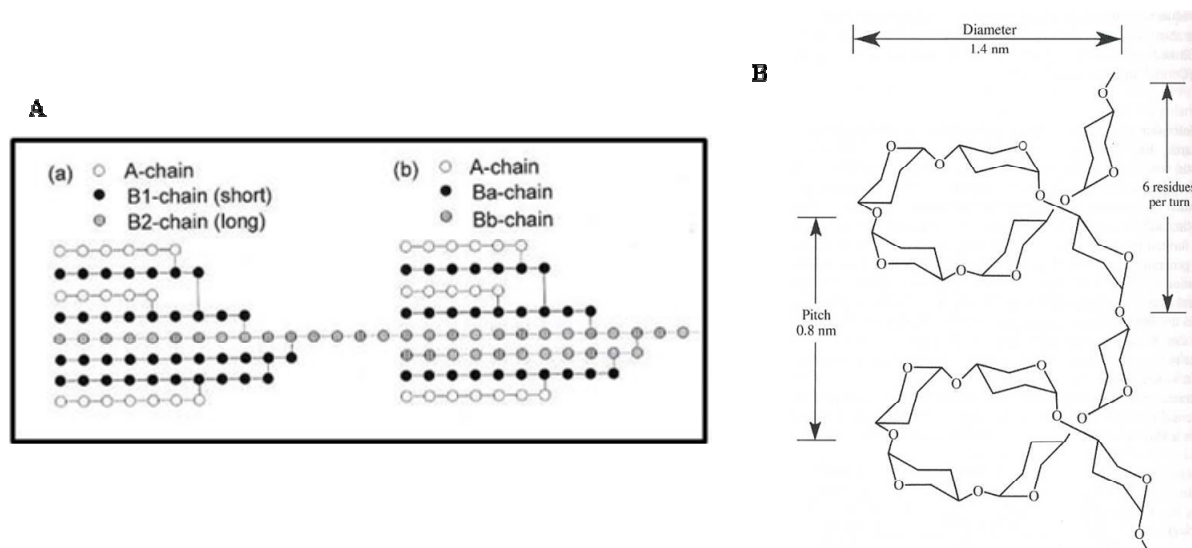


Figura 1.5. **a)** Definizione dei tipi di catene e dei segmenti di catena all'interno della struttura dell'amilopectina. I cerchi rappresentano le unità di glucosio; le linee orizzontali i legami α -1,4 e quelli verticali i legami α -1,6. **b)** conformazione ad elica della molecola di amilosio contenente 6 unità di glucosio per giro.

1.7.3 L'unità strutturale dell'amido

I granuli di amido sono stati definiti come un "materiale gerarchico" nel quale la struttura di un livello di organizzazione determina la struttura del livello organizzativo successivo (Myers *et al.*, 2000). I "clusters" rappresentano il livello inferiore di questa organizzazione e sono costituiti dalle "catene esterne" dell'amilopectina associate in strutture a doppia elica. Tali strutture sono semicristalline e costituiscono l'unità ripetuta di 9 nm la cui presenza è stata riscontrata in amidi di diversi taxa (Waigh *et al.*, 2000). I *clusters* comprendono, inoltre, regioni di amilosio alternate alle catene esterne dell'amilopectina. Gruppi di 4-10 *clusters* sono organizzati a formare strutture di ordine superiore, chiamate "lamellae", con spessore fino a 100 nm. Gallant *et al.* (1997) hanno proposto l'ipotesi dell'esistenza di una struttura di livello superiore costituito da un assemblaggio a spirale dei *clusters* e responsabile di una stratificazione ordinata delle lamellae, definita "blockets" caratterizzata da uno spessore fino a 500 nm. Gli strati più esterni dei granuli sono costituiti da anelli concentrici caratterizzati da spessore da 100 nm fino a 1 μ m (Fig. 1.6). È stata riportata la presenza di canali radiali interni ai granuli ed è stato ipotizzato che tali regioni possano essere essenziali in una serie di

interazioni alla base di importanti processi enzimatici, fisici e chimici che coinvolgono l'amido (Gallant *et al.*, 1997; Huber e BeMiller, 2000). La specie presenti nella tribù delle *Triticeae*, frumento, orzo e segale, presentano una distribuzione bimodale di tali strutture distinte in granuli di tipo A e granuli di tipo B (Fig. 1.7). In frumento i primi hanno forma ellissoidale e diametro da 15 a 30 μm , i secondi hanno forma sferica e diametro fino a 10 μm . Le due tipologie di granuli sono sintetizzate con tempistiche differenti durante il periodo di maturazione della cariosside. La sintesi dei granuli di tipo A ha inizio quattro giorni dopo la fioritura (DPF) e continua fino a venti giorni post antesi. La sintesi dei granuli di tipo B ha inizio a dieci giorni ed è interessata da un incremento significativo venti giorni dopo l'antesi (Parker, 1985). Queste differenze sono considerate un fattore determinante per le dimensioni dei granuli e per l'organizzazione strutturale di amilosio e amilopectina (Tester *et al.*, 1997). Le dimensioni, la forma e la distribuzione dei granuli hanno valori caratteristici per ciascuna specie vegetale. In frumento i granuli di tipo A rappresentano solo il 2-4% del numero di granuli presenti nell'endosperma maturo, comprendendo circa il 75% in peso dell'amido totale. Diversi studi hanno dimostrato l'influenza della distribuzione dei granuli sulla funzionalità e le proprietà di *pasting* dell'amido (Chiotelli e Le Meste, 2002; Liu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2004; Sahlstrom *et al.*, 2003; Ao e Jane, 2007). La distribuzione dei granuli in frumento è controllata da fattori genetici e ambientali (Stoddard, 1999; Stoddard, 2003).

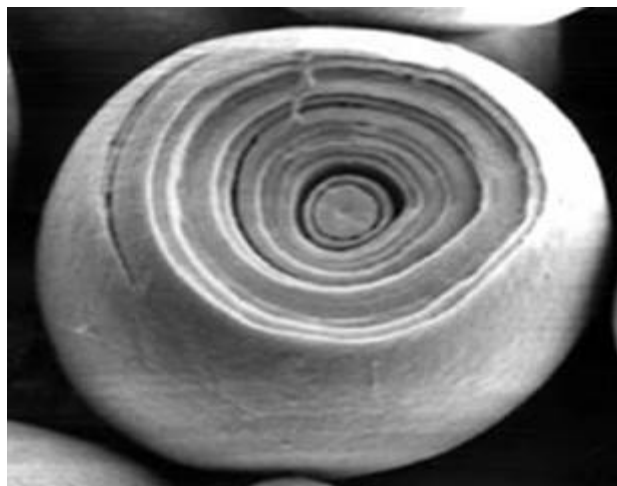


Figura 1.6. Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) della struttura ad anelli concentrici dei granuli di amido.

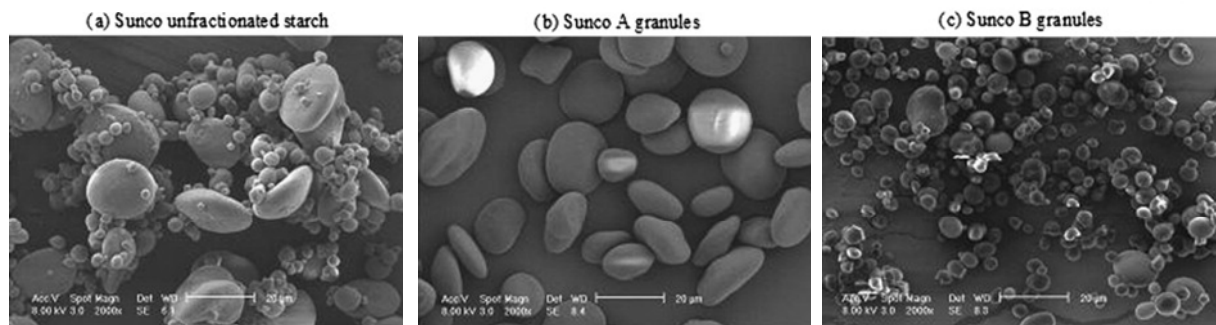


Figura 1.7. Immagine SEM di **a)** amido di frumento **b)** frazione arricchita di granuli A; **c)** frazione arricchita di granuli B (Salman *et al.*, 2009).

1.7.4 Componenti associati ai granuli di amido

I lipidi costituiscono la componente non amidacea più importante nei granuli. Nei cereali sono presenti prevalentemente lisofosfolipidi che si trovano sotto forma di complesso con l'amilosio. I lipidi sono maggiormente concentrati sulla superficie dei granuli (Baldwin *et al.*, 2001) e influenzano le interazioni enzimatiche e l'assorbimento di acqua da parte dei granuli. Internamente ai granuli di amido, in frumento, sono state localizzate diverse proteine coinvolte nel processo di biosintesi dell'amido con peso molecolare da 60 a 150 kDa note come SGP-*Starch Granule Proteins*.

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). Le SGP di peso molecolare 75, 100 e 105 kDa sono risultate, mediante sequenza amminoterminale, saggi di attività enzimatica e reazione con anticorpi monoclonali, amido sintasi; la proteina Sgp-2 (85 kDa) presenta alta omologia con la proteina SBEIIb 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 SDS-PAGE è possibile visualizzare le proteine legate ai granuli d'amido (Fig. 1.8).

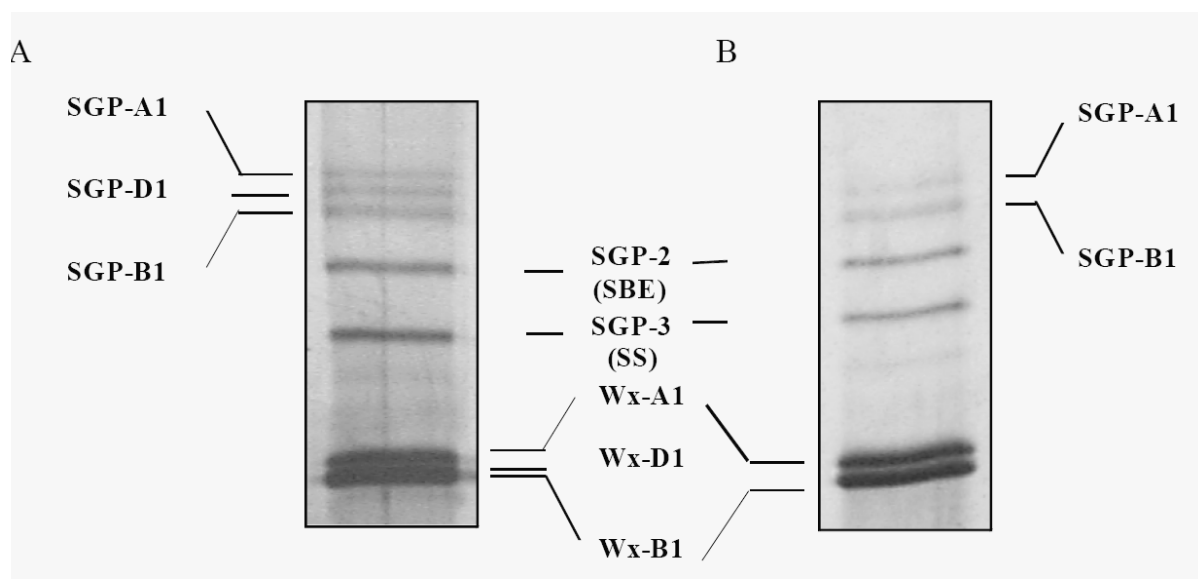


Figura 1.8. SDS-PAGE delle proteine estratte dai granuli d'amido isolate da cariossidi di frumento tenero (A) e duro (B).

Peng *et al.* (2000) hanno riportato la presenza di una nuova isoforma BEI ad alto peso molecolare presente nelle specie appartenenti alle *Triticeae*. Tale proteina risulta presente solo nei granuli di tipo A. Sulla superficie dei granuli in frumento sono presenti le friabiline, proteine di 15kDa responsabili della durezza della cariosside. Esse sono presenti in abbondanza nei frumenti *soft*, scarsamente in quelli *hard* e del tutto assenti nel frumento duro (Greenwell e Scholfield, 1986).

1.8 Biosintesi dell'amido

Nelle piante superiori la sintesi dell'amido ha luogo in diversi tessuti della pianta all'interno di organelli sub-cellulari riconducibili ad un'origine evolutiva comune, i plastidi. Nei tessuti verdi l'amido primario viene sintetizzato all'interno dei cloroplasti; la sintesi dell'amido di riserva è localizzata negli amiloplasti. Il saccarosio rappresenta la fonte di glucosio. Esso deriva dalla fotosintesi primaria o dalla mobilizzazione di alcuni carboidrati stoccati nei tessuti della pianta. La via biosintetica dell'amido è costituita da quattro fasi che coinvolgono le seguenti classi di enzima: l'ADP-glucosio pirofosforilasi AGPasi, le amido sintasi (SS), gli enzimi di ramificazione (BE), gli enzimi di deramificazione (DBE). L'amilosio e l'amilopectina vengono sintetizzati attraverso due *pathway* distinti che condividono lo stesso substrato, l'ADP-glucosio (Fig. 1.9). Un solo enzima appartenente alla classe delle amido sintasi, in particolare GBSS, è responsabile della sintesi dell'amilosio. Le tre classi di enzimi SS, SBE e DBE partecipano con diverse isoforme alla sintesi della complessa struttura dell'amilopectina.

cereali l'isoforma citosolica rappresenta l'isoforma maggiore (Burton *et al.*, 2002). Le due isoforme sono codificate da gruppi di geni differenti; ciò è stato confermato attraverso l'analisi di un mutante di orzo privo delle subunità minori della AGPasi citosolica ma che conserva le subunità minori dell'isoforma plastidiale (Johnson *et al.*, 2003). La disponibilità di mutanti caratterizzati dalla mancanza delle subunità citoplasmatiche in mais (Tsai e Nelson, 1966) e in orzo (Johnson *et al.*, 2003) ha suggerito che il flusso primario della sintesi dell'amido avviene a carico dell'AGPasi citoplasmatica. Tali mutanti, *bt2* e *sh2* in mais e *RisØ 16* in orzo, presentano infatti un basso contenuto di amido in accordo con l'ipotesi che attribuisce un ruolo primario all'isoforma citoplasmatica. In frumento la produzione di linee mutanti per ciascuna subunità delle AGPasi è resa complessa dall'esistenza di multipli gruppi di geni dovuta alla natura poliploide del genoma. Le AGPasi sono soggette a diversi meccanismi di regolazione a livello genico, attraverso la duplicazione dei geni e la modulazione dell'espressione, e a livello proteico attraverso regolazione allosterica, modificazioni post tradizionali e compartimentazione. L'esistenza di due isoforme, citoplasmatiche e plastidiale, e di due tipi di subunità è un esempio di duplicazione genica. La regolazione allosterica è mediata da due molecole effettrici il 3-fosfoglicerato (3PGA) e l'ortofosfato inorganico (Pi).

1.8.3 Il trasporto dell'ADP-glucosio nei plastidi

L'identificazione del mutante *Brittle-1* in mais, caratterizzato da un basso contenuto in amido e da accumuli di ADP-glucosio, ha portato all'identificazione di un nuovo soggetto coinvolto nel processo biosintetico dell'amido al quale è stato riconosciuto il ruolo di trasportatore dell'ADP-glucosio, sintetizzato nel citoplasma, all'interno dei plastidi (Shannon *et al.*, 1998). La proteina trasportatrice, denominata *Brittle*, è presente in tutti i cereali.

1.8.4 Sintesi dell'amilosio

L'enzima GBSS è stata identificata come l'amido sintasi deputata alla sintesi dell'amilosio nei plastidi. Questo enzima è localizzato principalmente all'interno dei granuli di amido e, in misura minore, adeso alla loro superficie. In tutti gli organismi vegetali la mancanza di questo enzima è stata associata ad un fenotipo caratterizzato da livelli di amilosio drasticamente ridotti. Nei cereali l'aggettivo *waxy* è utilizzato per descrivere l'aspetto ceroso delle cariossidi prive di amilosio. Sia nelle piante monocotiledoni che dicotiledoni esistono due classi di GBSS, una espressa nell'endosperma (GBSSI) e un'altra negli altri tessuti della pianta (GBSSII) (Nakamura *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2002). Nel frumento esaploide esistono tre isoenzimi GBSSI, caratterizzati da diversa mobilità elettroforetica su gel SDS (Fig 1.10), codificati da 3 geni *Wx-A1*, *Wx-D1*, *Wx-B1* localizzati

rispettivamente sui bracci corti dei cromosomi 7A e 7D e sul braccio lungo del cromosoma 4A (risultato di una traslocazione dal braccio corto del cromosoma 7B) (Chao, 1989; Miura, 1994; Yamamori, 1994). Nel frumento duro tetraploide sono presenti solo le due proteine waxy Wx-A1 e Wx-B1 che in SDS-PAGE presentano una mobilità elettroforetica identica a quelle corrispondenti presenti in frumento tenero. In frumento tenero e in frumento duro sono stati prodotti genotipi “waxy” e “parzialmente waxy” rispettivamente caratterizzati dall’assenza di tutte o alcune delle tre proteine GBSSI. Le linee completamente waxy sono caratterizzate da un contenuto di amilosio prossimo allo zero. In generale i genotipi waxy presentano amidi con caratteristiche funzionali profondamente diverse dai genotipi wild-type che determinano la possibilità di nuovi usi e applicazioni degli amidi di frumento. Studi biochimici hanno dimostrato che l’enzima GBSS è “processivo” (si lega al substrato e aggiunge nuovi residui alla stessa catena) piuttosto che “distributivo” (distribuisce nuovi residui su differenti catene) nelle catene crescenti di amilosio (Denyer *et al.*, 1999). Si è ipotizzato che l’enzima GBSS agisca negli spazi interstiziali del granulo, inserendo l’amilosio direttamente nella matrice della regione amorfa tra le zone cristalline dell’amilopectina. L’attività di questa proteina è stimolata dalla presenza di piccole catene di malto-oligosaccaridi che agiscono come molecole di innesco per l’allungamento (Denyer *et al.*, 1999b). È stato anche riportato che l’amilopectina potrebbe stimolare l’attività delle GBSS, suggerendo l’importanza della matrice dei granuli sulla funzionalità dell’enzima (Denyer *et al.*, 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.

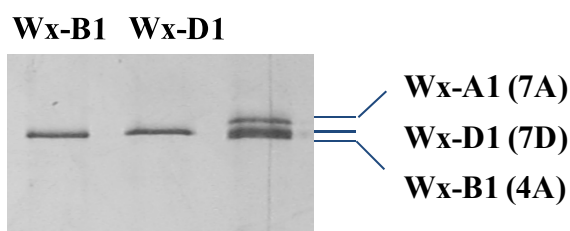


Figura 1.10. Profilo elettroforetico delle tre isoproteine Waxy in frumento tenero.

1.8.5 Sintesi dell'amilopectina

Studi effettuati sui genomi di piante quali, *Arabidopsis* e riso, hanno evidenziato la presenza di sei geni codificanti per le amido sintasi (Ball e Morell, 2003). È stata riportata l'esistenza di cinque classi di SS in pianta. Quattro di queste classi si trovano prevalentemente in forma solubile (SSI-IV), mentre la quinta classe GBSSI è un enzima legato ai granuli. Attraverso diversi approcci sono stati prodotti genotipi mutanti per ciascuna classe di SS. Il quadro generale che emerge dagli studi di tali mutanti evidenzia che ciascun enzima è responsabile della sintesi di polimeri glucanici di dimensioni specifiche all'interno della struttura dell'amilopectina. In riso è stata riscontrata la presenza di famiglie geniche, per ciascuna classe di amido sintasi, costituite da geni duplicati; ciascun gene appartenente alla famiglia genica di una classe viene espresso in uno specifico tessuto della pianta (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. Lo studio di amidi waxy ha generato l'ipotesi di un coinvolgimento delle isoforme GBSS nella sintesi delle catene lunghe dell'amilopectina che legano diversi "clusters" tra loro (Yoo e Jane, 2002a; Yoo e Jane, 2002b). 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. Sulla base di recenti lavori (Delvalle *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2006) si può ipotizzare che le amido sintasi SSI hanno un ruolo nella sintesi delle catene A e B1 dell'amilopectina. La mancanza degli enzimi di classe II ha effetti maggiori sia sul contenuto di amido che sulla sua struttura, provocando una diminuzione delle catene di lunghezza intermedia nell'amilopectina. La soppressione delle amido sintasi SSIII porta ad una diminuzione marginale nel contenuto di amido ed una diminuzione nella proporzione di catene lunghe nell'amilopectina, e per questa ragione è stato proposto un ruolo nella sintesi delle catene lunghe.

1.8.5.1 Le amido sintasi di classe I (SSI)

Studi biochimici sulle amido sintasi legate ai granuli (Sgp) in mais hanno rilevato la presenza di due attività amido sintasiche, SSI e SSII, presenti anche nell'endosperma delle cariossidi di frumento in via di sviluppo (Denyer *et al.*, 1995). In frumento tenero la proteina Sgp-3 è codificata da tre geni *SSI* localizzati sul braccio corto del cromosoma 7. Un singolo locus omeologo è presente in ciascun genoma (Li *et al.*, 1999). In frumento l'espressione del gene *SSI* inizia 3 giorni dopo la fioritura (DAF), raggiunge il picco a 10 DAF e declina a bassi livelli a partire da 20 DAF (Li *et al.*, 1999). Il gene *SSI* è stato identificato in numerosi organismi vegetali. L'identificazione e lo studio di mutanti difettivi per l'enzima SSI in *Arabidopsis* (Delvalle *et al.*, 2005) e in riso (Fujita *et al.*, 2006) ha

rivelato che l'enzima è principalmente coinvolto nella sintesi delle catene corte dell'amilopectina (DP 8 e 12). La temperatura di gelatinizzazione dell'amido risulta incrementata nei mutanti *SSI* (Fujita *et al.*, 2006).

1.8.5.2 Le amido sintasi di classe II (SSII)

In riso sono stati individuati tre geni codificanti le amido sintasi di classe II (Jiang *et al.*, 2004; Hirose e Terao, 2004) caratterizzati da espressione spazio temporale differenziale. In mais sono state identificate due proteine SSII: l'*SSIIa* espressa prevalentemente nell'endosperma e l'*SSIIb* espressa in foglia (Harn *et al.*, 1998; Imparl-Radosevich, 1999). In frumento le tre proteine associate ai granuli di amido, descritte come Sgp-1 (Yamamori e Endo, 1996), appartengono alla classe SSII; le sequenze geniche dei tre isoenzimi hanno un'elevata omologia con l'*SSIIa* di mais (Li *et al.*, 1999). Le proteine *SSIIa* di frumento sono localizzate, nella fase iniziale dello sviluppo dell'endosperma, sia nella frazione solubile che legate ai granuli; nella cariosside matura le Sgp-1 si trovano principalmente all'interno dei granuli (Li *et al.*, 1999). In frumento le tre proteine Sgp-1, (Sgp-A1, Sgp-B1 e Sgp-D1) (Fig. 1.11) sono codificate da tre geni distinti, localizzati sui bracci corti dei cromosomi 7A, 7B e 7D (Li *et al.*, 1999). L'isoforma *SSIIa* gioca un ruolo importante nella sintesi dell'amido nell'endosperma dei cereali. Nel mutante *rug-5* di pisello la mancanza dell'enzima *SSIIa* è stata associata ad una diminuzione nel contenuto di amido, un incremento nel contenuto di amilosio e all'alterazione della morfologia dei granuli e della struttura dell'amilopectina (Craig *et al.*, 1998). In frumento sono state identificati e caratterizzati genotipi privi di ciascuna delle tre proteine Sgp-1 (Yamamori *et al.*, 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). Yamamori *et al.* (2000) e Lafiandra *et al.* (2010) hanno descritto genotipi di frumento *Sgp1* nulli caratterizzati da significativi incrementi di amilosio e nuove proprietà viscoelatiche, rispettivamente in frumento tenero e duro. In riso sono stati individuati i siti catalitici e di legame dell'enzima SSII (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 nullo *SSIIa*, *sex6*, ha caratteristiche simili al mutante *rug5* di pisello con un incremento nel contenuto di amilosio (superiore al 70%) e basse rese di amido (Morell *et al.*, 2003). In mais il mutante *sugary-2*, che presenta una lesione nel gene *SSIIa*, mostra un alto contenuto di amilosio, temperatura di gelatinizzazione ridotta, morfologia dei granuli e distribuzione della lunghezza delle catene di amilopectina alterate (Zhang *et al.*, 2004).

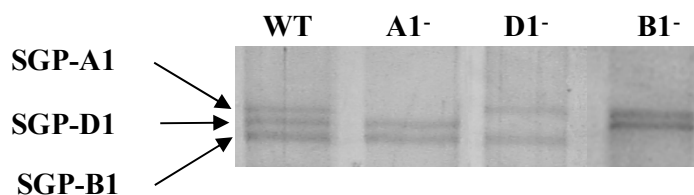


Figura 1.11. Profilo elettroforetico delle proteine Sgp1 in frumento tenero. WT corrisponde al genotipo normale; A1-, B1-e D1-corrispondono ai mutanti singoli nulli che mancano dell'isoforma Sgp-A1, Sgp-B1 e Sgp-D1.

1.8.5.3 Le amido sintasi di classe III (SSIII)

Il mutante *dull* di mais (Gao *et al.*, 1998), caratterizzato dall'assenza dell'attività dell'enzima SSIII, ha fornito indicazioni importanti sul ruolo dell'SSIII nella biosintesi dell'amido. Il mutante *dull* presenta un leggero abbassamento del contenuto di amido, lieve incremento del contenuto di amilosio e dei punti di ramificazione e, soprattutto, la comparsa di una nuova classe di polimeri glucanici con caratteristiche intermedie tra amilosio e amilopectina, definita *intermediate starch*. Studi precedenti, relativi al silenziamento di SSIII in patata e all'individuazione del mutante *st-3* in *Chlamidomonas*, hanno evidenziato un aumento del numero di catene corte dell'amilopectina con DP 2-8 e la diminuzione delle catene con DP 8-50. In frumento sono stati isolati e caratterizzati i geni codificanti per le tre isoforme SSIII e localizzati sul cromosoma 1 (Li *et al.*, 2000).

1.8.5.4 Le amido sintasi di classe IV

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

SSII e GBSSI localizzati sul cromosoma 7, ha suggerito che i due gruppi di SS potrebbero aver seguito un percorso evolutivo differente. Tale ipotesi è stata avvalorata dallo studio delle sequenze amminoacidiche e, in particolare, delle regioni conservate, dei due gruppi di SS.

1.8.5.5 Gli enzimi di ramificazione di classe I (BEI)

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

1.8.5.5 Gli enzimi di ramificazione di classe II (*BEIIa* e *BEIIb*)

Il ruolo dei geni *SBEIIa* e *SBEIIb* è stato ampiamente studiato nei cereali. In mais il mutante *ae* (*amylose extender*), caratterizzato da una lesione nel gene *SBEIIb*, presenta un fenotipo con un elevato contenuto di amilosio (>50%) (Stinard *et al.*, 1993); una mutazione deleteria a carico del gene *SBEIIa* produce un fenotipo con contenuto elevato di amilosio in foglia ma non nell'endosperma (Blauth *et al.*, 2001). In riso l'elevato contenuto di amilosio (30-35%) riscontrato in alcuni mutanti è stato associato a mutazioni presenti negli omoeologhi dei geni *SBEIIb* (Mizuno *et al.*, 1993; Nishi *et al.*, 2001). In frumento i geni *BEIIa* e *BEIIb* sono localizzati sul braccio corto dei cromosomi omeologhi del gruppo 2 (Nair *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 2001; Regina *et al.*, 2005). È stata caratterizzata la sequenza genomica dei due geni *BEIIa* e *BEIIb* isolati da *Ae. tauschii*, progenitore del genoma D del frumento tenero. Questa localizzazione non è risultata completamente sintenica con altre specie di cereali. In riso il gene *SBEIIa* si trova sul cromosoma 4 (sintenico al cromosoma 2 di frumento) ed il gene *SBEIIb* sul 2 (sintenico al cromosoma 6 di frumento); in mais i due geni sono localizzati, rispettivamente, sul cromosoma 8 e 5. Concludendo il gene *SBEIIa* di frumento è localizzato in una posizione sintenica, mentre l'*SBEIIb* non è sintenico rispetto agli altri cereali (Regina *et al.*, 2005). In frumento il profilo di espressione dei due geni *SBEIIa* e *SBEIIb* è risultato differente rispetto agli altri cereali. In mais (Gao *et al.*, 1997) e riso (Yamanouchi e Nakamura, 1992) il gene *SBEIIb* è l'isoforma predominante nell'endosperma, al contrario in frumento il gene *SBEIIa* è espresso a livelli 3-4 volte superiori rispetto al *SBEIIb*. Il ruolo svolto dai due enzimi nella biosintesi dell'amilopectina è stato determinato, inizialmente, attraverso la tecnologia dell'RNA *interference* (RNAi) (Regina *et al.*, 2006). Non sono stati individuati mutanti naturali o indotti per nessuna delle due isoforme in frumento. Diversamente 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. Al contrario, la soppressione del gene *SBEIIa* risulta in un fenotipo caratterizzato da un drastico aumento del 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 *SBEIIa* provoca, anche, la perdita di espressione del gene *SBEIIb*. Le analisi dei messaggeri hanno mostrato che l'mRNA dei geni *SBEIIa* era fortemente ridotto, mentre l'espressione del gene *SBEIIb* non variava, indicando che la soppressione dell'attività di *SBEIIb* possa essere dovuto ad un meccanismo di regolazione post-trascrizionale (Regina *et al.*, 2006). I geni *BEIIa* e *BEIIb* hanno quindi funzioni sovrapposte nella biosintesi dell'amido e differiscono per l'espressione differenziale nelle diverse specie di cereali. Questa tesi è stata recentemente confermata dal Sestili *et al.* (2010, *submitted*) che hanno riscontrato la presenza del trascritto del gene *SBEIIb* in linee di frumento duro trasformate con un costrutto RNAi per il silenziamento del gene *SBEIIa*.

1.8.5.6 Gli enzimi di deramificazione

Nelle piante esistono due famiglie di DBE, le isoamilasi e le pullulanasi. Entrambi idrolizzano i legami α -1,6 ma differiscono nella specificità per il substrato. Il tipo isoamilasi idrolizza il legame α -1,6 dell'amilopectina denaturata, del glicogeno e dei derivati amilolitici (destrine), mentre il tipo pullulanasi attacca le ramificazioni del polimero costituito da unità ripetute di maltotriosi unite mediante legami α -1,6 e delle destrine. La scoperta del coinvolgimento delle isoamilasi nella sintesi dell'amido è avvenuta grazie all'identificazione del mutante *sugary-1* di mais, ottenuto mediante un approccio di *Transposon Tagging* (James *et al.*, 1995). Nel mutante *sugary-1* la sintesi dell'amilopectina è sostanzialmente sostituita da un polimero non cristallino altamente ramificato, noto come fitoglicogeno. L'importanza del ruolo delle isoamilasi nella sintesi di amido è stata in seguito confermata in un'ampia varietà di specie, tra cui *Chlamydomonas* (Mouille *et al.*, 1996), riso (Kubo *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2003), *Arabidopsis* (Zeeman *et al.*, 1998) ed orzo (Burton *et al.*, 2002a). La disponibilità dell'intera sequenza del genoma di *Arabidopsis* ha permesso l'identificazione di tre geni di tipo isoamilasi ed uno di tipo pullulanasi, *AtISA1*, *AtISA2*, *AtISA3* e *AtPUI* (Delatte *et al.*, 2005; Wattebled *et al.*, 2005). La mancanza delle proteine AtISA1 o AtISA2 o di entrambi è stata associata ad un fenotipo con basso contenuto di amido e accumuli elevati di fitoglicogeno (Delatte *et al.*, 2005). Il silenziamento di isoamilasi in patata, ottenuto con la tecnica dell'RNA antisense, ha fornito dati utili alla comprensione del ruolo di questi enzimi. L'effetto principale riscontrato è stato l'accumulo di grandi quantità di granuli piccoli negli amiloplasti rispetto ai tuberi normali: è stato, quindi, ipotizzato che l'isoamilasi è necessaria per convertire la "preamilopectina" in un polimero in grado di cristallizzare sul granulo di amido nascente (Bustos *et al.*, 2004). Particolarmente interessante, in quanto membro delle *Triticeae* (come il frumento), è il lavoro in orzo (Burton *et al.*, 2002) in cui sono stati individuati mutanti naturali *sugary-1* (*su-1*) caratterizzati dalla contemporanea presenza dell'amido cristallino e di un polimero ad elevato grado di ramificazione detto fitoglicogeno, già identificato in mais e patata; inoltre è stato verificato un incremento nel numero dei granuli, irregolari nella forma e con dimensioni intermedie rispetto ai granuli A/B tipici delle *Triticeae*. L'ipotesi di Burton è che l'assenza di isoamilasi determini una maggiore concentrazione di glucani in grado di cristallizzare e quindi di formare i granuli. La presenza delle isoamilasi limiterebbe il numero di eventi di nucleazione e quindi, in un secondo momento, inibirebbe la sintesi di fitoglicogeno. L'introduzione nel mutante di riso *sugary-1* di un gene che codifica per un'isoamilasi di frumento ha generato il ripristino della sintesi dell'amido: i livelli di fitoglicogeno residui sono risultati inversamente proporzionali al livello di espressione della proteina eterologa introdotta; l'amido delle linee transgeniche, osservato al microscopio elettronico a scansione (SEM), mostra un incremento dei granuli piccoli con forma irregolare e granuli grandi con contorno meno distinguibile rispetto al mutante *sugary-1* (Kubo *et al.*, 2005; Bustos *et al.*, 2004). In frumento i geni che codificano per

isoamilasi sono stati isolati e caratterizzati (Genschel *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2003), ma non sono stati identificati mutanti in questi geni. È stata dimostrata l'espressione nell'endosperma di una seconda categoria di enzimi di deramificazione: le pullulanasi o destrinasi limite (LD). Stahl *et al.*, (2004) hanno dimostrato che, in orzo, un aumento dell'attività di LD, ottenuta attraverso il silenziamento genico dell'inibitore specifico LDI, ha provocato profondi cambiamenti nella distribuzione dei granuli (Fig. 1.12). L'osservazione che il periodo di espressione dei geni LD e LDI coincide con il periodo di formazione dei granuli B supporta l'ipotesi del coinvolgimento di questa classe di enzimi nella seconda ondata di formazione dei granuli. Le attuali conoscenze disponibili sul ruolo degli enzimi di deramificazione nella sintesi dell'amido li rendono interessanti nella prospettiva di modificare le dimensioni dei granuli di amido o il rapporto tra granuli A/B nelle *Triticeae*.

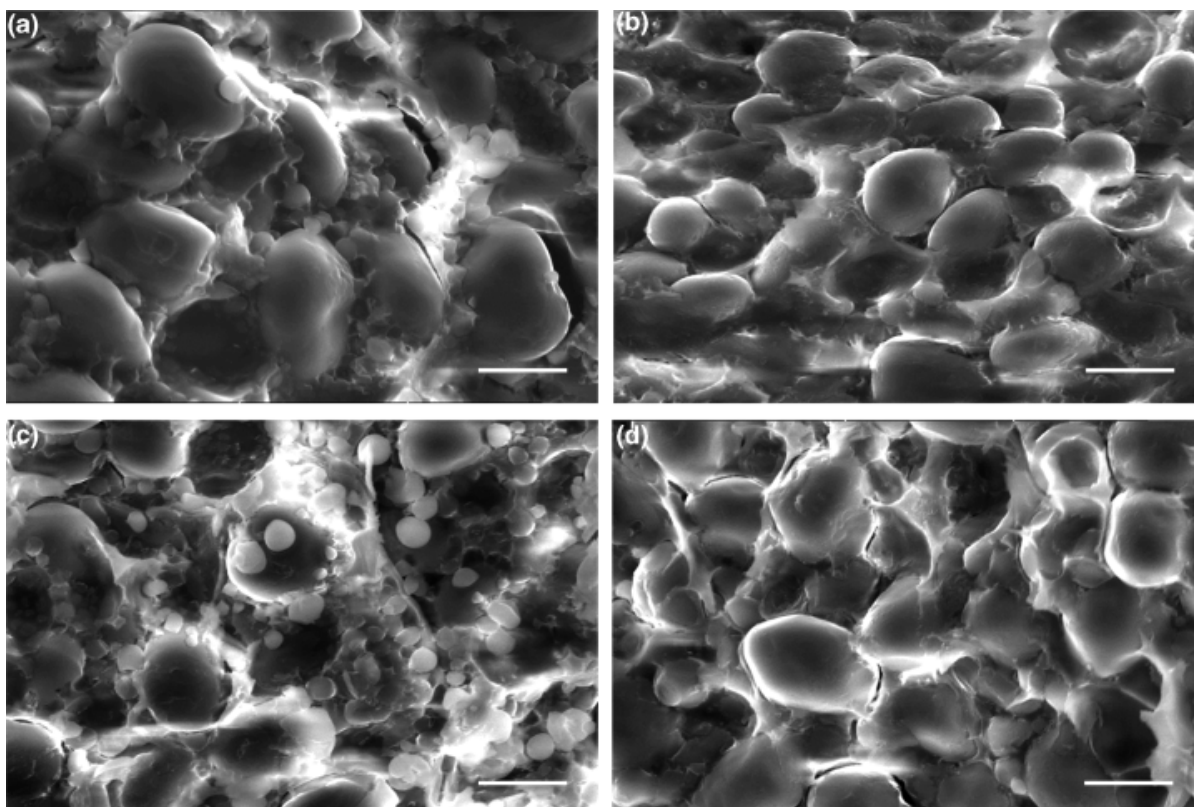


Figura 1.12. Immagine SEM dei granuli di amido nelle linee transgeniche di orzo in cui è stato silenziato il gene per LDI. a) e c) wild type; b) e d) linee transgeniche (da Stahl *et al.*, 2004).

1.8.6 Il ruolo di altri geni nella sintesi dell'amido

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

1.8.7 L'espressione dei geni coinvolti nella sintesi dell'amido

In frumento i trascritti dell'AGPasi citosolica sono più abbondanti nella prima fase di sviluppo dell'endosperma e subiscono una brusca riduzione nelle fasi successive; al contrario l'espressione dell'AGPasi plastidiale risulta costante durante lo sviluppo. In riso l'AGPasi plastidiale rappresenta il trascritto maggiore nella fase iniziale e la forma citoplasmatica risulta meno espressa in tutto il periodo di maturazione della cariosside. Il riso è caratterizzato da una distribuzione unimodale dei granuli che si presentano irregolari nella forma e composti; essi, a differenza di quanto accade in frumento, vengono sintetizzati in una singola ondata. Queste osservazioni supportano l'ipotesi del coinvolgimento delle AGPasi di frumento nel controllo delle tempistiche di sintesi e del numero di granuli di amido. È stato osservato che il trascritto più abbondante è GBSSI; come in riso (Ohdan *et al.*, 2005) SBEI risulta più espresso e per un tempo maggiore rispetto a SBEIIb. L'analisi dei trascritti delle altre classi di enzima è risultato coerente con la successione degli eventi nella via biosintetica dell'amido (Shewry *et al.*, 2009).

1.8.8 Regolazione della biosintesi dell'amido

La biosintesi dell'amido negli organismi vegetali è regolata a diversi livelli attraverso una serie di meccanismi. A livello genico attraverso:

- La duplicazione dei geni codificanti per gli enzimi di biosintesi dell'amido;
- Controllo trascrizionale dell'espressione genica. Un esempio è costituito dal meccanismo di inibizione mediato da LDI nelle pullulanasi.
- A livello enzimatico:
 - Reazioni redox come nel caso delle AGPasi.
 - Regolazione allosterica. Un esempio è rappresentato dalla AGPasi. 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)
 - 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.

1.9 La funzionalità dell'amido

1.9.1 Rapid Visco Analyzer

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. In figura 1.13 è riportata una breve descrizione dei parametri misurati in una analisi RVA.

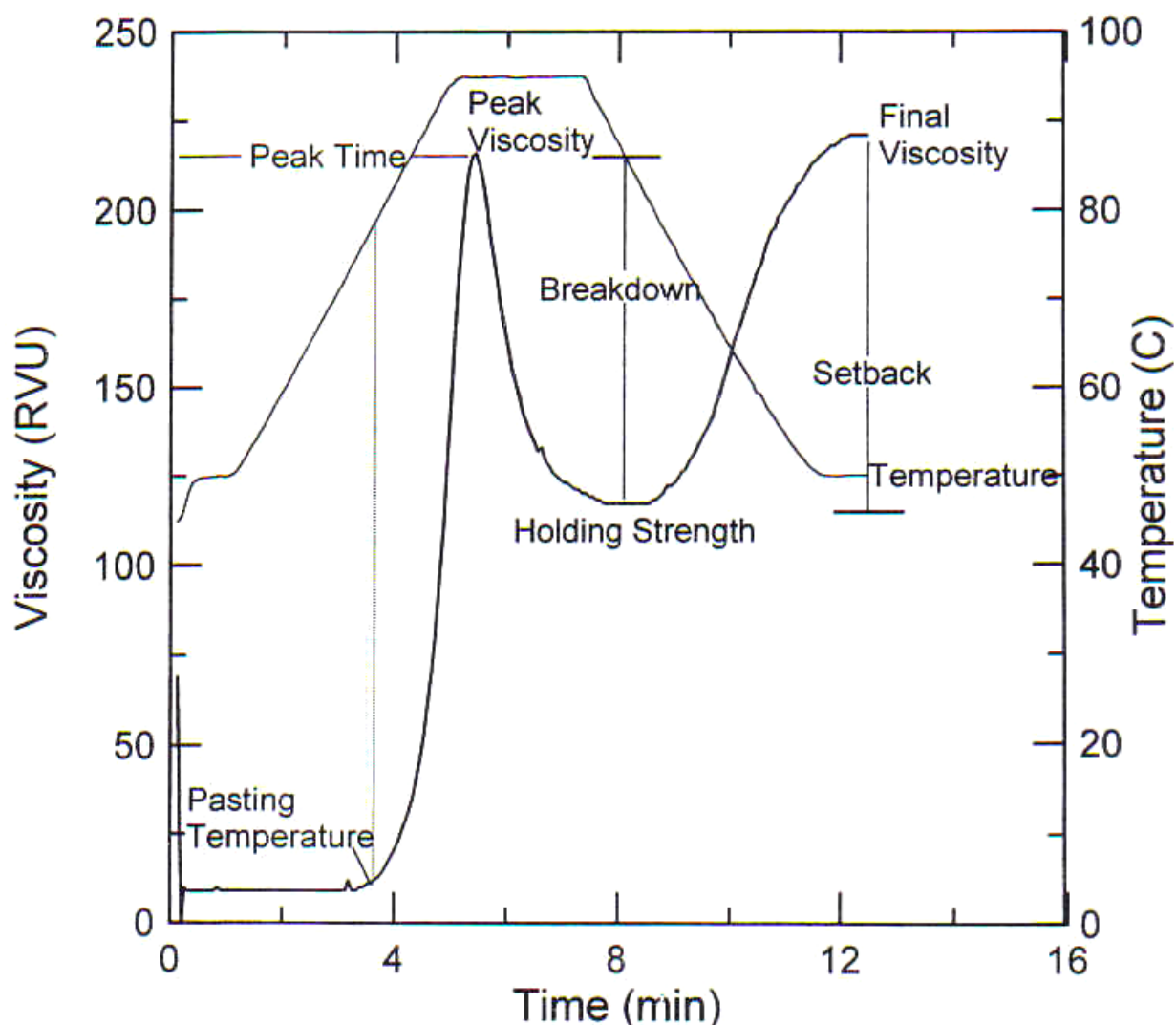


Figura 1.13. Profilo RVA e descrizione dei parametri relativi. Lo strumento RVA permette lo studio dei processi di gelatinizzazione e retrogradazione dell'amido descritti nei paragrafi seguenti attraverso misure di viscosità. Il Peak Viscosity (PV) rappresenta una misura della capacità di assorbimento di acqua dei granuli di amido; il Setback e la Final Viscosity (FV) forniscono una misura del livello di retrogradazione dell'amido.

1.9.2 I processi fisici

1.9.2.1 Gelatinizzazione: la perdita della struttura granulare

Il processo di gelatinizzazione si verifica quando l'amido viene riscaldato in presenza di una quantità adeguata di acqua. I granuli assorbono acqua e si rigonfiano (*swelling*) e l'organizzazione cristallina risulta irreversibilmente distrutta. Secondo la teoria di Jenkinson e Donald (1998), l'acqua penetra dapprima nelle regioni amorfe che si rigonfiano. Le molecole di amilopectina localizzate all'estremità

delle lamellae sono connesse attraverso interazioni intermolecolari alla regione amorfa; di conseguenza il rigonfiamento della regione amorfa sottopone i cristalli di amilopectina ad uno stress che, in ultimo, causa la dissociazione delle strutture a doppia elica e il dissesto dell'integrità del granulo. Questa ipotesi trova conferma nell'osservazione che non si registra alcun cambiamento nella regione cristallina dei clusters durante le prime fasi di rigonfiamento del granulo. Analisi ottiche hanno confermato che in questa prima fase non si assiste all'espansione radiale delle lamellae (Leszczynski, 1987). Come ipotizzato da Donovan, (1979) la gelatinizzazione è essenzialmente un processo *swelling driven*. Durante la fase di riscaldamento i granuli di amido assorbono una quantità di acqua fino a 30 volte del loro peso secco. I polimeri di amilosio fuoriescono (*leaching*) dalla struttura granulare ormai compromessa e la viscosità della soluzione-“*starch paste*”-raggiunge il massimo livello, corrispondente alla situazione del più alto numero di granuli rigonfiati e ancora intatti (Peak Viscosity). Successivamente si verifica un abbassamento graduale della viscosità dovuto all'evento di rottura dei granuli e dispersione delle molecole di amido nella soluzione. La velocità e l'estensione dei processi di rigonfiamento e rottura dei granuli sono dipendenti dalla tipologia e dalla quantità di amido presente, dal gradiente di temperatura e dall'energia meccanica applicati e, infine, dalla presenza di altre componenti quali lipidi, proteine e fibre (Debet e Gidley, 2006). Diverse tipologie di amido presentano differenti temperature di gelatinizzazione, generalmente comprese tra 60-80 °C.

1.9.2.2 Retrogradazione

Durante il raffreddamento della “pasta” di amido si verifica un aumento della viscosità dovuto alla formazione di un gel, la cui struttura è determinata dalle interazioni intermolecolari che coinvolgono amilosio e amilopectina. Negli amidi di frumento non modificati i polimeri glucanici formano un network che risulta in un gel compatto. Il gel di amido retrograda velocemente e si verifica la formazione di una struttura cristallina (*B cristalliti*), attraverso l'associazione che interviene tra le regioni lineari (α , 1-4 linked) presenti nei polimeri glucanici in strutture a doppia elica (Gidley, 1989). La retrogradazione è un processo continuo che copre un intervallo di tempo più o meno esteso. Le molecole di amilosio retrogradano in un arco di tempo che va da pochi minuti a qualche ora; l'amilopectina impiega un tempo più lungo, dell'ordine di giorni, a seconda della difficoltà incontrata dalle catene ramificate ad associarsi tra loro. La riassociazione delle molecole di amido gelatinizzato è responsabile della consistenza dei prodotti alimentari che può risultare colloso, gommoso o viscoso. L'amilosio presente in soluzione, inoltre, interagisce con gli altri componenti presenti nella matrice alimentare. In condizioni di cottura estreme, anche l'amilopectina risulta molto più dispersa; in questa situazione il prodotto alimentare ha una consistenza molto viscosa e colloso. In conseguenza delle

differenze nel peso molecolare e nella lunghezza delle catene glucaniche le velocità di retrogradazione dell'amilosio e dell'amilopectina risultano molto diverse.

1.9.2.3 Retrogradazione dell'amilopectina

La lunghezza delle strutture a doppia elica, sia nel granulo che nell'amido retrogradato, è limitata dalle dimensioni delle catene esterne dell'amilopectina. La capacità di retrogradare dell'amilopectina risulta strettamente correlata alla lunghezza media delle sue catene esterne (Ring *et al.*, 1987). La temperatura di dissociazione delle doppie eliche è circa 70°C. I gel di amilopectina sono soffici e meno cristallini. L'amilopectina forma una "pasta" non compatta a causa del minor numero di legami H intramolecolari. A concentrazioni del 2% in acqua l'amilopectina forma soluzioni limpide e non viscosi. L'amilopectina ha una solubilità in acqua più elevata ed è in grado di formare gel solo a concentrazioni maggiori del 10% e a basse temperature (Ring *et al.*, 1987). La torbidità della "pasta" raggiunge il valore limite dopo 5 giorni di conservazione a basse temperature ma le misure di elasticità rivelano solo un leggero aumento. Paravouri *et al.* (1997) hanno studiato l'effetto dell'amilopectina a diverso peso molecolare sull'elasticità della "pasta" di amido concludendo che la presenza di amilopectina ad alto peso molecolare favorisce l'aumento dell'elasticità.

1.9.2.4 Gelificazione dell'amilosio

L'amilosio è in grado di formare un'ampia rete di legami idrogeno con le molecole di acqua e legami H intramolecolari (Biello-Perez e Paredes-Lopez 1994). La retrogradazione dell'amilosio è stata monitorata attraverso misurazioni torbidimetriche e reologiche. Lo sviluppo dei gel di amilosio si verifica, in un arco di tempo dell'ordine dei minuti, attraverso due tipi di meccanismi: la formazione delle strutture a doppia elica (retrogradazione) o attraverso un processo che prevede, dapprima, una separazione di fase dell'amilosio amorfo e quindi la retrogradazione all'interno di queste regioni ad alta concentrazione di amilosio (Miles *et al.*, 1985; Leloup *et al.*, 1991). La formazione delle strutture cristalline (i cristalliti di tipo B) richiede un intervallo di tempo di qualche ora. Sia l'aumento delle dimensioni delle molecole di amilosio che della sua concentrazione hanno un effetto destabilizzante sulla stabilità dell'amido in soluzione (Gidley e Bulpin, 1989). La destabilizzazione dell'amilosio in soluzione porta alla retrogradazione attraverso la formazione del gel o la precipitazione, o entrambi processi. La formazione del gel dipende dalla capacità delle singole molecole di interagire in regioni a doppia elica che legano le molecole tra loro in una struttura con rete tridimensionale e dalla successiva abilità delle strutture a doppia elica di orientarsi e aggregarsi tra loro (Gidley e Bulpin, 1989; Leloup *et al.*, 1991). Esperimenti condotti su amilosio sintetico hanno mostrato la capacità di molecole con

DP>100 di formare la struttura tridimensionale. Per molecole con DP>250 la precipitazione dell'amilosio risulta favorita rispetto alla formazione del gel (gelificazione); per molecole con DP>1100 la gelificazione è favorita sulla precipitazione e per valori compresi tra DP 440 e 660 i due processi coesistono in percentuali simili. Concentrazioni elevate di amilosio aumentano le probabilità delle interazioni catena-catena determinando una maggiore velocità della gelificazione. I gel di amilosio preparati in acqua sono stati descritti come un sistema a due fasi, una fase arricchita in acqua e una fase costituita da un fascio di catene di amilosio. L'amilosio è il maggiore responsabile del fenomeno di sineresi, perdita di acqua, a causa della tendenza delle molecole ad aggregarsi tra loro rilasciando acqua (Fig. 1.14). Questo fenomeno comporta impatti importanti nell'industria alimentare sulla conservabilità di alcuni prodotti. La dissociazione delle strutture cristalline dell'amilosio retrogradato avviene tra 120 e 160°C.

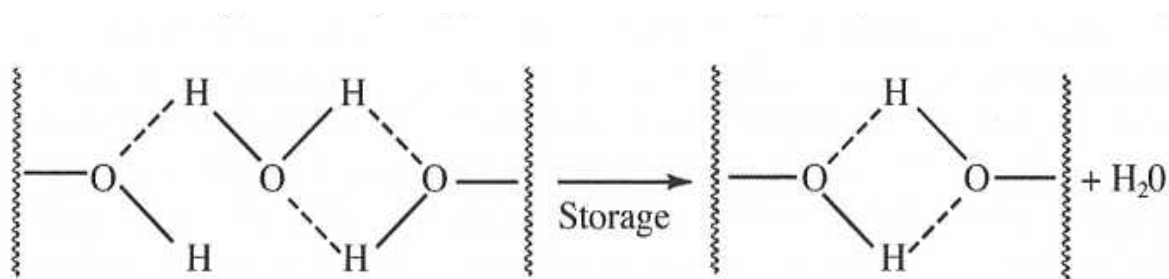


Figura 1.14. Sineresi del gel di amido.

1.9.3 Interazioni Amilosio-amilopectina

Gli amidi normali, sottoposti a cottura, sono considerati un sistema a fasi separate di granuli rigonfiati che consistono in amilopectina intrappolata in una matrice gelatinosa di amilosio fuoriuscito (Keetels *et al.*, 1996). In questo sistema i due polimeri glucanici assumono comportamenti relativamente indipendenti l'uno dall'altro: l'amilosio, a temperature superiori a 100°C, forma una rete gelatinosa-*thermally irreversible*-seguito da un aumento del modulo elastico-*thermally reversible*-attribuito ad un aumento della rigidità dovuto alla retrogradazione dell'amilopectina. Studi effettuati su miscele di amilosio e amilopectina hanno mostrato che, al di sopra di percentuali del 40% di amilosio, i gel sviluppano un comportamento simile a gel di puro amilosio in termini di velocità di sviluppo della torbidità, del modulo elastico, e dalla suscettibilità a idrolisi enzimatica (Doublier e Llamas, 1993). Altri autori hanno suggerito che nell'amido nativo la situazione risulta differente. Diversi studi supportano l'intervento delle catene esterne dell'amilopectina nel processo di gelificazione dell'amilosio. Analisi di calorimetria a scansione differenziale (DSC) hanno evidenziato che a temperature al di sotto di 140°C l'amilosio retrograda indipendentemente; a temperature superiori a

160°C l'amilopectina partecipa alla formazione delle strutture a doppia elica e il modulo elastico del gel aumenta all'aumentare delle dimensioni delle catene esterne dell'amilopectina (Boltz e Thomposon, 1999). Negli amidi di frumento l'amilopectina contribuisce, positivamente, alla capacità di assorbimento di acqua, al rigonfiamento e alla viscosità dell'amido (Tester e Morrison, 1990). L'amilosio contribuisce alla forza e alla compattezza del gel riducendo la collosità (Blazek e Copeland, 2008).

1.9.4 I complessi amilosio-lipidi

I complessi tra amilosio e lipidi, come i lisofosfolipidi presenti in frumento, influenzano le proprietà e la funzionalità dell'amido sia a livello tecnologico che nutrizionale. La formazione di tali complessi riduce la solubilità dell'amido in acqua, altera le proprietà tecnologiche della "pasta" di amido, diminuisce la capacità di assorbimento e la rigidità della struttura gelatinosa, ritarda la retrogradazione e riduce la suscettibilità enzimatica (Biliaderis e Seneviratne, 1990; Crowe *et al.*, 2000; Guraya *et al.*, 1997; Holm *et al.*, 1983). L'interno delle doppie eliche di amilosio è un ambiente idrofobico dove si concentrano i gruppi metile e gli ossigeni glucosidici; questa cavità idrofobica è in grado di ospitare una varietà di composti quali KOH, DMSO, ioni Iodio, lipidi, alcol con struttura lineare. Nei cereali una percentuale di amilosio tra il 15% e il 55% del totale si trova in forma complessata con i lipidi endogeni (Morrison, 1988; 1995). Analisi RVA hanno evidenziato che la presenza di tali complessi determina un aumento della FV e del set back e una diminuzione del PV. La lunghezza delle catene lipidiche rappresenta un parametro fondamentale nel determinare la struttura dei complessi. Acidi grassi di dimensioni maggiori favoriscono la formazione di una struttura cristallina definita Form IIa con cristalli di tipo V. Sia la forma amorfa (Form I) che quella cristallina possono essere presenti nei prodotti alimentari a seconda del tipo di processamento subito.

1.9.5 La digestione enzimatica dell'amido

Modulare la digeribilità degli amidi rappresenta un obiettivo importante per l'industria alimentare. La depolimerizzazione dell'amido nell'intestino tenue è svolta dalle α -amilasi, che tagliano i legami α -1,4 e dalle amiloglucosidasi e le isoamilasi che tagliano i legami glucosidici α -1,6. Dopo il processo di cottura del cibo, la suscettibilità dell'amido all'attacco enzimatico è fortemente determinato dai prodotti della gelatinizzazione e, soprattutto, della retrogradazione. In frumento l'attacco enzimatico delle α -amilasi provoca la formazione di buchi nella struttura di amido. Inizialmente viene attaccata la superficie e si formano piccoli buchi che, con il progredire della reazione, danno vita a dei canali diretti verso il centro del granulo (Gallant, 1973). I fattori che influenzano la suscettibilità all'attacco

enzimatico sono la cristallinità, la dimensione dei granuli e l'area superficiale disponibile, il rapporto amilosio/amilopectina e il grado di danneggiamento dell'amido (Kong *et al.*, 2003; Planchot *et al.*, 1997; Ring *et al.*, 1988). Cristalliti di tipo A (amido nativo) sono più resistenti di quelli di tipo B (amido retrogradato). L'amido nello stato nativo o retrogradato è molto più resistente dell'amido gelatinizzato. Amidi waxy (costituiti da amilopectina) vengono digeriti molto più velocemente rispetto ad amidi con percentuali significative di amilosio (Fig. 1.15). La struttura cristallina di tipo V associata ai complessi amilosio-lipidi contribuisce alla resistenza dell'amido all'attacco enzimatico.

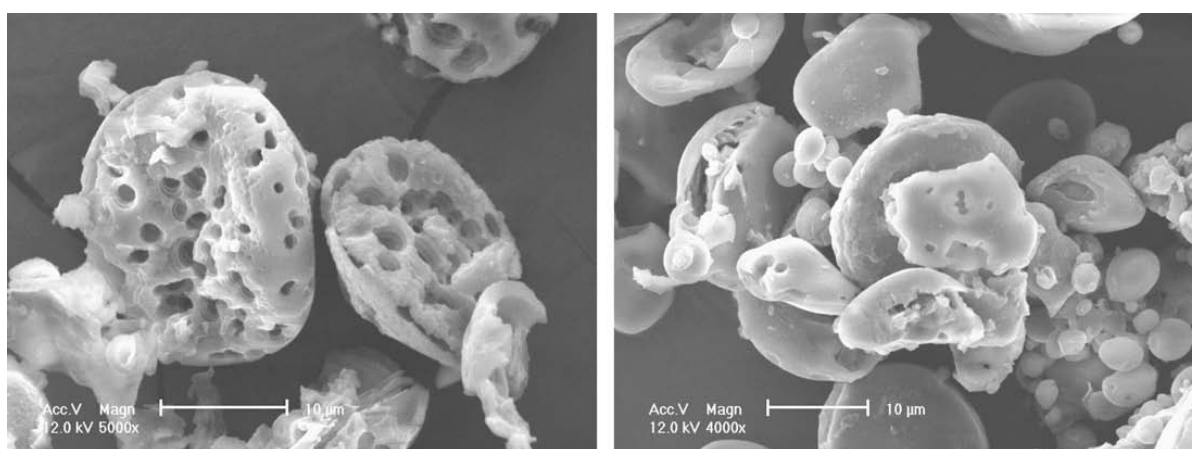


Figura 1.15. Granuli parzialmente digeriti di amido waxy (sinistra) e di amido *high amylose* (destra), dopo due ore di digestione con alfa-amilasi pancreatica. (da Blazek *et al.*, 2009).

1.9.6 Relazione struttura-funzione nei granuli di tipo A e di tipo B

Salman *et al.* (2009) hanno recentemente pubblicato uno studio che analizza le differenze delle caratteristiche funzionali tra frazioni di amido di frumento arricchite rispettivamente in granuli di tipo A e in granuli di tipo B. Gli autori hanno riscontrato differenze nella struttura dell'amilopectina, nella capacità di rigonfiamento e suscettibilità all'idrolisi enzimatica. È stata rilevata la presenza di una percentuale più alta di catene esterne corte (DP 6-12) nei granuli di tipo B rispetto ai granuli ellissoidali; nei granuli di tipo A prevalgono le catene con DP 25-36 e >36 (Ao e Jane, 2007). Tali differenze nella struttura hanno trovato riscontro nelle differenze delle caratteristiche funzionali delle due frazioni. I granuli di tipo B hanno un maggiore capacità di assorbimento di acqua (*swelling power*) in ragione della maggiore area superficiale relativa (A/V) e della maggiore percentuale di catene esterne corte. Analisi di digestione enzimatica hanno evidenziato, nella prima ora, una forte

correlazione positiva tra la velocità di degradazione e la proporzione delle catene corte nell'amilopectina; nella prima mezz'ora c'era una forte correlazione negativa tra la digeribilità e la proporzione di catene lunghe. Nelle prime fasi della digestione la velocità di idrolisi è risultata influenzata dalle caratteristiche della superficie dei granuli; in questa fase i granuli di tipo B risultano maggiormente idrolizzati per via enzimatica rispetto ai granuli di tipo ellissoidale. Dopo quattro ore il volume e la struttura interna dei granuli risultano i fattori determinanti e i granuli di tipo A vengono digeriti maggiormente rispetto a i granuli di tipo B.

1.9.7 Il contenuto di amilosio e le proprietà di *pasting*

In amidi caratterizzati da livelli bassi o medi di amilosio, le molecole di amilopectina rappresentano un fattore di disturbo nella formazione del network gelatinoso. All'aumentare delle percentuali di amilosio la viscosità finale FV del gel aumenta a causa della disponibilità di un maggior numero di molecole di amilosio in grado di partecipare alla formazione del network. A percentuali di amilosio del 40% la rete di interazioni tra le molecole si infittisce provocando la formazione di una struttura più compatta che determina un abbassamento della viscosità del gel FV (Blazek e Copeland, 2008). Le analisi RVA effettuate su amidi di frumento a diverso contenuto di amilosio hanno mostrato in diversi lavori (Yamamori *et al.*, 2006; Lafiandra *et al.*, 2010; Sestili *et al.*, 2010) che i parametri di *pasting* variano in dipendenza della % di amilosio. Amidi waxy (amylose free) mostrano valori di PV più elevati e FV più bassi degli amidi normali (25% amilosio). Amidi ad alto contenuto di amilosio hanno valori di PV più bassi dell'amido normale e valori di FV più bassi dei waxy. Il PV diminuisce all'aumentare della percentuale di amilosio; FV aumenta all'aumentare del contenuto di amilosio fino a valori di amilosio/amilopectina 1:3, per valori maggiori di amilosio diminuisce.

1.10 L'amido nei prodotti derivati da farine e semole di frumento.

Per lungo tempo il ruolo dell'amido nella qualità dei prodotti derivati da frumento è stato oscurato dalla peculiarità delle caratteristiche della frazione proteica dell'endosperma, il glutine. Nell'ultimo ventennio fattori quali, l'acquisizione di nuove conoscenze sull'influenza dell'amido sulla qualità, il riconoscimento dell'importanza della digeribilità dell'amido in termini nutrizionali e la disponibilità di nuovi strumenti genetici per generare e analizzare amidi "nuovi", hanno determinato una netta accelerazione dell'attività di studio e miglioramento della frazione maggiore, in termini quantitativi, di farine e semole. La conoscenza della via biosintetica e della composizione chimico-fisica dell'amido è alla base dello sviluppo di svariati amidi con caratteristiche e funzionalità innovative e inedite. La ricerca in campo di miglioramento dell'amido è attualmente agli inizi della sua attività. Sebbene il

ruolo giocato da alcuni fattori sia stato sufficientemente analizzato, sono ancora numerose le potenzialità da studiare e sviluppare nell'ambito della produzione di amidi con nuove caratteristiche chimico-fisiche. Gli sforzi maggiori sono stati compiuti nella manipolazione del rapporto amilosio-amilopectina (1:3 negli amidi normali) con la produzione di amidi caratterizzati da percentuali di amilosio compresi in un intervallo da 0 fino al 70% dell'amido totale. Gli approcci utilizzati sono di vario tipo: dalla genetica diretta e inversa, con la ricerca di mutanti naturali o indotti, alle nuove biotecnologie con la produzione di piante trasformate. Notevoli risultati sono stati raggiunti nella modulazione della distribuzione dei granuli; i meccanismi che determinano la formazione delle due ondate di granuli non sono stati pienamente definiti e maggiore è il lavoro che deve essere compiuto in questa direzione. È chiaro che la struttura fine dell'amilopectina è determinante per la funzionalità degli amidi; tuttavia non sono stati ad oggi prodotti amidi con modifiche apprezzabili dal punto di vista applicativo.

1.10.1 Produzione e interesse degli amidi a basso contenuto di amilosio

Gli amidi waxy o parzialmente waxy, caratterizzati da bassi contenuti di amilosio, hanno caratteristiche funzionali utili che ne hanno incoraggiato lo sviluppo commerciale. Il primo frumento tenero completamente waxy è stato prodotto in Giappone da Nakamura *et al.* (1995) attraverso incrocio tradizionale tra il mutante naturale *Wx-D1* nullo Bai-Huo e il doppio nullo *Wx-A1/Wx-B1* Kanto 107. La linea priva dei tre isoenzimi waxy è caratterizzata dalla completa assenza di amilosio. Successivamente amidi waxy sono stati prodotti con diversi approcci di genetica classica e genetica inversa basati sulla mutagenesi chimica (Yasui *et al.*, 1997; Slade *et al.*, 2005). Recentemente è stata riportata la produzione del genotipo waxy nella cultivar di frumento duro *Svevo* da Lafiandra *et al.* (2010). L'analisi RVA ha mostrato che le farine waxy hanno valori più elevati di PV e una maggiore resistenza alla retrogradazione se paragonati alle farine normali. L'elevata capacità di assorbimento di acqua e la incapacità di retrogradare delle farine waxy rappresentano caratteristiche utili per migliorare la conservabilità di alcune tipologie di prodotti. La retrogradazione dell'amido è considerata la principale causa dell'invecchiamento o rafferimento del pane (Hung-Iten, 1999). Morita *et al.* (2002) hanno analizzato l'effetto dell'incorporazione di farine waxy sulle caratteristiche qualitative e di conservabilità del pane. Gli autori hanno riportato che la sostituzione del 40% di farine waxy risulta in una maggiore capacità di ritenzione di acqua nella crosta e in una maggiore conservabilità del pane. Inoltre pane prodotto con farine waxy ha mostrato caratteristiche nuove della crosta che è risultata più soffice, viscosa e glutinosa, proprietà apprezzate dal mercato giapponese. Il volume del pane prodotto da farine per il 40% waxy è risultato aumentato rispetto al volume del pane prodotto con farina normale. Linee di frumento waxy parziali sono risultate adatte alla produzione di "noodles" (spaghetti

orientali prodotti col frumento tenero) di qualità superiore (Yamamori *et al.*, 1992; Miura *et al.*, 1994). La stabilità degli amidi waxy, dovuta allo scarso grado di retrogradazione, sta recentemente suscitando interesse per la possibilità di aumentare la conservabilità dei prodotti surgelati. La mancanza di amilosio determina infatti un minore grado di sineresi nei prodotti surgelati (Reddy e Seib, 2000). Vignaux *et al.* (2005) hanno utilizzato la semola dei genotipi waxy totali e parziali di frumento duro per studiare l'effetto degli alleli waxy sulla qualità della pasta. Gli spaghetti ottenuti dalla semola waxy risultano essere più collosi rispetto alla pasta prodotta dai frumenti duri tradizionali. 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 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).

1.10.2 Produzione e interesse degli amidi ad alto contenuto di amilosio

Amidi di frumento ad alto contenuto di amilosio (*high amylose*) sono stati prodotti intervenendo su due classi di enzimi coinvolti nella sintesi dell'amilopectina: gli enzimi di ramificazione SBE e le amido sintasi di tipo SS. Yamamori *et al.* (2000) sono stati i primi a riportare la produzione di una linea di frumento tenero ad alto amilosio caratterizzata dall'assenza delle tre isoforme Sgp-1 (SSII). Recentemente sono state sviluppate linee quasi isogeniche di frumento duro, cv. Svevo, caratterizzate dall'assenza delle due isoforme Sgp-A1 e Sgp-B1. L'analisi del set di nulli e parziali nulli *Sgp1* ha rilevato che la mancanza dell'isoenzima codificato dall'allele *Sgp-B1* è correlata ad un maggiore aumento dell'amilosio rispetto all'assenza dell'enzima Sgp-A1; nel genotipo *Sgp-1* totale nullo il contenuto di amilosio è del 43% dell'amido totale vs il 23% del genotipo normale (Lafiandra *et al.*, 2010). In frumento tenero (Yamamori *et al.*, 2000) il contenuto di amilosio del genotipo triplo nullo *Sgp-1* è risultato circa il 35% contro il 25% del genotipo normale. L'analisi delle proprietà di *pasting* dei genotipi *Sgp-1* nulli ha evidenziato, sia in frumento duro che in frumento tenero, un generale appiattimento del profilo RVA, confermando la correlazione negativa tra la viscosità e il contenuto di amilosio. L'assenza degli enzimi di classe SSII è stata associata ad ulteriori modifiche dell'amido quali, l'aumento della percentuale di catene corte dell'amilopectina, la deformazione dei granuli di tipo A e un drastico decremento della resa di amido nella cariosside (20%). Regina *et al.* (2006) e Sestili *et al.* (2010, *submitted*) hanno utilizzato un approccio biotecnologico allo scopo di silenziare, rispettivamente in frumento tenero e in frumento duro, i geni codificanti per l'enzima SBEIIa. In entrambi i casi l'effetto più rilevante è stato un drastico aumento della percentuale di amilosio con

valori fino al 70% dell'amido totale. La resa dell'amido in queste linee non è risultata alterata rispetto al genotipo *wild type*. Tale differenza rispetto alle linee *Sgp-1* nulli, è dovuta al diverso ruolo svolto dalle due classi di enzimi, SSII e SBEII, nella sintesi dell'amilopectina. Lo studio delle caratteristiche di *pasting* della linea silenziata di frumento duro ha confermato la correlazione negativa esistente tra il contenuto di amilosio e i valori di viscosità degli sfarinati. Regina *et al.* (2006) hanno dimostrato l'effetto salutistico del genotipo *high amylose* associato all'incremento della percentuale di "amido resistente". L'applicazione di maggiore interesse degli amidi *high amylose* è associata all'aumento della frazione di amido resistente (RS) dovuto all'inaccessibilità delle strutture inter-e intra-catena formate dalle molecole di amilosio. Come già discusso in precedenza, la resistenza alla digestione degli amidi ricchi in amilosio è stata associata a importanti benefici per la salute umana. L'interesse per le applicazioni dell'amido resistente in campo alimentare ha due motivazioni principali: gli effetti fisiologici associati al RS simili alle fibre alimentari; e le proprietà chimico-fisiche uniche dell'RS che rendono possibile la produzione di prodotti di elevata qualità non ottenibili con le tradizionali fibre insolubili (Yue e Waring, 1998). L'incorporazione di amidi *high amylose* in pane, prodotti da forno e pasta migliora la consistenza (*texture*) del prodotto e fornisce importanti benefici alla salute senza compromettere o alterare le caratteristiche reologiche degli impasti. La produzione di pane o prodotti da forno fortificati con fibre insolubili peggiora la qualità in termini di gusto, colore e volume. L'elevata capacità di assorbimento di acqua delle fibre causa problemi come la collosità degli impasti con impatti negativi sul processamento e la qualità finale del prodotto. La sostituzione delle crusca di frumento con "amido resistente" di origine commerciale ha avuto un impatto positivo sulla qualità del pane. L'aggiunta di RS con TDF 40% non altera la capacità di assorbimento di acqua della farina e di conseguenza non altera le caratteristiche reologiche del pane (Waring, 2005). Inoltre il colore bianco e le dimensioni fini dei granuli di amido danno una crosta più brillante e una migliore palatabilità rispetto al pane prodotto con l'aggiunta di fibre tradizionali. Studi di incorporazione di RS in prodotti da forno quali ad esempio dolci, muffins e biscotti hanno mostrato, a fronte di valori significativi di TDF (40%TDF RS), un netto miglioramento della consistenza soprattutto in termini di sofficità (Waring, 2005). Un lavoro di Chanvrier *et al.* (2007) ha analizzato le caratteristiche funzionali degli amido *Sgp-1* nulli di frumento tenero in prodotti estrusi. È stato rilevato un significativo aumento dell'amido resistente che gli autori hanno imputato, principalmente, ai cristalliti di tipo "V" dei complessi lipidi-amilosio. Inoltre pane prodotto per il 50% da farina del genotipo *Sgp-1* triplo nulli ha mostrato un notevole aumento dell'amido resistente e caratteristiche qualitative accettabili.

Soh *et al.* (2006) hanno analizzato l'effetto di elevate percentuali di amilosio sulla qualità della pasta. Amidi con percentuali di amilosio dal 27 al 74%, prodotti attraverso esperimenti di ricostituzione con amidi di mais *high amylose*, sono stati utilizzati nella produzione di spaghetti. È stata riscontrata una tendenza al miglioramento del nervo della pasta all'aumentare del contenuto in amilosio confermando

precedenti osservazioni di Dexter e Matsuo (1979). Questi lavori evidenziano notevoli potenzialità per l'utilizzo di amidi *high amylose* nella produzione di pasta con caratteristiche qualitative superiori; tuttavia le informazioni sull'impatto tecnologico dei frumenti con amidi *high amylose* sono ad oggi limitate ed imprecise a causa dei modelli sperimentali utilizzati. La possibilità di utilizzare farine e semole *high amylose* rappresenta una nuova opportunità per il superamento di tali limiti e l'ottenimento di nuove conoscenze sul loro impatto tecnologico. In ragione della sua struttura "resistente", dovuta essenzialmente al network compatto proprio del gel di amilosio, l'RS, o l'amido ad alto contenuto di amilosio, può essere utilizzato per preservare e migliorare la croccantezza dei prodotti sottoposti, in superficie, ad elevate temperature durante il processamento (Sajilata *et al.*, 2006). Test condotti per rivelare la funzionalità dell'amido resistente nella produzione di *waffles* hanno mostrato una maggiore croccantezza rispetto al controllo e ad altre fibre tradizionalmente utilizzate nella formula del prodotto (Sajilata *et al.*, 2006). Un aumento della croccantezza è stato rilevato anche nei crackers e nei toasts francesi prodotti con l'aggiunta di amido resistente. È opportuno sottolineare che la formazione di amido resistente negli alimenti è influenzata da altri fattori quali i complessi amilosio lipidi, la struttura granulare e da molteplici fattori estrinseci che riguardano il processamento dell'alimento.

1.10.3 Effetto delle dimensioni dei granuli di amido

La distribuzione della dimensione dei granuli nell'amido di frumento rappresenta un fattore determinante per la qualità dei prodotti derivati (Stoddard, 2003). Nella produzione di pane la capacità degli impasti di trattenere l'acqua risulta determinante per l'efficienza del processo e la per la qualità finale. Sahlstrom *et al.* (1998) hanno dimostrato che i granuli di tipo B mostrano una maggiore capacità di trattenere l'acqua rispetto ai granuli di tipo A, determinando una minore perdita in peso del pane durante la cottura. Al contrario elevate percentuali di granuli B determinano il peggioramento delle proprietà viscoelastiche degli impasti causato da una ridistribuzione dell'acqua a svantaggio del glutine; la diminuzione di acqua legata al glutine causa un irrigidimento della struttura e una minore qualità della fermentazione e cottura del prodotto. La maggiore capacità di assorbimento dell'acqua dei granuli "piccoli" determina, inoltre, un aumento dei tempi di cottura dei prodotti da forno. In alcune applicazioni, quali la produzione di amidi e glutine, i granuli di tipo B, caratterizzati da piccole dimensioni, vengono più facilmente persi durante le fasi di lavorazione causando una perdita nella resa finale (Stoddard, 2003). La distribuzione dei granuli di amido influisce sulle proprietà reologiche delle farine e sulla qualità della pasta (Soh *et al.*, 2006). Sebecic e Sebecic (1995; 1999) hanno osservato che percentuali maggiori di granuli piccoli e intermedi aumentano l'estensibilità degli impasti e riducono la resistenza massima all'estensione (R_{max}); gli stessi autori hanno notato un aumento della

R_{max} all'aumentare della percentuale dei granuli A. Questa tesi non è in completo accordo con quanto riportato da Soh *et al.* (2006) che hanno osservato un aumento della R_{max} degli impasti all'aumentare dei granuli piccoli; solo a percentuali maggiori al 59% di granuli B è stato osservato un crollo dei valori di R_{max}. Quest'ultima tesi è supportata dalle osservazioni di Park *et al.* (2005) che hanno proposto che l'aumento della resistenza dell'impasto potrebbe essere dovuta all'inclusione dei granuli di piccole dimensioni nella struttura del glutine. Impasti costituiti da una percentuale di granuli B di circa il 40%, rispetto al 25% solitamente riscontrato nel frumento duro, producono pasta con un nervo migliore riducendone la collosità dopo la cottura (Soh *et al.*, 2006). L'influenza della dimensione dei granuli sulla qualità dei prodotti è fortemente legata alle condizioni utilizzate nel processo di produzione. 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 interazioni tra l'amido ed i componenti del glutine.

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

L'amido viene utilizzato come additivo e materia prima in diversi settori industriali come l'industria della carta, tessile, medico-farmaceutica e come strato per la produzione di adesivi (Ellis *et al.*, 1998). In particolare, di recente, l'attività di ricerca scientifica ha subito un forte incremento in seguito alla opportunità di impiego dell'amido nella produzione di polimeri biodegradabili che comporta notevoli vantaggi in termini di sostenibilità ambientale (Ellis *et al.*, 1998; Slattey *et al.*, 2000). Amidi *high amylose* possono essere utilizzati, in virtù della resistenza alla digestione nel primo tratto intestinale, quale agente ricoprente di farmaci per il colon (Freire *et al.*, 2009). L'amido di patata in virtù del suo elevato potere di rigonfiamento risulta adatto per la produzione di carta (Blennow *et al.*, 2003).

L'amido utilizzato nelle applicazioni industriali viene sottoposto a specifiche modificazioni chimico fisiche. La possibilità di creare amidi nuovi attraverso il miglioramento dei cereali rappresenta un'importante opportunità per ridurre l'impatto ambientale delle produzioni associate.

1.12 Miglioramento genetico dei cereali

L'attività di *breeding* o selezione dei cereali ha come obiettivi, il miglioramento delle rese (quantità) e della qualità delle varietà. Aumentare la produttività delle varietà cerealicole rappresenta un obiettivo primario in un'ottica di sostenibilità della produzione. Il miglioramento della qualità può puntare alle caratteristiche funzionali e tecnologiche o alle proprietà nutrizionali dei cereali (Henry,

2004). L'applicazione della genetica all'agricoltura è stata essenziale per lo sviluppo di alcune varietà di frumento e riso caratterizzate da rese elevate, più resistenti alle malattie e a bassa taglia che hanno largamente contribuito negli anni '60 alla Rivoluzione Verde (Baima, 2005). Il risultato più importante in termini di miglioramento delle rese è rappresentato dalla riduzione dell'altezza, associata ai cosiddetti geni del nanismo (*dwarf genes*) responsabili della riduzione della quantità di energia spesa dalla pianta per lo sviluppo dei tessuti vegetativi. Più recentemente indici di raccolta migliori sono derivati dall'aumento del numero di cariossidi raccolte piuttosto che dall'aumento della dimensione dei semi (Hay e Probert, 1995). Questa tendenza comporta il rischio di produrre semi piccoli e di bassa qualità, se prevalgono condizioni sfavorevoli durante il periodo di riempimento delle cariossidi. Inoltre la produzione di un elevato numero di semi potrebbe compromettere la capacità della pianta di provvedere pienamente al riempimento degli stessi. La comprensione dei meccanismi che regolano questi processi a livello molecolare è fondamentale per il miglioramento delle rese in condizioni sfavorevoli come la siccità e altri fattori di stress ambientale.

Il miglioramento della qualità dei cereali è indirizzato allo sviluppo di varietà in grado di soddisfare le specifiche di un dato prodotto o utilizzo finale. In figura 1.16 è mostrato un tipo di strumento utilizzato per raggruppare le varietà di frumento in base a specifiche caratteristiche qualitative richieste per i diversi prodotti finali (Blakeney *et al.*, 1995) (Fig. 1.16); la valutazione delle caratteristiche qualitative delle varietà di frumento analizzate ha permesso di individuare gruppi di varietà ciascuno adatto ad uno specifico utilizzo finale. Il dendogramma permette il confronto dei requisiti qualitativi per diversi utilizzi finali. Questo strumento è utile all'identificazione degli obiettivi dei programmi di *breeding* e la produzione di nuovi cereali con una più vasta utilità e applicazione; questo tipo di analisi può essere inoltre utilizzata per identificare nuovi requisiti dei prodotti e avviare programmi di miglioramento tesi a soddisfarli.

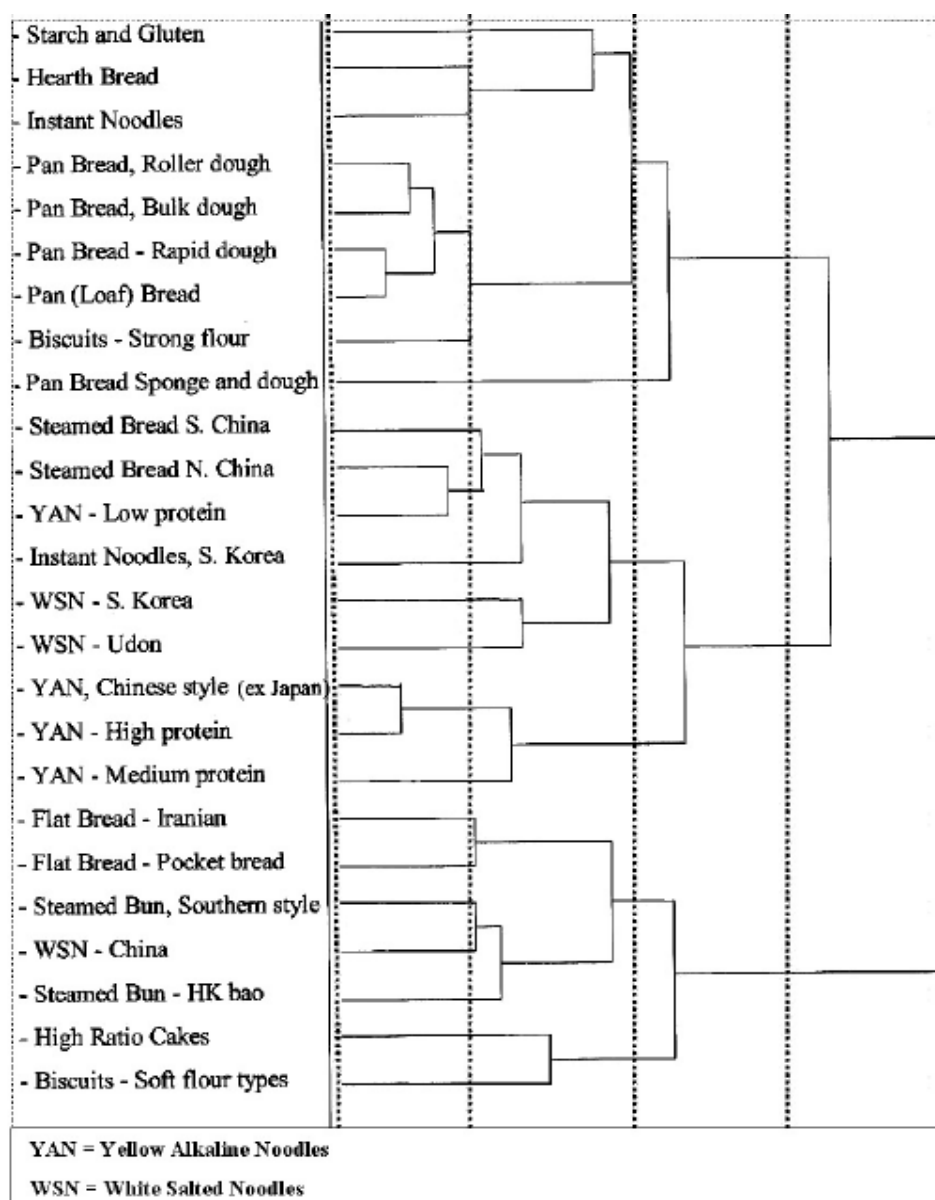


Figura 1.16. Dendrogramma (da Blakeney *et al.*, 1995).

Questo tipo di strumento è utile per l'identificazione delle caratteristiche da selezionare e per la produzione di nuovi frumenti in grado di soddisfare una maggiore varietà di applicazioni.

Il miglioramento genetico dei cereali ha avuto inizio con la selezione, operata in campo, dei genotipi con caratteristiche migliori tra le specie selvatiche e quelle coltivate. Successivamente sono state introdotte diverse tecnologie in grado di creare la variabilità genetica necessaria alla selezione dei genotipi “desiderati”; dall'incrocio tradizionale si è giunti fino allo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante utilizzata per il trasferimento di caratteri desiderati in specie di interesse. Le moderne biotecnologie, come la selezione marker-assistita e la manipolazione genetica, permettono di ottenere

le caratteristiche desiderate del germoplasma della pianta con maggiore precisione e rapidità (Baima, 2005).

1.12.1 Le risorse genetiche

Le sorgenti di variabilità genetica, comunemente definite “risorse genetiche”, includono le specie e i progenitori selvatici, collezioni di semi e banche di DNA e le varietà attualmente coltivate (Henry, 2004). Le popolazioni selvatiche rappresentano una riserva di nuovi alleli utilizzabili nei programmi di miglioramento delle piante. La pressione selettiva per tre tratti di maggiore interesse (la dimensione dei semi, la robustezza della spiga e la dispersione dei semi) ha causato una sostanziale modificazione e un impoverimento del corredo genetico dei frumenti coltivati rispetto ai loro progenitori selvatici. La poliploidia del frumento e la ridondanza genetica che ne deriva, sono responsabili di una variabilità genetica molto limitata nel frumento coltivato. La possibilità di creare frumenti esaploidi sintetici, utilizzando diverse accessioni dei progenitori diploidi, rappresenta un valido strumento per arricchire il germoplasma. Inoltre la coltivazione del frumento, che ha avuto inizio agli albori della nascita della civiltà, ha limitato lo scambio di geni con le specie selvatiche, al contrario di quanto è avvenuto per altri cereali, quali orzo e mais, domesticati, per lungo tempo, in un ambiente selvatico.

Esistono numerose collezioni di frumento conservati in diversi centri internazionali. Le banche di DNA costituiscono una risorsa per la ricerca genetica e l'identificazione di geni utili. Esse preservano la variabilità genetica di specie selvatiche e coltivate. Tali collezioni possono essere utilizzate come fonti per l'introggressione di geni utili in specie target, direttamente, attraverso le biotecnologie, o, indirettamente, attraverso l'identificazione del germoplasma di interesse e l'incrocio.

Numerose tecniche di mutagenesi sono utilizzate per creare variabilità genetica nelle specie cerealicole attraverso trattamenti chimici e fisici dei semi. Attraverso la mutagenesi sono state prodotti numerose collezione di semi e di DNA che rappresentano un'importante strumento per l'attività di breeding dei cereali. Lo sviluppo di varietà di qualità superiore è subordinato alla scoperta di nuova variabilità genetica, al miglioramento delle tecniche di selezione e all'identificazione di genotipi con nuovi fenotipi derivanti dalla combinazione di alleli localizzati in multipli *loci*. Recentemente i numerosi progressi ottenuti nella genetica e nella genomica hanno portato ad una maggiore comprensione degli aspetti strutturali e funzionali della genomica delle piante con notevole vantaggio per il miglioramento delle colture.

1.12.2 La Genomica Funzionale

La Genomica è stata riconosciuta dall'organismo internazionale World Health Organization e dall'ONU “un bene pubblico globale e uno strumento con enormi potenzialità per promuovere uno sviluppo sostenibile e migliorare la vita delle persone, inclusa la salute” (Baima, 2005). La creazione di una specie vegetale in grado di fornire tutti i nutrienti essenziali, come mezzo per migliorare le condizioni di salute nei paesi in via di sviluppo, è uno dei 14 obiettivi individuati da *Grand Challenges in Global Health research initiative* del 2003 (<http://www.grandchallengesgh.org>). La possibilità di “istruire” la pianta a sintetizzare e accumulare una sostanza di interesse è subordinata alla conoscenza della complessa biologia della pianta. L'applicazione di un approccio globale e *high-throughput* basato sulle scienze cosiddette “-omics”, che fanno capo alla genomica, rappresenta uno strumento essenziale per lo sviluppo di nuove varietà cerealicole con caratteristiche qualitative migliorate.

La definizione della funzione di tutti i geni presenti nel genoma di una pianta rappresenta la sfida maggiore nell'era della post-genomica (Gupta *et al.*, 2008). La disponibilità della sequenza completa del genoma di riso, le iniziative di sequenziamento, attualmente in corso, dei genomi di frumento e orzo e il numero crescente di sequenze EST riportate in banca dati ha enormemente incrementato il potenziale della genomica comparativa e della genomica funzionale per le specie cerealicole. La funzione di un gene di interesse può essere predetta attraverso la sua omologia con sequenze EST/DNA di geni, studiati in altre specie, con funzione nota; la genomica comparativa attualmente fornisce informazioni per il 30-40% delle sequenze di un dato genoma. Studi di trascrittomica, metabolica e proteomica sono spesso considerati parte della genomica e forniscono informazioni principalmente sui processi fisiologici dello sviluppo della pianta e di adattamento a stress biotici e abiotici (Baylan *et al.* 2008; Henry, 2007). In passato l'analisi dei mutanti è stata utilizzata con un approccio di genetica classica (*forward genetics*) al fine di identificare i geni responsabili di uno specifico fenotipo. Questo approccio è particolarmente laborioso e difficile nel caso dei cereali che presentano genomi di grandi dimensioni (frumento 16Mb) caratterizzati da un'elevata percentuale di sequenze ripetute (80%) e risulta inefficiente in un'ottica di analisi di genomica funzionale *high-throughput*. In frumento l'analisi funzionale dei geni e, di conseguenza, l'isolamento di geni responsabili di tratti di interesse agronomico e qualitativo, sono stati per lungo tempo ostacolati dalla mancanza di strumenti di analisi efficienti per le specie poliploidi. Nell'ultimo ventennio, grazie in primo luogo alla disponibilità di un vasto repertorio di sequenze nucleotidiche, sono state sviluppate diverse tecnologie di genetica inversa basate sulla “distruzione” del gene di interesse al fine di verificare il fenotipo ad esso associato e definire la funzione del gene. La genetica inversa ha recentemente avuto un forte sviluppo grazie alla creazione di due tecnologie principali il TILLING,

basato sulla mutagenesi chimica classica, e l'RNA interference che prevede la produzione di piante transgeniche.

1.12.2.1 RNA-interference nel frumento

L'RNA (RNAi) interference è una tecnologia sviluppata di recente che è stata oggetto del Premio Nobel in Medicina e Fisiologia, 2006. Schweizer *et al.* (2000) hanno dimostrato la capacità di piccoli frammenti di RNA a doppio filamento (dsRNA) gene-specifici, introdotti in singole cellule epidermiche di frumento (in transiente), di interferire con la funzionalità del gene. L'RNAi si basa sulla degradazione sequenza specifica dell'RNA a seguito della formazione di un dsRNA con sequenza omologa al gene target (Marx, 2000; Carthew, 2001; Baulcombe, 2004). Nelle specie poliploidi come il frumento tale tecnologia presenta il vantaggio di silenziare i tre omoeologhi, generalmente tutti espressi nella pianta, che sono causa di un elevato grado di ridondanza genica funzionale. Lo stesso discorso vale per i membri delle numerose famiglie multigeniche presenti nei cereali. Yan *et al.* (2004) e Loukoianov *et al.* (2005) hanno utilizzato l'RNAi per la produzione di linee di frumento transgenico stabili e hanno dimostrato che la riduzione del livello dei trascritti, VRN2 e VRN1, rispettivamente, accelerava e ritardava, la fioritura nel frumento invernale. In entrambi gli studi soltanto una singola pianta aveva mostrato il fenotipo silenziato atteso. Regina *et al.* (2006) e Sestili *et al.* (2010, *submitted*) hanno utilizzato l'RNAi per la produzione di frumento, tenero e duro, ad alto contenuto di amilosio. Travella *et al.* (2007) hanno dimostrato la stabilità del fenotipo di piante trasformate con l'RNAi in due generazioni; inoltre gli autori hanno verificato che l'effetto del silenziamento sui tre alleli omoeologhi era paragonabile. I livelli dei trascritti nelle linee di frumento silenziate risultano, in generale, ridotti in una percentuale minima del 50-60% e il grado di silenziamento varia nelle diverse linee transgeniche. Questa tecnologia è in grado di produrre "serie fenotipiche" che mostrano un diverso grado di modificazione del fenotipo in conseguenza del differente livello di silenziamento dei geni (Fu *et al.*, 2007). Gupta *et al.* (2008) sostengono che l'RNAi potrebbe offrire alcuni vantaggi relativamente alle problematiche di accettazione sociale del transgenico, in quanto non comporta l'inserimento di geni esogeni. Balyan *et al.* (2008) sottolineano che l'estensione dell'RNAi ad approcci *highthroughput* è limitata dalla sua applicabilità a singoli geni o pochi geni *target* per esperimento. Lo stesso autore sottolinea che la natura recalcitrante della maggioranza dei cereali alla trasformazione e alla rigenerazione rappresenta un limite maggiore nell'applicazione dell'RNAi agli studi di genomica su larga scala. Le piante trasformate con costrutti RNAi sono transgeniche e, in quanto tali, sono attualmente soggette a complesse problematiche di natura normativa e sociale. Le linee transgeniche di frumento duro prodotte da Sestili *et al.* (2010) presentano amidi con caratteristiche nuove e interessanti dal punto di vista applicativo; tuttavia le

difficoltà associate alla coltivazione di varietà OGM e alla commercializzazione di prodotti derivati on permette di sfruttare le potenzialità delle nuove linee e induce al ricorrere a tecnologie alternative non transgeniche per la produzione di nuove varietà di interesse.

1.12.2.2 La mutagenesi nella genetica inversa

La perdita o *knock-out* dell'espressione di un gene rappresenta la strategia più efficace per determinare la sua funzione. La mutagenesi è stata largamente utilizzata negli organismi vegetali per la produzione di popolazioni di mutanti utili alla definizione della funzione di specifici geni.

La mutagenesi inserzionale è stata applicata con successo soprattutto a specie modello quali *Arabidopsis* e riso. L'inserzione di T-DNA da *Agrobacterium tumefaciens* o di elementi trasponibili esogeni nel genoma della specie target prevede l'utilizzo di tecniche di trasformazione e rigenerazione in vitro delle piante. I vantaggi associati a questo tipo di approccio sono principalmente la possibilità di stabilire una relazione diretta tra la sequenza del gene interrotto e il fenotipo che ne deriva e la possibilità di isolare il gene candidato che è marcato dalla presenza del DNA esogeno inserito. Sono state generate popolazioni mutanti di *Arabidopsis* in grado di saturare completamente il genoma con inserzioni indipendenti (Alonso *et al.*, 2003; Sessions *et al.*, 2002, Weigel *et al.*, 2000). Nei cereali l'applicazione della mutagenesi inserzionale è limitata dalla bassa efficienza dei processi di trasformazione e rigenerazione delle piante. Inoltre risulta complicato reperire trasposoni esogeni adatti. Queste metodologie inserzionali inducono solitamente la distruzione completa del gene target; esse non sono in grado di generare serie alleliche associate alla parziale perdita o modificazione della funzionalità genica con un impatto negativo sulla conoscenza della funzionalità genomica. Zhang *et al.* (2007) hanno suggerito che le inserzioni possono essere distribuite non casualmente nel genoma elevando il numero di linee mutanti necessarie per saturare l'intero genoma a livelli non realistici. Nelle ultime decadi trattamenti mutageni chimici e fisici sono stati utilizzati per creare nuova variabilità genetica in diverse colture cerealicole portando alla creazione di circa mille nuove varietà. I primi studi di mutagenesi in frumento furono condotti da Gustafsson (1947); MacKey (1954) e Swaminathan (1961). Scarascia-Mugnozza (1965) ha riportato l'efficacia di diversi trattamenti fisici e chimici per lo sviluppo di frumento resistente all'allettamento. La prima varietà di frumento mutante è stata rilasciata in Germania nel 1960: la varietà Els selezionata dalla popolazione segregante di un incrocio sottoposto all'irraggiamento con raggi X. Nel 1999 la banca dati FAO/IAEA Mutant Varieties Database contava 178 varietà di frumento derivate da trattamento mutageno di cui 25 erano di frumento duro. Ad oggi le varietà di frumento mutanti rilasciate sono 205 (<http://www-infocris.iaea.org/MVD/>). Geni mutati responsabili di tratti di interesse quali, la resa, la resistenza a

malattia e il nanismo sono stati utilizzati in diversi programmi di *cross-breeding* portando al rilascio di numerose varietà.

La mutagenesi chimica (e fisica) presenta numerose caratteristiche positive: gli agenti mutageni introducono cambiamenti casuali nel genoma generando un'ampia varietà di mutazioni in tutti i geni target e una singola pianta contiene un elevato numero di mutazioni. Tale caratteristica permette la saturazione dell'intero genoma con la produzioni di popolazioni mutanti di dimensioni ragionevoli. I mutageni fisici consistono in radiazioni non ionizzanti (UV) o ionizzanti (raggi X e gamma, raggi alfa e beta, *fast e slow neutrons*) e provocano la formazione di delezioni più o meno estese nel genoma e cambiamenti nella struttura cromosomica. Gli agenti chimici più utilizzati includono l'etil-metan-sulfonato (EMS), metil-metan-sulfonato (MMS), l'acido fluoridrico (HF), sodio azide, N-metil-N-nitrosourea (MNU), e idrossil-amina. I mutageni chimici solitamente inducono la formazione di mutazioni a singolo nucleotide. I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) sono di maggiore interesse per i *breeders* in quanto cambiamenti profondi nella struttura cromosomica comportano una serie di effetti negativi sulla pianta e sul processo di selezione. Inoltre la mutagenesi può essere utilizzata per il miglioramento delle colture senza le restrizioni legislative, i costi e l'opposizione sociale riservato all'approccio transgenico. Batista *et al.* (2008) hanno effettuato uno studio di trascrittomica su piante mutagenizzate evidenziando profondi cambiamenti nel profilo di espressione dei geni rispetto alle piante *wild type*. Nonostante il grande potenziale delle tecniche di mutagenesi la loro applicazione nello studio funzionale dei geni dei cereali è stato limitato dalla difficoltà di stabilire la relazione fenotipo alterato-genotipo; inoltre nel frumento la poliploidia rende difficile la produzione di fenotipi alterati a causa dell'effetto di mascheramento esercitato dai geni omoeologhi. Recentemente la combinazione della mutagenesi chimica classica con efficienti tecniche molecolari di rivelazione delle mutazioni ha portato allo sviluppo di una strategia di genetica inversa *high-throughput* conosciuta come Targeting Induced Local Lesions IN Genome (McCallum *et al.*, 2000) (Fig. 1.17).

1.13 TILLING

1.13.1 La popolazione mutagenizzata

Il parametro di valutazione più rilevante per determinare la qualità di una popolazione di piante mutagenizzate è la frequenza di mutazioni indotte, presenti nel genoma dell'organismo bersaglio. Trattamenti mutageni più efficienti, in termini di densità di mutazioni indotte, richiedono la produzione di popolazioni di dimensioni inferiori con un evidente vantaggio nella gestione delle piante. L'efficacia del trattamento mutageno dipende dal dosaggio utilizzato e dal grado di ridondanza genica delle specie bersaglio (Parry *et al.*, 2009). Per ciascun agente mutageno è opportuno ottimizzare la dose utilizzata nel trattamento bilanciando l'esigenza di ottenere un'elevata densità di mutazioni con la necessità di preservare la germinabilità e la fertilità delle piante e di produrre popolazioni di dimensioni sostenibili. Popolazioni mutagenizzate sono state prodotte in tutte le maggiori specie cerealicole inclusi riso (Suzuki *et al.*, 2008), mais (Till *et al.*, 2004b), sorghum (Xin *et al.*, 2008), orzo (Caldwell *et al.*, 2004; Talamè *et al.*, 2008), frumento tenero (Slade *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, unpublished data) e frumento duro (Parry *et al.*, unpublished), (Weil, 2009).

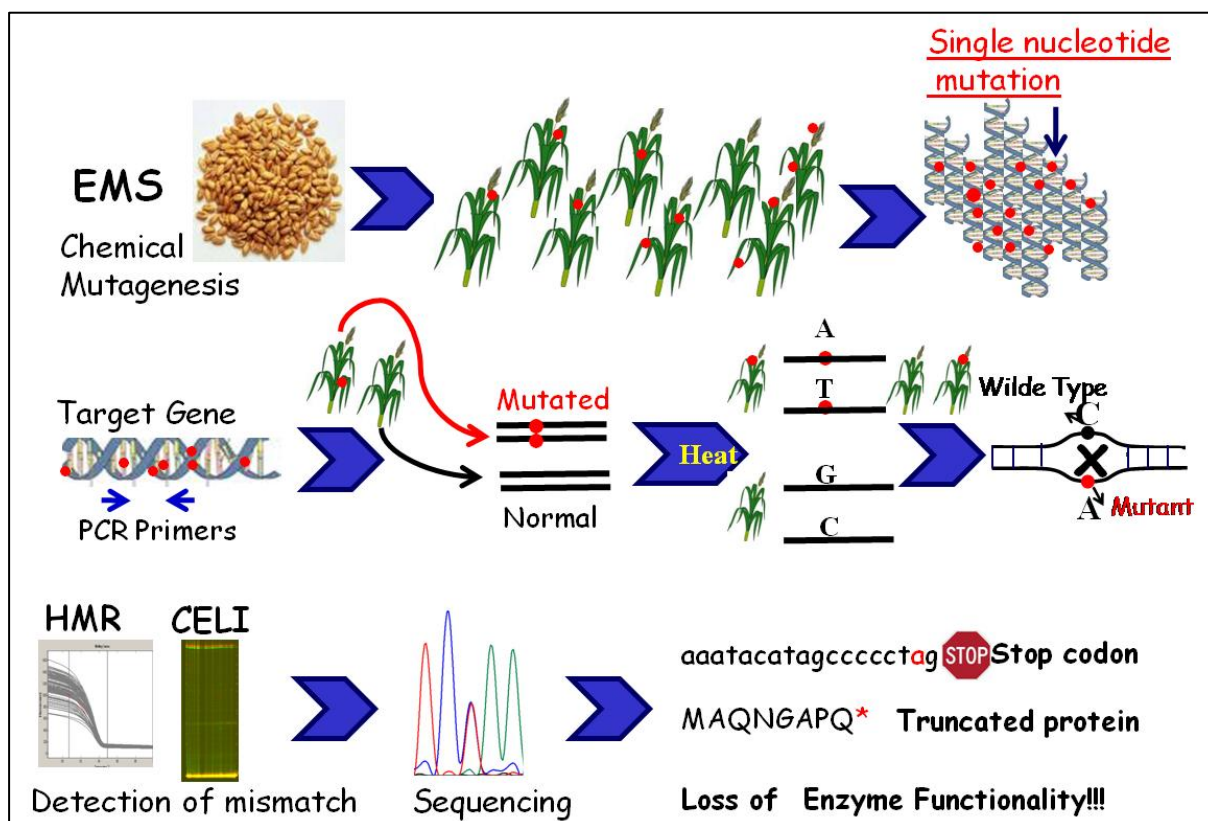


Figura 1.17. Schematizzazione della strategia del TILLING.

Nelle specie diploidi il trattamento mutageno causa elevati livelli di sterilità; per queste specie è necessario produrre popolazioni molto grandi per raggiungere livelli saturanti di mutazioni. Al contrario specie poliploidi come il frumento hanno un'elevata capacità di tolleranza alle mutazioni in ragione dell'effetto di compensazione svolto dai geni omeologhi (Stadler, 1929); in questo caso il numero di piante mutanti necessario ad assicurare la copertura del genoma è minore. La capacità tampone delle specie poliploidi comporta la necessità di identificare alleli mutati per ciascuna copia omeologa del gene bersaglio al fine di verificare il fenotipo associato alla mutazione. La scelta dell'agente chimico rappresenta un fattore determinante per il valore massimo di frequenza mutazionale ottenibile. L'EMS è un agente alchilante che crea maggiormente transizioni G-A e C-T; questo tipo di mutazione ha una probabilità relativa di provocare la formazione di codoni non senso elevata.

La strategia generale per la produzione di popolazioni mutanti nei cereali prevede l'esposizione dei semi (M_0) al trattamento mutageno, l'autoimpollinazione della progenie M_1 che dà vita ai semi M_2 (Fig. 1.18). Per assicurare il numero più elevato di mutazione un solo seme viene preso da ciascuna pianta M_1 . Il trattamento mutageno dei semi produce piante M_1 chimeriche e la segregazione delle mutazioni avviene nella M_2 . Dalle foglie degli individui M_2 viene isolato il DNA genomico utilizzato per l'analisi delle mutazioni. I semi M_3 costituiscono la collezione dei semi della popolazione mutagenizzata utilizzati per lo studio funzionale delle mutazioni identificate. La generazione M_3 è ancora segregante e non tutte le piante hanno le mutazioni presenti nella M_2 . Till *et al.* (2004) hanno utilizzato il trattamento mutageno del polline in mais. La mutagenesi applicata al polline seguita dalla sua coltura in vitro comporterebbe enormi vantaggi rispetto alla questione della fissazione delle mutazioni: sarebbe possibile ottenere mutanti omozigoti in una singola generazione (Baylan *et al.*, 2008).

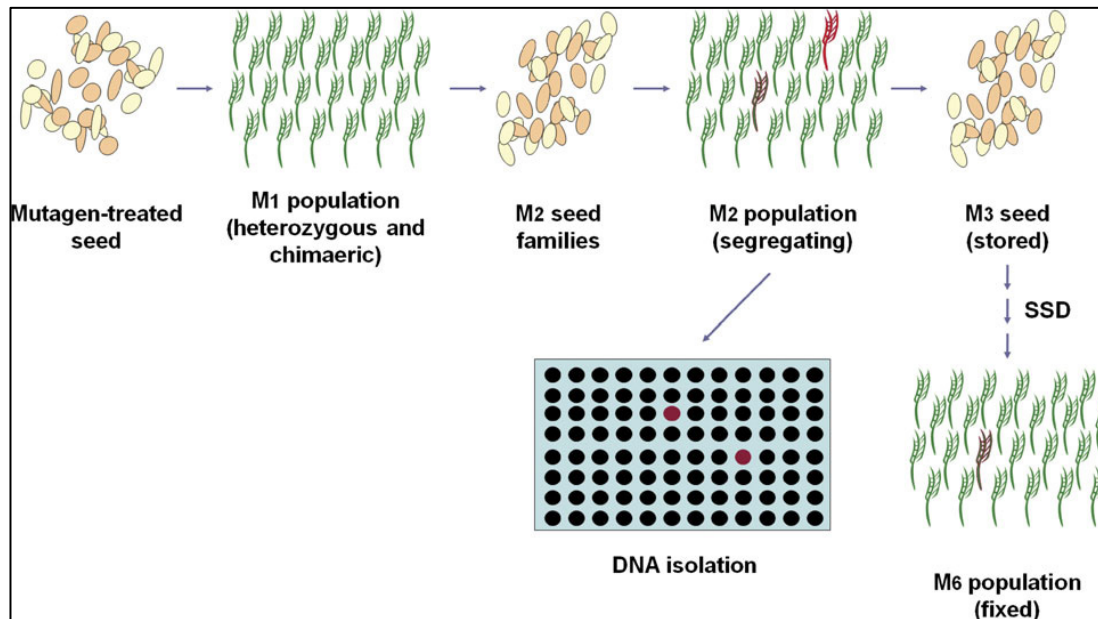


Figura 1.18. Strategia generale di produzione di una popolazione mutagenizzata per TILLING (da Parry *et al.*, 2009).

1.13.2 Analisi Delle Mutazioni Nel TILLING

1.13.2.1 Il TILLING tradizionale

Il DNA genomico isolato dai singoli individui della popolazione viene miscelato in pool di dimensioni che, comunemente, vanno da 2 a 8 piante per singolo campione analizzato. L'aumento delle dimensioni dei pool favorisce il *throughput* dell'analisi ma provoca un effetto diluizione delle mutazioni presenti. In frumento l'elevata densità di mutazioni tollerata, in ragione della sua poliploidia, determina una buona efficienza dei pool composti da due individui in termini di numero di mutazioni rilevate in un singolo esperimento (Parry *et al.*, 2009). Nel TILLING l'analisi delle mutazioni viene condotta su frammenti del gene di interesse prodotti attraverso amplificazioni PCR, allele specifiche, che utilizzano come stampo i pool di DNA genomico isolato dalle piante M2. La qualità del DNA genomico vegetale è un fattore determinante per garantire l'affidabilità delle analisi di TILLING. Nel TILLING i metodi di identificazione delle mutazioni si basano sulla presenza, nei prodotti di PCR gene specifici, di molecole di DNA eteroduplex, caratterizzate dalla presenza di un mancato appaiamento nella doppia elica; il *mismatch* è il risultato dell'associazione, in seguito a ripetuti cicli di denaturazione e rinaturazione, tra molecole di ssDNA (a singolo filamento) *wild type* e mutanti (Fig. 1.19). La prima tecnica di rivelazione utilizzata è stata la DHPLC, una tecnica cromatografica in grado di distinguere tra molecole omoduplex e eteroduplex. McCallum *et al.* (2000) hanno utilizzato tale tecnica per l'analisi di una popolazione mutagenizzata con EMS di *Arabidopsis*. Il limite maggiore di

tale metodica è il numero limitato di campioni analizzabili contemporaneamente. Lo stesso gruppo di ricercatori ha messo a punto una tecnica basata sull'utilizzo di enzimi endonucleasici in grado di catalizzare una reazione di taglio specifico, al 3' di un *mismatch*, in una molecola di DNA a doppia elica. L'enzima CelI appartiene alla famiglia delle nucleasi S1 che tagliano specificamente DNA a singolo filamento. Cobert *et al.* (2001) hanno messo a punto un metodo che utilizza l'enzima CelI per identificare polimorfismi a singoli nucleotidi (SNP). In questo metodo i frammenti PCR vengono prodotti utilizzando oligonucleotidi specifici per il gene di interesse marcati con molecole fluorescenti (gli oligonucleotidi forward e reverse assorbono, rispettivamente, nell'infrarosso a 700 e 800). Gli ampliconi eteroduplex, derivanti dall'associazione tra filamenti normali e mutati, vengono digeriti dall'enzima CelI. I prodotti delle digestione (frammento integro e i frammenti derivanti dal taglio) vengono visualizzati su gel di acrilamide (in condizioni denaturanti) attraverso il sistema LI-COR, dotato di un rivelatore di fluorescenza. Il Li-cor 4300 DNA Analyzer è in grado di analizzare fino a 96 pool, almeno 192 campioni di DNA genomico, in una sola corsa. L'utilizzo di diversi fluorofori sui due oligonucleotidi utilizzati nell'amplificazione PCR, permette di rilevare i frammenti prodotti dal taglio enzimatico in canali distinti dell'analizzatore; questa strategia fornisce la possibilità di confermare la presenza della mutazione controllando che la somma dei due frammenti equivalga alle dimensioni dell'amplicone originale. Inoltre le dimensioni dei frammenti prodotti dal taglio forniscono un'indicazione approssimativa della posizione della mutazione all'interno dell'amplicone. Dopo l'identificazione della mutazione in un pool 2x si procede al sequenziamento dei due genotipi per determinare quale dei due sia mutante; nel caso di pool con dimensione maggiori è necessario un'ulteriore analisi di "re-TILLING" al fine di individuare il genotipo di interesse. Diversi gruppi hanno proposto forme modificate del metodo basato sull'utilizzo CelI per aumentarne l'affidabilità o il *throughput*. Till *et al.* (2004) hanno analizzato l'efficienza di diversi endonucleasi. Triques *et al.* (2008) hanno dimostrato che l'enzima EndoI ha una efficienza paragonabile a CelI. Sono stati sviluppati diversi sistemi di analisi dei frammenti derivanti dal taglio: dall'elettroforesi capillare (Cross *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2008) vantaggiosa in termini di sensibilità e livello di automazione; all'analisi su gel di agarosio senza l'utilizzo di fluorofori che rende il TILLING una tecnica di facile accesso (Raghavan *et al.*, 2007). Diversi strumenti di bioinformatica offrono supporto per la messa a punto di un esperimento di TILLING. Il programma CODDLE (www.proweb.org/coddle/) è in grado di determinare la regione del gene *target* più adatta all'analisi TILLING, in termini di probabilità di individuare mutazioni deleterie. Questo programma, liberamente accessibile dal web, utilizza un software di allineamento di sequenze nucleotidiche e si appoggia su Primer3 per il disegno di oligonucleotidi allele specifici in grado di amplificare frammenti genici fino a 1,5 Kb. CODDLE fornisce indicazioni sull'effetto di mutazioni missenso in base alle informazioni presenti nelle banche dati sul grado di conservazione delle posizioni amminoacidiche nella sequenza della proteina di

interesse. PARSESNP (www.proweb.org/parsesnp/; Taylor *et al.* (2003) analizza l'effetto della mutazione sulla funzionalità del gene utilizzando modelli di omologia di proteine.

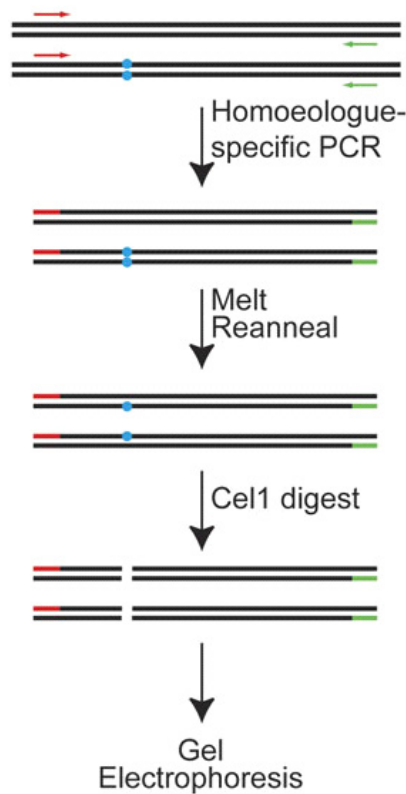


Figura 1.19. Schema del metodo TILLING basato sulla digestione con Cel1.

1.13.2.2 High resolution melting applicato al TILLING

Recentemente è stata sviluppata una tecnologia di nuova generazione per l'analisi delle mutazioni chiamata high-resolution meltingTM (HRM) (Wittwer *et al.*, 2003). A partire dalla sua invenzione l'HRM è stato largamente utilizzato in studi di tipo medico per la diagnostica molecolare di alcune malattie e la caratterizzazione genotipica dei pazienti (Reed *et al.*, 2007). Le prime applicazioni di tale tecnologia nello studio delle piante sono molto recenti: negli ultimi dodici mesi diversi gruppi hanno riportato l'utilizzo dell'HRM in studi di caratterizzazione di marcatori SNP o micro satelliti in diverse specie coltivate quali il melo (Chagne *et al.*, 2008), *Lupinus albus* (Croxford *et al.*, 2008), l'orzo (Lehmensiek *et al.*, 2008), l'uva (Mackay *et al.*, 2008), mandorla (Wu *et al.*, 2008). Hofinger *et al.* (2009) hanno pubblicato, nel luglio di quest'anno, uno studio dettagliato dell'applicazione dell'HRM all'*allele mining* in una collezione di mutanti naturali di orzo. Per "*allele mining*" si intende la ricerca

di nuove varianti alleliche di interesse in loci a funzione nota (Kaur *et al.*, 2008). Gady *et al.* (2009) nell'ottobre di quest'anno hanno riportato l'utilizzo dell'HRM nel TILLING in pomodoro. Questo studio rappresenta il primo esempio di applicazione dell'HRM nello screening di una popolazione di piante mutagenizzate con EMS. L'HRM offre notevoli vantaggi in termini di costi e soprattutto di tempo rispetto alle tecniche utilizzate nel TILLING tradizionale. È un semplice saggio *closed-tube* effettuato sugli ampliconi PCR e non implica alcun ulteriore processamento dei frammenti amplificati. La sensibilità e la specificità di tale metodo è migliore della tecnica dHPLC (Chou *et al.*, 2005) e si avvicina a valori del 100% per ampliconi di dimensioni minori di 400 bp (Reed e Wittwer, 2004). L'HRM risulta adatto ad analisi *high-throughput* in quanto prevede l'analisi di piastre di PCR costituite da 96 o 384 posizioni. In questa metodologia, come nel TILLING classico, l'identificazione degli SNP, presenti in piante chimicamente mutagenizzate, è subordinata alla formazione di una molecola eteroduplex tra singoli filamenti di ampliconi *wild type* e mutanti. Gli ampliconi oggetto di analisi vengono prodotti per amplificazione PCR in presenza di concentrazioni saturanti di una sonda fluorescente che si comporta da intercalante del dsDNA (DNA a doppio filamento); subito dopo si procede all'analisi del profilo di melting (denaturazione) degli ampliconi con l'utilizzo dello strumento HRM. La sonda fluorescente non interagisce con ssDNA (singolo filamento) ma si intercala nel dsDNA e emette un segnale di fluorescenza in questa condizione. Dopo l'amplificazione PCR, lo strumento HRM provvede al lento riscaldamento dei campioni e contemporaneamente registra la progressiva riduzione del segnale di fluorescenza causato dal rilascio della sonda da parte delle molecole di dsDNA in via di denaturazione (Wittwer *et al.*, 2003). I dati forniti da uno strumento HRM consistono nei profili o curve di *melting* degli ampliconi analizzati che derivano dalla riduzione di fluorescenza vs l'aumento della temperatura. I frammenti PCR mutanti-eteroduplex mostrano un profilo di melting alterato rispetto alla sequenza omoduplex-*wild type*. L'analisi HRM è risultata molto efficiente per l'identificazione di una larga varietà di SNP: transizioni (C>T, G>A e A>G); trasversioni (C>A, C>G, G>T, G>C, A>C e T>A), inserzioni e delezioni dell'ordine di dieci nucleotidi. Hofinger *et al.* (2009) hanno dimostrato che la sensibilità del metodo consente di utilizzare pool composti da almeno cinque campioni per ampliconi di dimensioni fino a 300 bp. L'applicazione di questa metodologia al TILLING offre particolari vantaggi nel caso di geni target caratterizzati da strutture ricche di regioni non codificanti e da un numero elevato di esoni di dimensioni limitate. In questa situazione l'utilizzo della digestione con Cel1, di ampliconi dell'ordine di grandezza di 1, 5 Kb, implica l'identificazione di un'elevata percentuale di SNP "non funzionali" in quanto presenti nelle regioni introniche del gene. L'HRM si basa sull'analisi di frammenti di dimensioni fino a 500 bp; le amplificazioni PCR sono progettate in modo che l'amplicone copra la regione corrispondente ad un singolo esone con vantaggi in termini di tempo e di efficienza dell'analisi. In specie poliploidi come il frumento l'HRM prevede una strategia di *nested-PCR*: la prima amplificazione PCR produce

frammenti omoeologhi-specifici di dimensioni elevate (fino a 2 kb); nella seconda PCR l'amplicone della 1^aPCR viene utilizzato come stampo, da diverse coppie di oligonucleotidi specifiche per l'amplificazione degli esoni (Parry *et al.*, 2009). L'efficienza dell'HRM dipende dalla risoluzione dello strumento utilizzato e dalla scelta della sonda fluorescente. Studi di confronto di diverse strumentazioni e sonde fluorescenti riportano che il *throughput* maggiore può essere ottenuto con l'utilizzo della sonda LCGreen Plus, che non inibisce l'amplificazione PCR a concentrazioni che saturano i prodotti PCR, in combinazione con lo strumento Idaho Technology LightScanner (Hermann *et al.*, 2006, 2007).

1.13.2.3 Sequenziamento su larga scala

L'avvento delle tecniche di sequenziamento su larga scala potrebbe rappresentare un'alternativa ai metodi di analisi delle mutazioni basate sul *mismatch*. Parry *et al.* (2009) sono i primi autori a suggerire l'utilizzo del sequenziamento per lo *screening* di una popolazione di frumento EMS. Tuttavia questo tipo di approccio è attualmente in fase di sperimentazione. Weil, nella sua review del 2009, descrive la strategia del sequenziamento su larga scala nel TILLING, suggerendo che un vantaggio maggiore è la possibilità di utilizzare pool di 40 o 50 individui che consente un *throughput* maggiore dei pool di massimo 8 individui utilizzati nel TILLING classico.

1.13.3 Il TILLING nei cereali

Il TILLING rappresenta uno strumento di elevato potenziale per gli studi di genomica funzionale e il miglioramento delle coltivazioni cerealicole. La natura recalcitrante delle maggiori specie cerealicole ai processi di trasformazione e rigenerazione *in vitro* causa notevole limitazione agli approcci di mutagenesi inserzionale e silenziamento attraverso tecnologia transgenica. Al contrario la poliploidia di specie come il frumento comporta un'elevata capacità di tolleranza ai trattamenti di mutagenesi classica che consente la produzione di popolazioni ad elevata densità di mutazioni. Inoltre la mutagenesi chimica permette la produzione di numerosi varianti alleliche del gene target associate a diversi livelli di alterazione del fenotipo corrispondente; le nuove serie alleliche rappresentano un'opportunità sia per gli studi funzionali che per la produzione di fenotipi con caratteristiche intermedie tra il *wild-type* e il mutante *knock-out*. L'attuale atteggiamento della società e del Legislatore nei confronti delle tecnologie transgeniche rende il TILLING una strategia di miglioramento genetico di più facile utilizzo e applicazione. Esempi di applicazioni del TILLING nei cereali esistono in frumento, mais, riso e sorghum. Slade *et al.* (2005) hanno riportato il primo esempio di applicazione del TILLING al miglioramento della qualità del frumento: due alleli mutati

waxy per due loci omoeologhi del gene GBSSI e un mutante naturale caratterizzato dalla presenza di una delezione nel terzo omoeologo sono stati combinati per incrocio per ottenere la linea triplo mutante con fenotipo waxy. In un altro studio, basato sull'utilizzo di elettroforesi su gel d'agarosio e oligonucleotidi non marcati, sono stati individuati 100 nuove varianti alleliche per i loci *Wx-A1* e *Wx-D1* e 20 mutazioni nei due geni *Pina* e *Pinb* codificanti le purindoline responsabili della durezza (*texture*) della cariosside nei frumenti hard (Dong *et al.*, 2009). Sestili *et al.* (2010b) hanno riportato la produzione di nuove varianti alleliche per i geni *Sgp-1* in frumento tenero con un approccio di TILLING classico. L'assenza dei tre isoenzimi *Sgp-1* è stata in precedenza associata ad un fenotipo *high amylose* in frumento tenero e duro (Yamamori *et al.*, 2000; Lafiandra *et al.*, 2010). Piattaforme TILLING sono state prodotte in orzo (Cadwell *et al.*, 2004; Talamè *et al.*, 2008), in mais (Till *et al.*, 2004), riso (Till *et al.*, 2007) e sorgo (Cross *et al.*, 2006; Xin *et al.*, 2008).

1.13.4 EcoTILLING

L'Eco-TILLING rappresenta un'estensione della strategia di TILLING applicata all'analisi dei polimorfismi nelle popolazioni di mutanti naturali (Comai *et al.*, 2004). La tecnologia è la stessa utilizzata nel TILLING eccetto che per la strategia di *pooling* del DNA: gli individui da analizzare vengono mescolati in rapporto 1:1 con il campione di riferimento. Il vantaggio di questo approccio risiede nel fatto che la caratterizzazione delle serie alleliche e la scoperta di nuovi varianti alleliche prevede il sequenziamento solo degli aplotipi individuati con l'analisi di TILLING.

FINALITÀ'

2 FINALITÀ

L'amido è stato considerato per lungo tempo una sostanza inerte incapace di influire sulla qualità tecnologica e nutrizionale dei prodotti alimentari e utile unicamente all'apporto di calorie nella dieta umana e animale.

Recentemente è emersa la volontà di esplorare le potenzialità dell'amido in un'ottica di miglioramento delle caratteristiche nutrizionali dei cereali. Questa tendenza è certamente legata alla larga diffusione, soprattutto nei paesi industrializzati, di importanti malattie dovute principalmente a regimi alimentari errati. I cereali, e in particolare il frumento, rappresentano una risorsa ideale per apportare nuovi benefici alla salute umana in quanto rappresentano la maggiore fonte di energia nell'ambito della dieta umana.

L'aumento della conoscenza dei meccanismi che governano la biosintesi dell'amido nei cereali ha permesso di identificare il rapporto quantitativo tra i due polimeri glucanici che lo compongono, l'amilosio e l'amilopectina, quale fattore chiave per la determinazione delle sue proprietà tecnologiche e nutrizionali.

La produzione di amidi ad alto contenuto di amilosio ha suscitato particolare entusiasmo a causa delle sue peculiari caratteristiche nutrizionali. L'incremento del contenuto di amilosio è stato associato all'aumento di amido resistente nei prodotti alimentari. L'amido "resistente" è una frazione di amido, essenzialmente costituita dalle catene lineari di amilosio, in grado di resistere all'azione degli enzimi digestivi umani e di essere fermentata dalla microflora intestinale con importanti benefici per la salute del colon. Inoltre la possibilità di produrre cibi ricchi in "amido resistente" costituisce una prospettiva interessante per la prevenzione di numerose malattie legate a regimi alimentari ipercalorici.

La finalità ultima di questo progetto di dottorato è stata la produzione di nuova variabilità genetica nei loci *SBEIIa* che codificano per un enzima noto svolgere un ruolo importante nella determinazione di rapporto amilosio-amilopectina in frumento. La generazione di nuova variabilità genetica nei loci coinvolti nella regolazione della biosintesi dell'amido mira sia alla produzione di linee di mutanti utili per gli studi di genomica funzionale sia alla produzione di genotipi del tipo *loss of function* legati a nuovi fenotipi di interesse.

Al fine di generare linee di frumento caratterizzate dalla perdita dell'espressione di geni *SBEIIa*, condizione utile alla produzione di fenotipi *high amylose*, è stata applicata una tecnologia di genetica inversa di nuova generazione denominata TILLING. Questo progetto si è inoltre proposto di verificare

l'efficienza di una nuova tecnica di identificazione delle mutazioni nota come High Resolution Melting.

MATERIALI E METODI

3 MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale

3.1.1 Set di linee waxy e parziali waxy di frumento tenero e duro

I 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 Set di linee Sgp-1 nulli parziali e completi 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*⁻), Kanto 79 (*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.

3.1.3 Altri materiali vegetali

Sono state utilizzate le cultivar tenero *Chinese Spring* e *Cadenza*.

Sono state inoltre utilizzate le linee di sostituzione del cromosoma 2D della cultivar di frumento duro Langdon. Queste linee sono state derivate dall'incrocio di linee aneuploidi di frumento tenero con il frumento duro Langdon (Joppa *et al.*, 1988) e successivo reincrocio con il parentale tetraploide. In particolare nella linea LND 2D(2A) il cromosoma 2A è assente e sostituito dal cromosoma 2D di frumento tenero. Nella linea LND2D (2B) il cromosoma 2B è sostituito dal cromosoma 2D. Nella tabella 3.1 sono riportate le informazioni disponibili relative alle accessioni dei frumenti utilizzati negli esperimenti di caratterizzazione dei polimorfismi intergenomici.

Tabella 3.1. Elenco delle accessioni utilizzate.

Specie	Codice linea	Provenienza
<i>T. boeoticum(a)</i>	PI427566	Turchia
<i>T. boeoticum(b)</i>	PI427609	Iraq
<i>T. urartu(a)</i>	MG29406	Turchia
<i>T. urartu(b)</i>	MG29422	Turchia
<i>Ae. speltoides(a)</i>	TS01	Israele
<i>Ae. speltoides (b)</i>	TS02	Israele
<i>Ae. searsii</i>	TE03	Israele
<i>Ae. sharonensis</i>	TH01	Israele
<i>Ae. longissima</i>	TL02	Israele
<i>T. araraticum</i>	11	
<i>T. araraticum</i>	418585	
<i>T. dicoccoides(a)</i>	MG4343	
<i>T. dicoccoides (b)</i>	ATR1	
<i>T.monococcum(a)</i>	MG4278	Italia
<i>T. monococcum(b)</i>	BGRC43493	Balceni
<i>T. dicoccum (a)</i>	5309/96	
<i>T. dicoccum (b)</i>	ATR1/7305	
<i>T. dicoccum (c)</i>	5307/96	
<i>T. timophevii(a)</i>	1813	
<i>T. timophevii(b)</i>	5417	

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 10 mM) 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 denaturate 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 µl di TE (Tris. Cl 10 mM pH8. 0, EDTA 1 mM). A questo punto si procede al trattamento con ribonucleasi A (1µg RNAsi per 10µg 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 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 pH9; 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 1ml 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 (3M) 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 Metodo 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.

3.4 Metodi per l'isolamento di frammenti genici

3.4.1 Disegno di oligonucleotidi genoma specifici

Le sequenze dei tre genomi A, B e D sono state allineate per l'identificazione delle regioni polimorfiche. Gli oligonucleotidi sono stati disegnati attraverso il programma Primer 3. Le coppie di oligonucleotidi sono state validate per PCR sulle linee di sostituzione disomiche di Langdon. Gli ampliconi sono stati quindi analizzati per elettroforesi su gel d'agarosio dall'0.7% al 1.8%.

3.4.2 Amplificazione PCR

Le reazioni di amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), sono state eseguite a partire da 50-100 ng di DNA genomico in un volume finale di 50 µl. La miscela di reazione è costituita da 1X tampone di reazione della Taq Polimerasi contenente MgCl₂ 1.5M, 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 1-7 min (a seconda della lunghezza del frammento da amplificare) a 72°C con un ultimo ciclo di estensione allungato a 5 min.

3.4.3 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 = 250mM 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 1µl (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 amplificazioni 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 3.2.

Tabella 3.2. Coppie di oligonucleotidi utilizzati nell'esperimento di RT-PCR.

Oligo forward	Sequenza (5'-3')	Oligo reverse	Sequenza (5'-3')
RT-A1F	GGGGACTGCAGAAAACTTG	RT-A1r	TCAATAGCAGCACGAATTCTCC
RT-A2f	GCGGACTGCTGCCGCGAT	RT-A2r	CTTCAGCCGTTTGCTCCTCGATG
RT-A1F	GGGGACTGCAGAAAACTTG	RT-A2r	CTTCAGCCGTTTGCTCCTCGATG

3.4.4 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.

3.4.5 Determinazione delle sequenze nucleotidiche

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

3.5 Isolamento dei geni *SBEIIa*

I due alleli *SBEIIa* sono stati isolati per PCR attraverso l'utilizzo degli oligonucleotidi riportati in tabella 3.3 producendo, per ciascun allele, due frammenti sovrapposti. I frammenti sono stati analizzati per elettroforesi su gel d'agarosio all'0,7%, purificati e sottoposti a sequenziamento.

Tabella 3. 3. Coppie di oligonucleotidi utilizzato per l'isolamento dei geni *SBEIIa*.

Allele	Oligo Forward	Sequenza (5'-3')	Oligo Reverse	Sequenza (5'-3')	Amplicone
<i>SBEIIa-A</i>	SBEIIa-1F	CGTTGCTCCCCCTTCTCATCGC	SBEIIa-A-R	GGATCTGTTCAATAGGCTCGTACC	1A
	SBEIIa-A-F	ATTATGAGGCCACCCTGCAC	SBEIIa-1-R	GCAAGATAGGAGGAGGTTTCAG	2A
<i>SBEIIa-B</i>	SBEIIa-1F	CGTTGCTCCCCCTTCTCATCGC	SBEIIa-B-R	ACCGAAGTCAAGCTCCTCACTC	1B
	SBEIIa-B-F	CAAAGGAGGAGTGAGGAGCTTG	SBEIIa-1R	GCAAGATAGGAGGAGGTTTCAG	2B

3.6 Identificazione e caratterizzazione dei polimorfismi negli omoeologhi *SBEIIa*

Le sequenze nucleotidiche dei tre geni sono stati allineati attraverso l'applicazione ClustalW (*helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html*). Le regione polimorfiche di interesse sono state amplificate per PCR utilizzando gli oligonucleotidi riportati in tabella 3.4. Gli ampliconi sono stati analizzati per elettroforesi su gel di agarosio all'1.5%, purificati e sottoposti a sequenziamento.

Tabella 3. 4. Coppie di oligonucleotidi utilizzati per l'analisi dei polimorfismi negli alleli *SBEIIa*.

Oligo -Forward	Sequenza (5'-3')	Oligo-Reverse	Sequenza (5'-3')	T. annealing
A ^m -F	CCAGTGGTCAGAATGCATCAAC	A ^m -R	GGTGAAGAGGCGCATACA	62
SBEIIa ^(XIV) F	TGCTGTATCCATTGGTGAAGATG	SBEIIa ^(XIV) R	CTGAAGCAATTGACAAGGTTGC	62
SBEIIa ^(XIV) F	TGCTGTATCCATTGGTGAAGATG	B ^{XIV} R	GTGATGCATTACCATACAAGGTACTCC	62

3.7 TILLING

3.7.1 Produzione di una popolazione di frumento tenero mutagenizzata con l'EMS

La popolazione di frumento tenero mutagenizzata è stata generata attraverso il trattamento delle cariossidi mature (cultivar Cadenza) con soluzioni acquose di EMS alle concentrazioni 0, 6% (v/v) o 0. 9% (v/v) per 16 h. Dopo il trattamento, le cariossidi sono state sottoposte a sei cicli di lavaggio e lasciate asciugare su carta da filtro. I semi sono stati quindi allevati sia in campo che in serra. È stata quindi raccolta una singola spiga di ciascuna pianta M1 (6000 piante) e un singolo seme di ciascuna spiga è stato allevato per generare le piante M2. È stato campionato il materiale fogliare di ciascuna pianta M2 e conservato a -70°C fino al momento dell'isolamento del DNA genomico. Una singola spiga matura di ciascuna pianta M2 che ha prodotto semi (4, 244 linee) è stata inviata a Martonva'sa'r e le rimanenti spighe sono state trebbiate e conservate a 6°C in condizioni di umidità controllata. Le piante M3 sono state allevate a Martonva'sa'r e una parte dei semi M4 sono stati utilizzati per analisi biochimiche (Viterbo). Il DNA genomico è stato isolato dal materiale fogliare utilizzando il protocollo di estrazione basato sull'utilizzo del disolfato di sodio (Van Deynze e Stoffel, 2006) in piastre da 96 pozzetti. Il DNA è stato solubilizzato in 200 µl di tampone TE; la concentrazione di DNA è stata misurata utilizzando il saggio Quant-iT PicoGreen (Invitrogen), in una diluizione 50X, utilizzando un fluorimetro Beckman DTX 880 NX integrato in un robot Beckman Biomek NX Span-8. Lo stesso sistema è stato utilizzato per normalizzare le concentrazioni del DNA genomico a 10 ng/µl e per creare le piastre di pool di due genotipi utilizzate nel TILLING. (Parry *et al.*, 2009).

3.7.2 Generazione dei pool di DNA

Sono stati prodotti pool di DNA in piastre PCR da 96 pozzetti; in ciascun pozzetto sono stati miscelati, in rapporto 1:1, i DNA genomici isolati da due distinti individui della generazione M2. La concentrazione finale del DNA genomico in ciascun pozzetto è 2 ng/µl in un volume di 5µl.

3.7.3 Isolamento delle regioni geniche allele specifiche

1th round PCR

Le amplificazioni PCR sono state condotte in un volume finale di 10 µl utilizzando 10 ng di DNA genomico di frumento, 5 µl HotShot™ Mastermix (Cadama Medical Ltd), 1µl LCGreen Plus Dye (Idaho) Technology Inc.), 1 µl di ciascun oligonucleotide (10 µM). La soluzione è stata quindi ricoperta con 10 µl di olio minerale (Sigma-Aldrich). Le condizioni di PCR utilizzate sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 95 °C per 5 min; 35 cicli a 95°C per 30 s, 62°–67°C per 30 s e 72°C per 1,4-2,3 min; step di estensione finale 72°C per 10 min. Le temperature di annealing ottimali sono state determinate per ogni coppia di oligonucleotidi attraverso una PCR in gradiente. Gli oligonucleotidi utilizzati sono riportati in tabella 3.5.

Tabella 3. 5. Coppie di oligonucleotidi utilizzate nelle amplificazioni allele specifiche nel TILLING.

Amplificone	Oligo-forward (5'-3')	oligo-reverse (5'-3')	T. annealing	Dimensioni(bp)
A ^(II-V)	CGCTCGCTCGCTCCAATC	GCAACTGGTCAGTATTCAGTAAGCTAAG	65	1720
A ^(VI-IX)	TCTGAGAAATATGCTGGGACGTAG	GTTCGAAAATGCTACATGCTCA	62	1560
A ^(X-XIII)	CCAGTGGTCAGAATGCATCAAC	GGGAAGTATCTAAGACTCCGTAGCAC	67	2100
B ^(IV-IX)	ATGTGGTGGATGGGTATGG	TCCATAGAATAAACCATCAGACCG	62	1970
D ^(II-VI)	ATCGCGCTTCTGAACTG	GGGCTGAAGCTTAAGACACTGAC	65	1980
D ^(VI-IX)	CGTGCAACACTCCCCTCTGC	TATGACTTTTCACATGCCCACTG	65	1100
D ^(X-XII)	GAGGCAGTGGGCATGTGAAAGTC	CTAGGGAAGTATCTAAGACTCCGTAGCAC	67	2200
D ^(XVI)	GGAAGTGTCCAAATATGCTGCAGTG	CATACGAAGCAAATGAGTGAATCTACAC	64	300

2th round PCR

Le amplificazioni PCR sono state condotte come descritto nel paragrafo precedente ad eccezione che il DNA stampo utilizzato è stato 1 µl di una diluizione 1:60 del prodotto PCR ottenuto nella 1th round PCR; le amplificazioni PCR sono state condotte in piastre PCR da 96 pozzetti Frame-Star® (4titude® Ltd, Surrey, UK).

Le condizioni di PCR utilizzate sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 95 °C per 5 min; 35 cicli a 95°C per 20 s, 60°C per 20 s e 72°C per 20 s; step di estensione finale 72°C per 10 min; 95°C per 30 s; 25°C per 1 min. La soluzione è stata ricoperta con 10 µl di olio minerale. L'ultimo step di denaturazione e rinaturazione viene eseguito per aumentare l'efficienza del processo di formazione degli eteroduplex. Le temperature di *annealing* ottimali sono state determinate per ogni coppia di oligonucleotidi attraverso una PCR in gradiente. Gli oligonucleotidi utilizzati sono riportati in tabella 3. 6.

3.7.4 Analisi HRM

Le piastre PCR sono state brevemente centrifugate e quindi sottoposte all'analisi HRM utilizzando lo strumento LightScanner (Idaho Technology, Inc.). I campioni sono stati riscaldati in un intervallo di temperatura variabile tra 70°C e 99°C. La denaturazione degli ampliconi comporta il rilascio dell'LCGreen e lo strumento registra la diminuzione dell'emissione di fluorescenza all'aumentare delle temperatura. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software LightScanner®. La normalizzazione e la determinazione dell'intervallo di temperatura delle curve di melting sono state eseguite secondo le istruzioni riportate nel manuale dello strumento. Sono stati utilizzati due diversi modi di visualizzare i dati: le curve di melting normalizzate (F/T) e le curve differenziali ($\Delta F/T$). Le curve di melting normalizzate mostrano il cambiamento dei valori di fluorescenza, in ogni campione, durante la denaturazione dei prodotti PCR all'aumentare della temperatura (Fig 3.1). Le curve differenziali mostrano la differenza relativa di fluorescenza di ciascun campione rispetto ad un campione di riferimento (Fig. 3. 2). In accordo con il manuale dello strumento, valori di ΔF di 0.05 sono stati considerati significativi e i campioni corrispondenti putativi mutanti.

Tabella 3. 6. Coppie di oligonucleotidi utilizzate nelle amplificazioni PCR nel 2th round PCR.

Allele	Esone	Oligonucleotide Forward (5'-3')	Oligonucleotide Reverse (5'-3')	Tannealing	Dimensioni (bp)
SBEIIa-A	II	CCACTGACCGACTCACT	ATGGACGGGGAGATTGG	60	215
	III	TCACTATTGTAGTCATCCTTGCAT	TGAAGATTCCCGGCACG	60	156
	IV	TGGTTTCGTTAGTCTGCTCT	TGAGCGAAAGTAGCGGG	60	313
	V	TTTGGGTATGCCTCCGT	TGGAGGCGCTTCATAATACT	60	163
	VI	TTGCTCTAAATTTATGATCTGGCT	AGGTGGAAGATTGCCAAG	60	153
	VII	TGCTCCTATTGATGCCGAT	GCTACATGCTCAACTAAATAATTGG	60	152
	VIII	CTCTGCCCACTAAGGGT	AAATTTCATTTAATAATGTAATGGAGATCG	60	204
	IX	CCTTTTGTGACCATTACTAAGGATA	ACCAGAAACAGGTGAAATAACT	60	157
	X	ACAATACTTAGAGGATGCATCTGA	GGTGAAGAGGCGCATACA	60	212
	XI	GGTATTTCTGACTTGATGACCATT	ACCAGATAAACAGTAAAGCAGC	60	223
	XII	GTTGCATTGCTTCATCAATGATT	CAAATATGGTGACAGAAGTCAGAG	60	237
	XIII	TGTTAAATCTGTTCTTACACATGTCG	CATAGCAATTATTTCACTGCCCT	60	266
SBEIIa-B	IV	AACACACTGCTAAATTTGAATGAT	AGACTAGTGGAGGCGTT	60	19
	V	TGCTGAAGGTATCATCTAATTGC	TGACCATTAAACAATAGATTAGAAGGTG	60	159
	VI	CAGTTACTCTAAATTTATGATCTGGCT	AGGTGGAAGATTGCCAAG	60	134
	VII	CCTATTGATGCCGATATTTGATATG	TCCTCGACTAAATAATTGGCCAG	60	152
	VIII	AACTCTGCCTACTAAGGGT	ACACTGGAAATTCATTTAATAATGTAAC	60	204
SBEIIa-D	IX	CCTTTTGTGACCATTACTAAGGATA	CCGGAACAGGTGAAATAACT	60	157
	II	ACTATTGTAGTCATCCTTGCAAT	ATGAAGATTTACCGGCACG	60	157
	III	TCAGTCTGCTCTACAATTGCTAT	GAAAGCAGCGGGTAGGC	60	301
	IV	GGGTATACCTCGGTGGATTC	AGACTAGTGGAGGCGTTT	60	167
	V	GAAGGTATCGTCTAATTGCATATCT	CAATAAATTTGGAAGGTGCTCGTT	60	154
	VI	ATCTGGCTTTTGACCCC	AGTAGTTATGAAGCAAAGGTGG	60	131
	VII	AGGTTTGCTCCTATTGATGC	TCCTCGACTAAATAATTGGCCAG	60	153
	VIII	AACTCTGCCTACTAAGGGT	AAACTGTAACACTGGAAATTTCAATTAATA	60	212
	IX	ACCATTACTAAGGATATTTACATGCAA	ACCAGAAACAGGTGAAATAACT	60	151
	X	ACAATACTTAGAGGATGCATCTGA	GGTGAAGAGGCGCATACA	60	212
	XI	GGTATTTCTGACTTGATGACCATT	ACCAGATAAACAGTAAAGCAGC	60	223
	XII	GTTGCATTGCTTCATCAATGATT	CAAATATGGTGACAGAAGTCAGAG	60	237
	XIII	TGTTAAATCTGTTCTTACACATGTCG	CATAGCAATTATTTCACTGCCCT	60	266

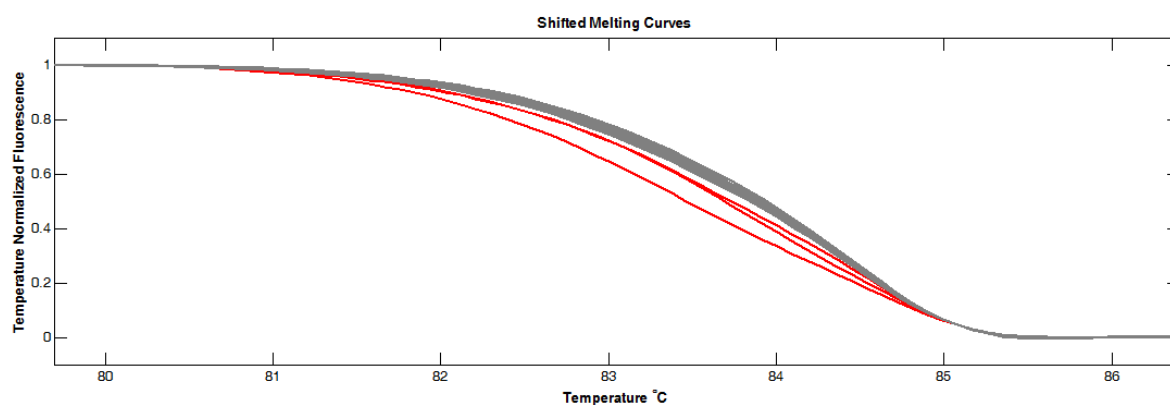


Figura.3. 1. Curve di melting normalizzate.

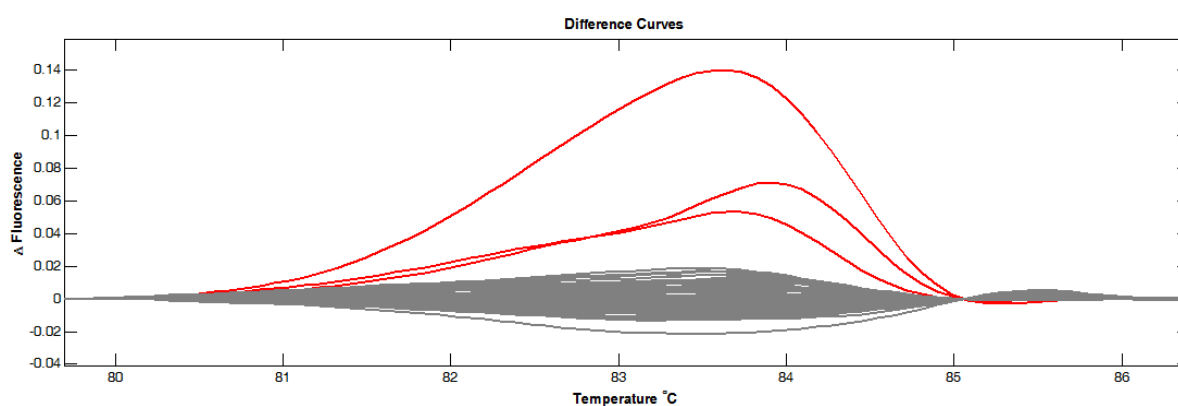


Figura 3. 2. Curve di melting differenziali.

I due genotipi costituenti il pool mutante sono stati sottoposti ad un *repooling* (vedi Risultati) e ad una nuova analisi HRM. Il genotipo identificato quale mutante è stato sequenziato per la caratterizzazione della mutazione puntiforme.

3.8 PCR Marker Assisted Selection

I frammenti PCR sono stati prodotti utilizzando gli oligonucleotidi riportati in tabella 3.7.

Il frammento di DNA di interesse (1 µg) è stato digerito in un volume di reazione di 20 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 è stato lasciato per 2-3 ore alla temperatura ottimale di digestione (che per la maggior parte degli enzimi corrisponde a 37°C) e successivamente controllato su gel d'agarosio 1.8%. 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).

Tabella. 3.7. Coppie di oligonucleotidi utilizzate nei saggi di *PCR-Marker-Assisted-Selection*

Mutante	Oligo	Oligo-reverse
SBEIIa-A`1	TATTTTACATGCAAATGCAGGAGAAGTATGTCTTA	GCTTGCTGGAGATGCTCCAATG
SBEIIa-A`2	GATGGCACTGATACACATTACTTCCACGGTGGTCCACGTGGCCACAATT	CATAGCAATTATTCAGTGCCCT
SBEIIa-B`1	CTGGAGCGCATGTACGTCTTAAC	CACCATAATCATCCTGAAAAGATC

3.9 Metodi per la determinazione delle proprietà chimico fisiche dell'amido

3.9.1 Isolamento e purificazione dell'amido

3.9.1.1 Dough Method

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

La metodica consiste di cinque fasi:

- 1) Formazione dell'impasto a partire dallo sfarinato (60% circa di acqua).
- 2) Separazione dell'amido dal glutine attraverso ripetuti lavaggi in fase acquosa dell'impasto.
- 3) Sedimentazione dell'amido attraverso ripetuti passaggi di centrifugazione.
- 4) Eliminazione dello strato superficiale di colore grigio-giallo.
- 5) Essiccamento all'aria dell'amido isolato.

3.9.1.2 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 13,000 rpm

eliminando il surnatante. Al pellet sono stati aggiunti, per due volte, 300 µl di H₂O, il tutto è stato mescolato in modo da rompere tutti gli eventuali grumi, e lasciato sedimentare per un minuto. I granuli d'amido così portati in sospensione sono stati stratificati su 1 ml di NaCl 5 M (Mohammadkani *et al.*, 1999), centrifugati per cinque minuti a 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 pH6. 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.

3.9.2 Determinazione dell'amilosio

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

Estrazione dei lipidi

15 mg di amido purificato di ciascun campione (in tre repliche) sono stati immersi in una soluzione acquosa all'85% di metanolo e tenuti in un bagnetto alla temperatura di 60°C per 30 min; i campioni sono stati vortexati ad intervalli di tempo di 5 min per favorire la solubilizzazione di lipidi. I campioni sono stati centrifugati, in tubi di vetro pyrex, a 2500x g. Il solvente è stato rimosso delicatamente utilizzando una pipetta da 1ml; alla fine è stata utilizzata una siringa da 1ml con ago facendo attenzione a non toccare il pellet di amido presente sul fondo. I campioni sono stati asciugati all'aria.

Solubilizzazione dell'amido.

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

Determinazione dell'amilosio

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

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

Retta di taratura

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

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

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

% Amilosio totale	Volume amilosio (µl)	Volume waxy(µl)	H2O
0	0	0	100
0	0	100	0
20	20	80	0
40	40	60	0
60	60	40	0
80	80	20	0

3.9.3 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. Per i campioni di amido è stata preparata una sospensione acquosa al 10 % di amido (peso secco) per un peso totale di 25 g.

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. 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 RVU.

3.9.4 Misura del contenuto di β -glucani

La misura dei β -glucani è stata effettuata secondo le istruzioni riportate nell'apposito Kit Megazyme (K-BGLU 04/06).

3.9.5 Calorimetria differenziale a scansione differenziale

Le analisi di calorimetria sono state effettuate in triplicato sui campioni di amido precedentemente isolati. L'amido (5 mg) è stato accuratamente pesato in capsule di alluminio e miscelato con H₂O in un rapporto 1:2 (w/w). Le capsule sono state chiuse ermeticamente e riscaldate da 25°C a 120°C alla velocità di 4°C/min utilizzando un Seiko DSC 120 (Kawasaki Kanagawa, Japan). Una capsula contenente sabbia è stata utilizzata come riferimento. I valori di temperatura di gelatinizzazione iniziale (T_o), di picco (T_p) and finale (T_c), gli intervalli ($T_c - T_o$), e i valori di entalpia (ΔH_g) e (ΔH_{AML}) sono stati determinati con Seiko software.

3.9.6 Analisi delle proteine legate ai granuli d'amido

3.9.6.1 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 μ l 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 μ l (HOEFER SE 600) o 20 μ l (Mini-Protean III) di surnatante.

3.9.6.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS

Le proteine SGP sono state analizzate mediante SDS-PAGE secondo il metodo di Laemmli (1970). Composizione del "gel di corsa": $T = 8$; $C = 0.44$; 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 2% *N, N, N', N'*-tetrametiletildiamina (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 è stato utilizzato il sistema Mini-Protean III (Bio-Rad). 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. Per la colorazione dei gel è stato utilizzato il metodo che impiega il nitrato d'argento (Silver staining, Bio-Rad).

RISULTATI

4 RISULTATI

4.1 Isolamento dei geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* da *Triticum aestivum*

I due geni omeologhi *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* sono stati isolati dal DNA genomico di *T. aestivum*, cv *Chinese Spring*, attraverso una strategia basata sulla tecnica di PCR.

Disegno di coppie di oligonucleotidi genoma-gene specifici-Una ricerca nella Banca Dati di NCBI, effettuata attraverso l'applicazione Blast-Search, ha permesso l'individuazione di tre sequenze genomiche, isolate da frumento tenero (cv. Chinese Spring), corrispondenti alla regione compresa tra l'esone IX e l'esone XII dei tre omeologhi *SBEIIa-A* (n° acc. EU24966), *SBEIIa-B* (n° acc. EU24967), *SBEIIa-D* (n° acc. EU24968) (Konovalov *et al.*, 2008). Le tre sequenze geniche sono state sottoposte ad allineamento attraverso il programma ClustalW, al fine di individuare regioni caratterizzate da un livello di polimorfismo inter-sequenza sufficiente per il disegno di oligonucleotidi genoma specifici (Fig. 4.1). Sono stati disegnati due oligonucleotidi localizzati nella regione tra l'esone IX e l'esone XII, specifici per l'allele del genoma A (*SBEIIa-A-F* e *SBEIIa-A-R*) e due specifici per l'allele del genoma B (*SBEIIa-B-F* e *SBEIIa-B-R*). La sequenza genomica di *SBEIIa-DA1* di *Ae. tauschii*, anch'essa presente in Banca Dati (n° acc. AF338431), è stata utilizzata per lo sviluppo di due oligonucleotidi localizzati nella regione 5'UTR e 3'UTR del gene (*SBEIIa-1F* e *SBEIIa-1R*).

La strategia utilizzata per l'isolamento dei due alleli è schematizzata in figura 4.2. Ciascun gene è stato isolato attraverso la produzione di due frammenti PCR sovrapposti, dalla cui unione risulta l'intera sequenza genomica compresa tra l'ATG e il codone di stop. Non sono state isolate le regioni 5' e 3' UTR complete dei geni. I frammenti 1A e 1B sono stati isolati, in due reazioni indipendenti, attraverso l'utilizzo di un oligonucleotide *forward* gene specifico (*SbeIIa-F1*), ottenuto dalla sequenza genomica di *Ae. tauschii* e posizionato a circa 100bp a monte dell'ATG, e due oligonucleotidi *reverse* omeologhi specifici (*SBEIIa-A-R1* e *SBEIIa-B-R1* rispettivamente per *SBEIIa-A* e *B*) posizionati nella regione del gene compresa tra l'esone IX e l'esone XII. I frammenti 2A e 2B sono stati amplificati da coppie di oligonucleotidi, costituite da i due oligo forward allele specifici (*SBEIIa-A-F1* e *SBEIIa-B-F1*), posizionati nella regione dei geni compresa tra l'esone IX e l'esone XII, e un singolo oligonucleotide *reverse* gene specifico posizionato a circa 100bp a valle del codone di stop. L'utilizzo di almeno un oligonucleotide allele specifico per ciascuna amplificazione ha consentito di ottenere frammenti PCR puri e corrispondenti ad un singolo allele *SBEIIa*.

```

EU24967      CACACGGTGCATTCACGTGACAACCTCGA TTTATTTTCTAATGTC TT CATA----- 172
EU24968      TACATGGTGCATTCACGTGACAACCTCGA TTTATTTTCTAATGTC TT CATA----- 172
EU24966      AACATGGTGCATTCACGTGACAACCTCGA TTTATTTTCTAATGTTAT TGC AATAGCTCG 180
              ***  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

EU24967      -----TTGGAAATGCAC 185
EU24968      -----TTGGCAAGTGCAA 185
EU24966      GTATAATGTAACCATGTTACTAGCTTAAGATGGTTAGGGTTCCCACTTAGGATGTATGA 240
              ****  ****

EU24967      AACTTTGCTT---CCCTTTGTCTGATCGTTTTTTTGTCTC-----TAAGA----- 228
EU24968      AACTTTGCTT---CCCTTTGTCTGCTGTTCCTTTTGTCTCT---GTAAGA----- 231
EU24966      AATATCGCATTGAGCATCTCCAGCAAGCATT TTT TTTGACGGTTAACAGCAGGAGCTCT 300
              ***  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

EU24967      --TTTCCATTGCATTTCGAGGTAGCGG--GCATG---TGAA---AGTCGAATCTGAATATT 279
EU24968      --TTTCCATTGCATTTCGAGGCACTGG--GCATG---TGAA---AGTCATATCTAATTTT 282
EU24966      GCTTTTCATTATAGAGAGGAAATGCTGTACAGACTGAAGTCAGTCAGAGCAAGTAAC 360
              ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

EU24967      TT-----TT-GT-----CAGAGCACA----- 294
EU24968      TT-----TTGT-----CAGAGCATA----- 298
EU24966      TTAGATC ATTTA TGGGCACCC TGCAC AGG CAG AAGG CAGGCAGGAACGATCCTCTAC 420
              **  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****
              →

EU24967      ----GTTATATT-----AAAT---GCCATTGTTGTGCAATAGCTTGGT-- 331
EU24968      ----GTTATATT-----GAAT---TCCATTGTTGTGCAATAGCTCGGT-- 334
EU24966      AGCCGTCGSAATGCCTCATCAGAGGATCC TGGCCGTTAATCATGCTCTGCGCCAGTGG 480
              **  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

EU24967      --ATAATGTA-----GCCATGTTACTAGCTTAAGA----- 359
EU24968      --ATAATGTA-----ACCATGTTACTAGCTTAAGATTCCACATT 372
EU24966      TCAGAATGCATCAACCACTGAGGTGCTTGCTCTTATTGGTAAAGGATGCAGCG GA 540
              ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

EU24967      -----AATA--TCGCAATTGGAGCA-----TCTCCAGCAAGCCATTTCCTACC 399
EU24968      AGGATGTAAGAAATA--TTCATTGGAGCA-----TCTCCAGCAAGCCATTTCCTACC 423
EU24966      CGAGCCTATTGAACAGATCCTGTTCAAGT AAGGCCGTTCTCCAGCAAGCCATTTCCTAGC 600
              ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****
              ←

```

Figura 4.1. Allineamento delle sequenze parziali EU24967, EU24966, EU24968 tramite il software ClustalW. La figura evidenzia, a titolo di esempio, la presenza di un elevato grado di polimorfismi tra le tre sequenze genomiche; le sequenze in rosso e in verde corrispondono agli oligonucleotidi genoma specifici (rispettivamente *Forward* e *Reverse*) utilizzati per l'isolamento del gene *SBEIIa-A*.

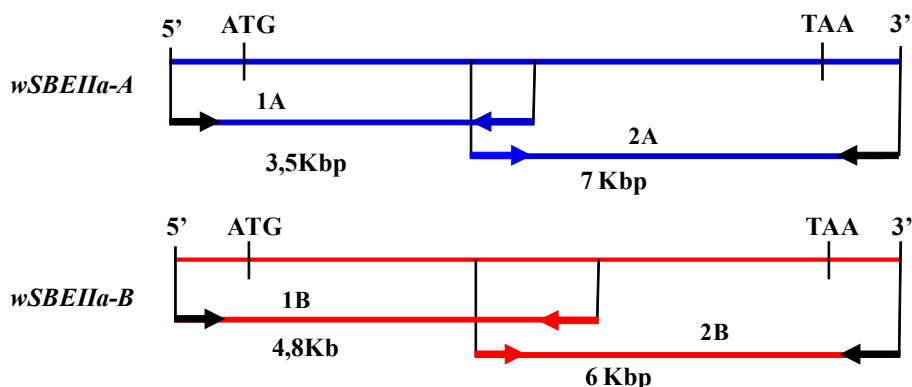


Figura 4.2. Strategia PCR utilizzata per l'isolamento dei due geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*. Le frecce in nero rappresentano gli oligonucleotidi *gene specifici* disegnati nelle regioni 5'UTR e 3' UTR della sequenza genomica di *SBEIIa-DA1* di *Ae. tauschii* (Rahman *et al.*, 2001); le frecce in rosso e in blu rappresentano gli oligonucleotidi genoma specifici rispettivamente per l'allele del genoma A e B. I due frammenti PCR, 1A e 2A, sono sovrapposti e ricoprono l'intera regione del gene *SBEIIa-A* che va dall'ATG al codone di stop. Lo stesso vale per i due frammenti 1B e 2B isolati dal l'allele *SBEIIa-B*. In figura sono riportate le dimensioni dei quattro frammenti PCR isolati.

La struttura dei due geni è stata quindi ricostruita connettendo le sequenze dei due frammenti sovrapposti 1A e 2A per l'allele *SBEIIa-A* e 1B e 2B per l'allele *SBEIIa-B*. La sequenza nucleotidica del gene *SBEIIa-B* è stata inserita in Banca dati (Gene Bank-n° acc. FM865435). La sequenza dell'allele *SBEIIa-A* è riportata in figura 4.3 La dimensione dei due omeoalleli è, rispettivamente, di 9983 bp per *SBEIIa-A* e 9927 bp per *SBEIIa-B*.

4.2 Analisi delle sequenze nucleotidiche dei due geni

La struttura dei due geni è stata determinata attraverso il confronto delle sequenze genomiche dei due alleli *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* con le sequenze di cDNA del gene *SBEIIa*, disponibili in Banca Dati (n° acc. U66376; n° acc. Y11282). La struttura dei due geni è risultata identica a quella di *SBEIIa-DAI* isolato da *Ae. tauschii*. I due geni hanno una dimensione dell'ordine di 10Kb e sono costituiti da XXII esoni di dimensioni comprese tra 43 bp dell'esone V e 242 bp dell'esone III (Tab.4.1).

Tabella 4.1. Descrizione delle dimensioni degli esoni nei geni *SBEIIa*.

Esone	<i>SBEIIa-A</i>	<i>SBEIIa-B</i>	<i>SBEIIa-DAI</i>
I	142	142	133
II	97	101	98
III	242	242	242
IV	99	99	99
V	43	43	43
VI	60	60	60
VII	81	81	81
VIII	117	117	177
IX	84	84	84
X	122	122	122
XI	122	120	120
XII	130	130	130
XIII	111	111	111
XIV	129	129	129
XV	104	104	104
XVI	145	145	145
XVII	148	148	148
XVIII	101	101	101
IX	78	78	78
XX	156	156	156
XXI	75	75	75
XXII	81	81	81

Figura 4.3. Sequenza nucleotidica del gene *SBEIIa-A*. In celeste sono evidenziati gli esoni, in rosso i siti di *splicing* del gene e il codone di stop.

Gli introni hanno dimensioni comprese tra 87 bp dell'introne XXI a 870bp dell'introne XI. Le sequenze dei due geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* isolati da *T. aestivum* e il gene *SBEIIa-DA1* da *Ae. tauschii* sono state comparate per allineamento utilizzando ClustalW. Le percentuali riscontrate hanno evidenziato una similarità del 91% tra gli alleli del sub genoma A di *T. aestivum* e del genoma D di *Ae. tauschii* rispetto al 90% ottenuto dall'allineamento di *SBEIIa-A/B* e *SBEIIa-B/D*.

Una tendenza simile è stata registrata dall'analisi di comparazione tra le sequenze di cDNA dedotte dai tre omeoalleli: in questo caso il livello di similarità minore è derivato dal confronto tra l'allele del genoma B e quello del genoma D (97%); gli alleli *SBEIIa-A/SBEIIa-D* e *SBEIIa-A/SBEIIa-B* condividono il 98% di similarità. Le differenze tra le sequenze di cDNA dedotte dei tre omeologhi sono rappresentate maggiormente da sostituzioni a singolo nucleotide (SNP). In tutti le posizioni nucleotidiche polimorfiche, soltanto uno dei tre alleli presenta la sostituzione nucleotidica: 26, 25 e 21 SNP sono stati individuati, rispettivamente, negli omeologhi del genoma D, A e B. Oltre alle sostituzioni nucleotidiche sono presenti alcuni polimorfismi costituiti da inserzioni e delezioni (*indel*). Due delezione di 3 e 9 nucleotidi sono presenti in posizione 45 e 58 del cDNA del gene di *Ae. tauschii*; una delezione di 3 bp e una inserzione di 3 bp, rispettivamente in posizione 67 e 213, del cDNA di *SBEIIa-B*. Tutte le *indel* evidenziate nei cDNA dei tre alleli sono posizionate nella regione codificante per il peptide segnale (*transit peptide*); fa eccezione la tripletta GCC in posizione 213 dell'allele B. La stessa inserzione è stata trovata in un'altra sequenza presente in° acc. BT008928), che condivide il 99% di similarità con la sequenza cDNA di *SBEIIa-B*; le divergenze tra le due sequenze sono dovute esclusivamente a singole sostituzioni nucleotidiche.

Le *indel* presenti nelle regioni introniche hanno dimensione comprese in un intervallo da uno ad alcune centinaia di nucleotidi. Ciascuna inserzione, con dimensioni apprezzabili (>10 nt), è stata sottoposta ad un'analisi di comparazione con le sequenze presenti in Banca Dati (NCBI) attraverso l'applicazione BLAST-Search.

Un'inserzione di 116 bp, posizionata in corrispondenza dell'introne XIV del gene *SBEIIa-B*, ha mostrato un elevato grado di similarità (95% con una *Query Coverage* 98%) ad un elemento trasponibile di tipo MITE (*Minature Inverted Repeat Element*) appartenete alla famiglia *Stowaway*.

L'inserzione presenta la sequenza TIR (*Terminal Inverted Repeat*) caratteristica della famiglia *Stowaway*. Elementi MITE sono stati ritrovati in tutti i maggiori cereali; in frumento, elementi *Stowaway* sono stati precedentemente individuati in alcuni *loci* del genoma B, come nel locus *GLU-1* (Ragupathy *et al.*, 2008). Gli elementi MITE sono caratterizzati dalla presenza di sequenze TIR di dimensioni 10-15 bp, hanno dimensioni comprese tra 100 e 500 bp e si inseriscono in siti ricchi in A e T.

Un'ulteriore inserzione di 90 bp, individuata nell'introne XV dello stesso gene, ha mostrato una percentuale di similarità del 96% (*query coverage* 94%) con un elemento trasponibile del tipo MITE.

È stato inoltre individuato un ulteriore elemento di tipo MITE-*Stowaway* in un'inserzione dell'introne XVI del gene *SBEIIa-DA1* di *Ae. tauschii*. L'inserzione di 150 bp ha mostrato un'identità del 91% (*Query coverage* 100%) con un elemento MITE già ritrovato all'interno della sequenza genomica di *T. aestivum* (n° acc. GQ169689) (Fig. 4.4). Un'inserzione di 130bp localizzata nell'introne XI dello stesso allele ha mostrato una similarità dell'81% con un elemento invertito di tipo 1 già ritrovato nel genoma di *T. monococcum* (n° acc. AY485644).

```

A  TAACTTATGCAGAAAGTCATGATCAAGCACTAGTTGGTGACAAGACTATTGCATTCTGGT 7405
D  TAACTTATGCAGAAAGTCATGATCAAGCACTAGTTGGTGACAAGACTATTGCATTCTGGT 7322
B  TCACTTATGCAGAAAGTCATGATCAAGCACTAGTTGGTGACAAGACTATTGCATTCTGGT 7474
  * *****

A  TGATGGATAAGGTACTAGCTGTTACTTTTGGACAAAAGAAT----- 7447
D  TGATGGATAAGGTACTAGCTGTTACTTTTGGACAAAAGAATTCTCCCTCCGTTCCTAAA 7382
B  TGATGGATAAGGTACTAGCTGTTACTTTTGGATCAAAAAGAAT----- 7516
  *****      ***  *  *

A  -----
D  TATAAGTCTTTGTAGAGATTCCACTATGGACCACATAGTATATAGATGCATTTTAGAGTG 7442
B  -----

A  -----
D  TAGATTCACTCATTTTGCTTCGTATGTAAGTCCATAGTGAAATCTCTACAGAGACTTATAT 7502
B  -----

A  -----TACACAATTGATTTGTCTCATCAGATTGCTAGTGTTTTCTTG TG 7491
D  TTAGGAACGGAGGGAGTACATAATTGATTTGTCTCATCAGATTGCTAGTGTTTTCTTG TG 7562
B  -----CACATAA--GATTTGTCTCATCAGATTGCTCATGTTTTCTTG TG 7558
  ***  *  *****

```

Figura 4.4. Inserzione nell'introne XVI gene *SBEIIa-DA1* di un elemento di tipo MITE.

È stata inoltre confermata la presenza di un'inserzione nell'introne IX del gene *SBEIIa-A* risultata simile al gene di frumento U3 snRNA (RNA nucleari ricchi in U coinvolti nel meccanismo di *splicing*) (Genbank n° acc. X63065; 91% similarità su 207 bp) (Konovalov *et al.*, 2008). La sequenza dello pseudogene presenta orientazione invertita, corrisponde al snRNA processato, è fiancheggiata da duplicazioni di 17 bp e contiene code poli-T all'estremità 5'. Queste caratteristiche hanno suggerito che l'inserzione del gene possa essere avvenuta per mediazione di elementi retrotrasponibili di tipo L1 (LINE1). Non sono state riscontrate omologie di sequenza con elementi trasponibili per le altre *indel* individuate nei tre omeoalleli.

4.3 Caratterizzazione di una inserzione *U3-snRNA gene like* in *SBEIIa-A*

La comparazione dei tre omeoalleli con una sequenza di *T. monococcum*, corrispondente alla regione compresa tra l'esone IX e XII del gene *SBEIIa* (n° acc.. EU24969.1), ha rilevato la presenza di una delezione di 56 nucleotidi nell'introne IX di *T. monococcum* (fig.4.5). La delezione è localizzata in corrispondenza della regione 3' dello pseudogene U3 snRNA (introne IX) e si estende alla regione intronica adiacente.

EU242691.1	attgcctccatcagaggaatcctggctgttaatcatgctctggcccagtggtcagaatgc	489
SBEIIa-A	attgcctccatcagaggaatcctggcgttaatcatgctctggcccagtggtcagaatgc	540
EU242691.1	atcaaccagactgaggtgcttgccctccttattggtaaaggatgcagcggtagcagcctat	549
SBEIIa-A	atcaaccagactgaggtgctcgccctccttattggtaaaggatgcagcggtagcagcctat	600
EU242691.1	tgaacagatcctgttcaagtaaggccgttctccagc-----	585
SBEIIa-A	tgaacagatcctgttcaagtaaggccgttctccagcaagccatttcctagcttattaatg	660
EU242691.1	-----gagcaattcaaaaacttccattgttctg	613
SBEIIa-A	agagagagagagggggggggtctgtattctgcgagcaattcaaaaacttccattgttctg	720
EU242691.1	aggtgtacgcattgttagggatctcccattatgaagaggatatagttaattcctttgtaacc	673
SBEIIa-A	aggtgtacgcattgttagggatctcccattatgaagaggatatagttaattcctttgtaacc	780
EU242691.1	tacttggaaacttgagtcttgcggcatcgccaatatattctatcatcacaatacttagag	733
SBEIIa-A	tacttggaaacttgagtcttgcggcatcgctaatatattctatcatcacaatacttagag	840
EU242691.1	gatgcatctgaatatatttttagtgggatcttgcacaggaaccgaagataaattcatatgcta	793
SBEIIa-A	gatgcatctgaatatatttttagtgggatcttgcacaggaaccgaagataaattcatatgcta	900

Figura 4.5. Allineamento delle sequenza EU242691.1 di *T. monococcum* e *SBEIIa-A* di *Triticum aestivum*. In grigio è evidenziata la sequenza dell'esone X; la figura evidenzia la presenza di una delezione di 56 bp nell'introne IX di *T. monococcum*.

È stato allestito un esperimento di PCR al fine di studiare il polimorfismo individuato, in diverse accessioni di frumenti coltivati, selvatici e progenitori.

Una coppia di oligonucleotidi (A^m -F/ A^m -R), specifici per il genoma A, è stata utilizzata per amplificare una porzione del gene di circa 500 bp posizionata a cavallo della regione corrispondente alla delezione di 56 bp di *T. monococcum*. Il frammento PCR di interesse è stato isolato dal DNA genomico dei seguenti frumenti: *T. aestivum* (A^uA^u), *T. turgidum* (A^uA^u), *T. urartu* (A^uA^u), *T. boeoticum* (A^mA^m), *T. monococcum* (A^mA^m), *T. dicoccoides* (A^uA^u), *T. dicoccum* (A^uA^u), *T. araraticum* (A^uA^u) e *T. timophevi* (A^uA^u) (Fig. 4.6).

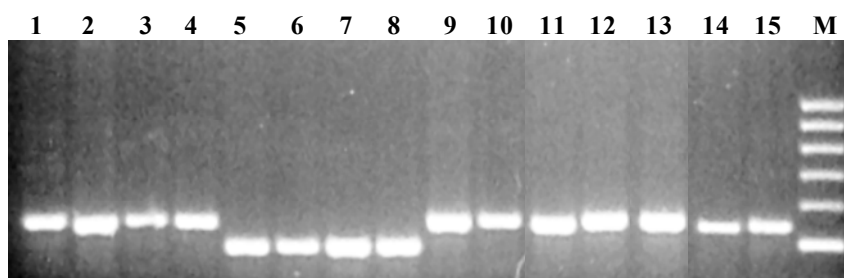


Figura 4.6. Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei frammenti PCR (A^m -f/ A^m -r). 1) *T. aestivum*, Chinese Spring; 2) *T. turgidum*, Langdon; 3-4) *T. urartu* a e b; 5-6) *T. boeoticum* a e b; 7-8) *T. monococcum* a e b; 9-10) *T. dicoccoides* a e b; 11-13) *T. dicoccum* a, b, c; 14) *T. araraticum* a; (15) *T. timophevii* a. Le accessioni utilizzate sono riportate nella sezione Materiali e Metodi (Cap. 3). a, b, e c indicano il riferimento delle accessioni utilizzate.

L'analisi elettroforetica dei frammenti PCR ha evidenziato la presenza di un polimorfismo tra le bande del gruppo costituito da *T. urartu* e i frumenti poliploidi, e il gruppo di *T. boeoticum* e *monococcum*: per quest'ultimo gruppo è stata ottenuta una banda di dimensioni inferiori (circa 450 bp) rispetto al frammento di 500 nucleotidi isolato per il primo gruppo. Questi dati confermano l'assenza dell'inserzione di 56 bp in *T. monococcum* e *boeoticum* caratterizzati dal genoma $A^m A^m$. La presenza dell'inserzione in *T. urartu*, nei frumenti tetraploidi selvatici e coltivati e in *aestivum* suggerisce che l'inserzione derivi dal progenitore del genoma A.

4.4 Caratterizzazione di un inserzione *transposon-like* in *SBEIIa-B*

La regione del gene *SBEIIa*, corrispondente all'inserzione *transposon-like* nell'introne XIV dell'allele *SBEIIa-B* (Fig. 4.7), è stata analizzata, attraverso un approccio di PCR, in diverse accessioni di *Aegilops* sezione *Sitopsis* e nei maggiori frumenti poliploidi selvatici e coltivati.

È stata utilizzata una coppia di oligonucleotidi ($SBEIIa^{(XIV)}F$ / $SBEIIa^{(XIV)}R$) in grado di amplificare la regione polimorfica nei due alleli *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*. Le dimensioni attese per i due frammenti omeologhi sono 320 bp e 440 bp rispettivamente per gli alleli del genoma A e B.

L'analisi su gel d'agarosio degli ampliconi prodotti (Fig. 4.8) ha evidenziato la presenza della banda di 440 bp, corrispondente alla sequenza del genoma B contenente l'inserzione dell'elemento MITE, in *T. araraticum*, *T. timophevii*, *T. dicoccum* e in *T. aestivum*. I quattro frumenti diploidi con genoma SS presentano un'unica banda di mobilità di poco superiore alla banda di 316 bp del genoma A; una banda di mobilità simile è presente sia in *Langdon* che nel selvatico *T. dicoccoides*.

SBEIIa-B	AAGTGCTTACAGTATTATGTTTTTA.....GTA.TTTTATTTGGGGATCAGCTGTACTACTCTTTTGTTA.GGGTAAATCTGCTCTTC	89
SBEIIa-A	AAGTGCTTACAGTATTATGTTTTTAACCACTTAAGTACTTTTATTTT.GGGATCAGGCTGT...TACTCTTTTGTTAGGGTAAATCTCTCTTTTC	96
SBEIIa-D	AAGTGCTTACAGTATTATGTTTTTAACCTTAAGTACTTTTATTTTGGGGATCAGCTGT...TACACTTTTGTTAGGGTAAATCTCTCTTTTC	97
SBEIIa-B	ATAA GAATGCTAATTTA TCCCTCCGTCTGGA TACTTGTCGGAGGAATGAATGTATCTAGACGTATTTAGTTCTAGATACATCCATT TTTATGCA	189
SBEIIa-A	ATAA CAATGCTAATTTA	113
SBEIIa-D	ATAA CAATGCTAATTTA	114
SBEIIa-B	TTTCTCCGTCAAGTATTTCCGGACGGAGGAC TACCTTGATGCTAATGCATCAGTAGGTAA TTTGCAAGTGCAAGG CATTCAGCTCA CAGCATA	289
SBEIIa-A	 TACCTTGATGCTAATGCATCAGTAGGTAA TTTGCAAGTGCAAGG CATTCAGCTCA CAGCATA	181
SBEIIa-D	 TACCTTGATGCTAATGCATCAGTAGGTAA TTTGCAAGTGCAAGG CATTCAGCTCA CAGCATA	182
SBEIIa-B	TTTCTTGATGGCTGTAATTTATTGATAGTATGCTTGTTGGATTTTTCAGTAAGCTG GAGTG TGTGA CTAATGTTATATTATTATTACT TGCGGAAC	389
SBEIIa-A	TTTCTTGATGGCTGTAATTTATTGATAGTATGCTTGTTGGCTTTTTCAGTAAGCTG GAGTG TGTGA CTAATGTTATATTATTATTACT TGCGGAAC	264
SBEIIa-D	TTTCTTGATGGCTGTAATTTATTGATAGTATGCTTGTTGGCTTTTTCAGTAAGCTG GAGTG TGTGA CTAATGTTATATTATTATTACT TGCGGAAC	282
SBEIIa-B	AAAT GGGCAACCTTGCTCAATTGCTTCAGAAGC TAACCTTAGATTCCTAATAAGCTGTG GAAAT GAGAGGCTATTCCCAAGGACAC CAATTA TACGTCAG	489
SBEIIa-A	AAAT GGGCAACCTTGCTCAATTGCTTCAGAAGC TAACCTTAGATTCCTAATAAGCTGTG GAAAT GAGAGGCTATTCCCAAGGACAC CAATTA TACGTCAG	364
SBEIIa-D	AAAT GGGCAACCTTGCTCAATTGCTTCAGAAGC TAACCTTAGATTCCTAATAAGCTGTG GAAAT GAGAGGCTATTCCCAAGGACAC CAATTA TACGTCAG	381
SBEIIa-B	TGTGTTACGACATGATTTGTAA CAGCAAGAG CAACATGGTTTAACTTAAATTCCTGCACCTGCTATGGAATCTCACTGTATGTTGTAGTG TACGCATC	589
SBEIIa-A	TGTGTTCTGACATGATTTGTAA CAGCAAGAG CAACATGGTTTAACTTAAATTCCTGCACCTGCTATGGAATCTCACTGTATGTTGTAGTG TACGCATC	463
SBEIIa-D	TGTGTTCTGACATGATTTGTAA CAGCAAGAG CAACATGGTTTAACTTAAATTCCTGCACCTGCTATGGAATCTCACTGTATGTTGTAGTG TACGCATC	470
SBEIIa-B	CACAACAAGTAATCCTGAGCTTTCAACTCAGAGAAAATAGAGCTTCCACTTCTGCCAGCA TTA CTGTTTCACAGTTCTAATTTGTGTAA CTGTGAAA	689
SBEIIa-A	CACAACAAGTAATCCTGAGCTTTCAACTCAGAGAAAATAGAGCTTCCACTTCTGCCAGCA TTA CTGTTTCACAGTTCTAATTTGTGTAA CTGTGAAA	563
SBEIIa-D	CACAACAAGTAATCCTGAGCTTTCAACTCAGAGAAAATAGAGCTTCCACTTCTGCCAGCA TTA CTGTTTCACAGTTCTAATTTGTGTAA CTGTGAAA	569

Figura 4.7. Allineamento delle sequenze dell'introne XIV dei tre omeoalleli *SBEIIa*. L'inserzione nell'allele *SBEIIa-B* corrisponde alla sequenza di 116 bp *transposon like*. Nel riquadro in rosso è contenuta la sequenza TIR caratteristica dell'elemento trasponibile.

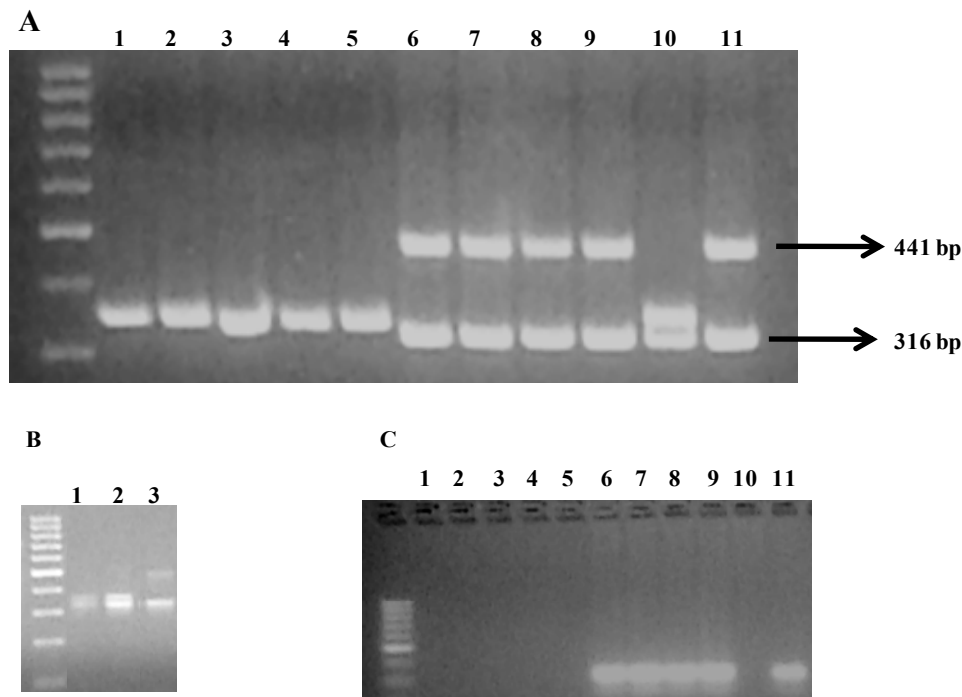


Figura 4.8. Analisi elettroforetica dei frammenti PCR rispettivamente ottenuti dalle coppie di oligonucleotidi: A) *SBEIIa*^(XIV)F / *SBEIIa*^(XIV)R e C) *SBEIIa*^(XIV)F / *B*^{XIV}R: i frammenti sono stati amplificati dal DNA genomico di 1 e 2) *T. speltoides* a e b; 3) *T. searsii*; 4) *T. sharonensis*; 5) *T. longissima*; 6 e 7) *T. araraticum* a e b; 8 e 9) *T. timophevi* a e b; (10) *T. turgidum* LDN; 11) *T. aestivum*. In B) frammenti PCR *SBEIIa*^(XIV)F / *SBEIIa*^(XIV)R per: 1 e 2) *T. dicoccoides* a e b; 3) *T. dicoccum*. I materiali usati sono descritti nel capitolo 3.

I due frammenti amplificati da *T. dicoccoides* e *T. turgidum* sono stati sequenziati: il frammento di dimensioni minore è risultato identico alla regione corrispondente dell'allele *SBEIIa-A* di *T. aestivum*; la banda superiore corrisponde al frammento isolato dal genoma B. L'analisi della sequenza nucleotidica della banda superiore ha evidenziato l'assenza dell'inserzione di 116 bp corrispondente all'elemento trasponibile di tipo MITE (Fig. 4.9). Al contrario il sequenziamento della banda di 440 bp dei due frumenti *T. timophevi* e *T. araraticum* ha confermato la presenza dell'inserzione MITE. Nella figura 4.8 C è riportata l'analisi elettroforetica dei prodotti PCR ottenuti utilizzando una coppia di oligonucleotidi specifici per il genoma B (B^{XIV} F/ B^{XIV} R) e in grado di amplificare la regione comprendente l'inserzione *transposon like*: è stato ottenuto un prodotto di amplificazione solo per i frumenti *araraticum*, *timophevi* e *aestivum*. Questo esperimento conferma i risultati ottenuti nel primo esperimento di PCR.

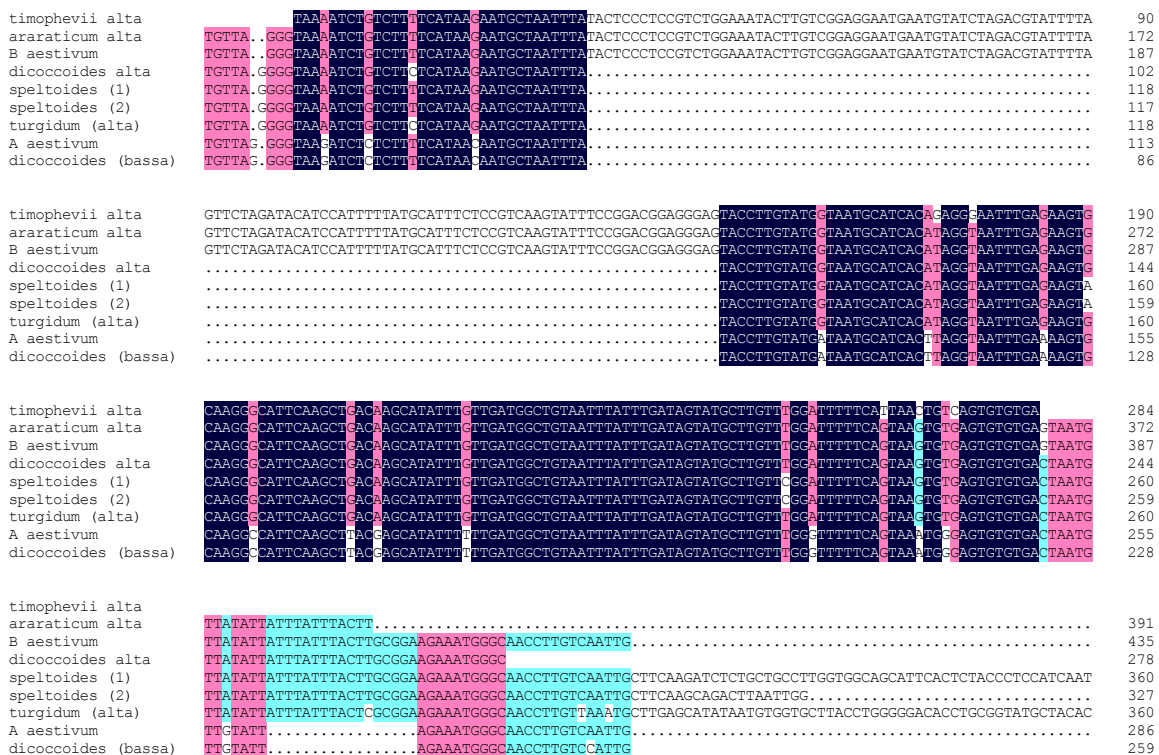


Figura 4.9. Allineamento delle sequenze dei frammenti PCR ottenuti utilizzando la coppia di oligonucleotidi $SBEIIa^{(XIV)}$ F / $SBEIIa^{(XIV)}$ R dal DNA genomico di *T. dicoccoides* (gen. A e B), *T. turgidum* (gen. B), *T. aestivum* (gen. A e B), *T. araraticum* (gen. G); *T. timophevi* (gen. G).

4.5 Proteine SBEIIa

L'analisi delle sequenze amminoacidiche dedotte dei geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* ha rilevato che i due geni codificano per un precursore della proteina SBEIIa costituito da un peptide segnale e dalla forma matura della proteina. Attraverso il confronto delle sequenze amminoacidiche dedotte dei due geni con la sequenza N-terminale dell'enzima SBEIIa (Morell *et al.*, 1997; Nair *et al.*, 1997) è stato possibile identificare le regioni codificanti per il peptide segnale di 162 bp e 159 bp, e le regioni codificanti per la proteina matura di 2313 bp e 2310 bp, rispettivamente per i geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*.

I due geni *SBEIIa* codificano per una proteina (sequenza dedotta) di 823 aa. Le sequenze del peptide segnale consistono di 54 aa sia per *SBEIIa-A* e *SBEIIa-DAI* e di 53 aa per *SBEIIa-B*.

Il gene *SBEIIa-A* codifica per una proteina matura di 769 aa come già trovato da Nair *et al.* (1997); *wSBEIIa-B* codifica per un polipeptide maturo di 770 aa dovuto all'inserzione di una treonina in posizione 74 (sequenza non matura). La presenza di questa inserzione nell'allele del genoma B è stata confermata nel cDNA isolato da frumento tenero già presente in Banca Dati (n° acc. BT008928). L'analisi della sequenza proteica con l'applicazione di NCBI *Conserved Domain Search Service* ha portato all'identificazione di tre domini conservati principali corrispondenti al dominio N-terminale degli enzimi *Glycogen Branching*, e rispettivamente il dominio catalitico e il dominio C-terminale (*all-beta domain*) delle α -amilasi (Fig. 4.10).

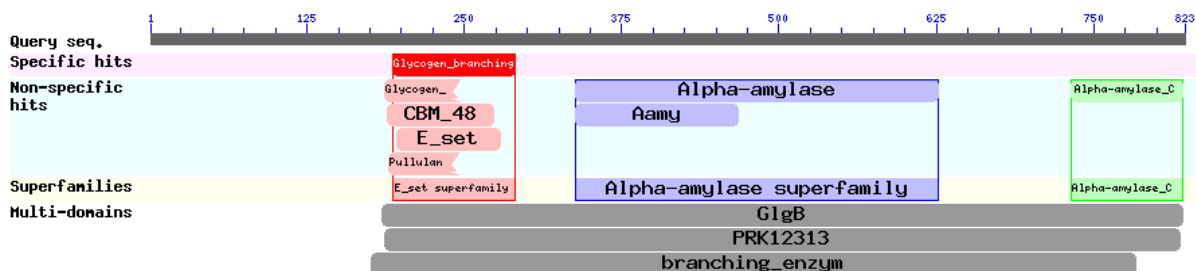


Figura 4.10. Rappresentazione dei tre domini catalitici identificati per le proteine SBEIIa.

L'analisi delle sequenze amminoacidiche dei due geni neocaratterizzati ha portato all'individuazione dei quattro domini caratteristici degli enzimi amilasici e mostrati in figura 4.11 (Buisson *et al.*, 1987). Inoltre è stata riscontrata la presenza di una quinta regione che rappresenta un dominio caratteristico degli enzimi SBEII.

SBEIIa-A	MATFAVSGATLGVARPAGAGGGLPRSGSERRGGVDLP SLLLRKKDSSRAVLSRA ASPGK 60
SBEIIa-B	MATFAVSGATLGVARPASAGGG-LLRSGSERRGGVDLP SLLLRKKDSSRAVLSRA ASPGK 59
SBEIIa-A	VLVPDGESDDLAS-PAQPEELQIPEDIEEQTAEVNMTGGTAEKLESSEPTQGIVETITDG 119
SBEIIa-B	VLVPDGESDDLAA T PAQPEELQIPEDIEEQTAEVNMTGGTAEKLQYSEPTQGIVETITDG 119
SBEIIa-A	VTKGVKELVVGEKPRVVPKPGDGQKIYEIDPTLKDFRSHLDYRYSEYRRIRAAIDQHEGG 179
SBEIIa-B	VTKGVKELVVGEKPRVVPKPGDGQKIYEIDPTLKDFRSHLDYRYSEYKRIRAAIDQHEGG 179
SBEIIa-A	LEAFSRGYEKLGFTRSAEGITYREWAPGAHSAALVGDFNNWNPADTMTRDDYGVWEIFL 239
SBEIIa-B	LEAFSRGYEKLGFTRSAEGITYREWAPGAHSAALVGDFNNWNPADTMTRDDYGVWEIFL 239
SBEIIa-A	PNNADGSPAIPHGSRVKIRMDTPSGVKDSISAWIKFSVQAPGEIPFNGIYYDPPEEEKYV 299
SBEIIa-B	PNNADGSPAIPHGSRVKIRMDTPSGVKDSISAWIKFSVQAPGEIPFNGIYYDPPEEEKYV 299
SBEIIa-A	FQHPQPKRPESLRIYESHIGMSSPEPKINSYANFRDEVLPRIKRLGYNAVQIMAIQEHYSY 359
SBEIIa-B	FQHPQPKRPESLRIYESHIGMSSPEPKINSYANFRDGVLPRIKRLGYNAVQIMAIQEHYSY 359
SBEIIa-A	YASFGYHVTNFFAPSSRFGTPEDLKS L IDRAHELGLLV MDIVHSH SSNNTLDGLNGFDG 419
SBEIIa-B	YASFGYHVTNFFAPSSRFGTPEDLKS L IDRAHELGLLV MDIVHSH SSNNTLDGLNGFDG 419
SBEIIa-A	TDTHYFHGGPRGHHWWD SRLFN YGSWEVLRFLLSNARWWLEEYKFDGFRFDGVTSMMYT 479
SBEIIa-B	TDTHYFHGGPRGHHWWD SRLFN YGSWEVLRFLLSNARWWLEEYKFDGFRFDGVTSMMYT 479
SBEIIa-A	HHGLQMTFTGNYGEYFGFATD VDAV YLMVLVNDLIHGLYPDAVSIGEDVSGMPTFCIPVP 539
SBEIIa-B	HHGLQMTFTGNYGEYFGFATD VDAV YLMVLVNDLIHGLYPDAVSIGEDVSGMPTFCIPVP 539
SBEIIa-A	DGGVGFDYRLHMAVADKWI ELLKQ SDESWKMGDIVHTLTNRRWLEKCVTYAESHDQALVG 599
SBEIIa-B	DGGVGFDYRLHMAVADKWI ELLKQ SDESWKMGDIVHTLTNRRWLEKCVTYAESHDQALVG 599
SBEIIa-A	DKTIAFWLMDKDMYDFMALDRPSTPRIDRGIALHKMIRLVTMGLGGEGLNFMGNEFGHP 659
SBEIIa-B	DKTIAFWLMDKDMYDFMALDRPSTPRIDRGIALHKMIRLVTMGLGGEGLNFMGNEFGHP 659
SBEIIa-A	EWIDFPRG PQTLPTGKVL PGNNNSYDKCRRRFDLGDADFLRYRGMQEFDQAMQHLEEKYG 719
SBEIIa-B	EWIDFPRG PQTLPTGKVL PGNNNSYDKCRRRFDLGDADFLRYRGMQEFDQAMQHLEEKYG 719
SBEIIa-A	FMTSEHQYVSRKHEEDKVIIFERGD LVFV FNHWSNSFFDYRVGCSRPGKYKVALDSSDA 779
SBEIIa-B	FMTSEHQYVSRKHEEDKVIIFERGD LVFV FNHWSNSFFDYRVGCSRPGKYKVALDSSDA 779
SBEIIa-A	LFGGFSRLDHDVDYFTTEHPHDNRPRSFVYTPSRTAVVYALTE 823
SBEIIa-B	LFGGFSRLDHDVDYFTTEHPHDNRPRSFVYTPSRTAVVYALTE 823

Figura 4.11. Allineamento delle sequenze amminoacidiche dedotte dai due alleli *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*. Il riquadro in nero delimita la sequenza dei peptidi segnale. In rosso è evidenziata l'inserzione di una treonina in posizione 20 dell'allele del genoma B. Le regioni sottolineate corrispondono ai quattro domini catalitici degli enzimi amilasici. La quinta regione evidenziata in giallo è un dominio caratteristico degli enzimi SBEII (Buisson *et al.*, 1987).

4.6 TILLING

4.6.1 Sviluppo di coppie di oligonucleotidi allele specifici per l'analisi di TILLING

L'allineamento delle sequenze genomiche degli alleli *SBEIIa-A*, *SBEIIa-B* e *SBEIIa-DAI* ha consentito l'individuazione di regioni geniche adatte a disegnare diverse coppie di oligonucleotidi genoma specifici per i tre alleli. La specificità degli oligonucleotidi è stata testata per PCR utilizzando le linee di sostituzione cromosomica della cultivar di frumento duro *Langdon* (Joppa *et al.*, 1988). In particolare sono state utilizzate le linee di sostituzione del cromosoma 2D dove sono localizzate le tre copie omeologhe del gene *SBEIIa* di frumento tenero (Rahman *et al.*, 2001). Nella tabella sottostante è riportata la composizione cromosomica delle linee di *Langdon* utilizzate.

Tabella 4.2. Composizione cromosomica delle linee di sostituzione disomiche di *Langdon*.

	Langdon	LND D(2A)	LND 2D(2B)
Cromosoma Assente	2D	2A	2B
Genotipo	2A/2B	2D/2B	2D/2A

La figura 4.12 mostra, a titolo di esempio, l'analisi elettroforetica dei prodotti PCR ottenuti da tre coppie di oligonucleotidi ciascuna specifica per un omeologo. In totale sono state validate nove coppie di oligonucleotidi specifici per il genoma A, tre per il genoma B e sette per il genoma D (vedi Materiali e Metodi).

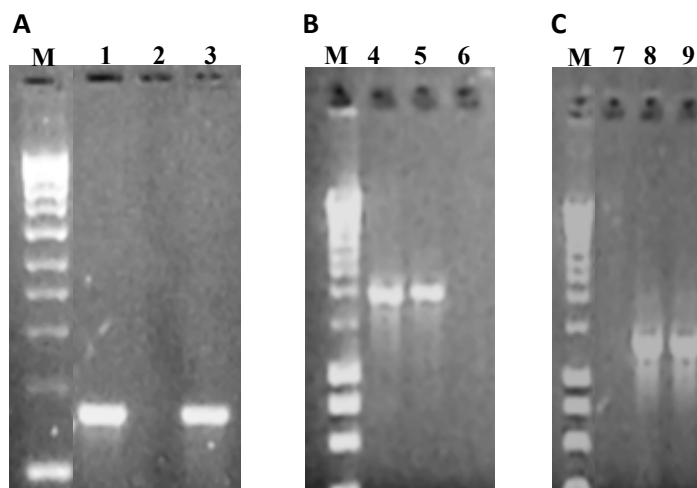


Figura 4.12. Analisi elettroforetica dei frammenti PCR isolati da *Langdon* (1, 4, 7); da LND 2D(2A) (2, 5, 8) e; da LND 2D(2B) (3, 6, 9) utilizzando coppie di oligonucleotidi genoma specifici (A) per *SBEIIa-A*; (B) per *SBEIIa-B*; e (C) per *SBEIIa-D*. Nel gel A la mancanza del prodotto PCR per LND 2D(2A) dimostra la specificità della coppia di oligonucleotidi utilizzati per l'allele *SBEIIa-A*. M indica il marker di peso molecolare 1KB.

Le sequenze degli ampliconi prodotti dalle coppie di oligonucleotidi (genoma specifici) disegnati sono state analizzate allo scopo di selezionare i *target* più adatti per l'analisi di TILLING.

Sono state selezionate le regioni geniche a più alta densità di regione codificante. In particolari i frammenti analizzati contengono da un minimo di quattro ad un massimo di sei esoni con una dimensione totale della regione codificante compresa tra 350 e 500 bp.

E' stata inoltre condotta un'analisi delle sequenze nucleotidiche al fine di individuare, in ciascun frammento, la percentuale di nucleotidi che, in seguito a trattamento con EMS, causano la formazione di una mutazione deleteria per la funzionalità della proteina. Tale analisi si è basata sulla conoscenza del tipo di transizione indotta dal trattamento con l'agente EMS (G/A, C/T). Nel calcolo di tale percentuale sono state considerate le mutazioni non senso e le mutazioni a carico dei siti di *splicing*. In tabella 4.3 è riportata la percentuale di potenziali "SNP deleteri" per ciascuno dei frammenti PCR scelti per l'analisi di TILLING. È stato inoltre stimato il numero di PCR necessario per identificare una mutazione deleteria; questo calcolo è stato effettuato per ognuna delle regioni geniche selezionate. Sono state selezionate tre coppie di oligonucleotidi per l'allele *SBEIIa-A*, una singola coppia per *SBEIIa-B* e quattro coppie per *SBEIIa-D*; in figura 4.13 è riportato uno schema delle posizioni degli oligonucleotidi selezionati all'interno della struttura genica. In ragione degli esoni contenuti e della specificità per uno di tre genomi, le regioni target sono state così nominate: A^(II-V), A^(VI-IX), A^(X-XIII), B^(IV-IX), D^(II-VI), D^(X-XII), D^(VII-IX) e D^(XVI). Il frammento D^(XVI) è risultato interessante in quanto, a fronte di una dimensione di soli 330 bp, presenta un'elevata densità di siti "potenzialmente non senso"; questo tipo di frammento risulta ideale per un'analisi di TILLING basata sull'utilizzo dell'HRM in quanto permette di ridurre notevolmente il numero degli esperimenti PCR che è necessario effettuare al fine identificare una mutazione deleteria. Le regioni D^(VII-IX) e D^(XVI), seppur considerate adatte, non sono state analizzate negli esperimenti di TILLING.

Tabella 4.3. Analisi delle sequenze nucleotidiche dei frammenti PCR omeologo-specifici da utilizzare nel TILLING. In tabella sono riportate le dimensioni dell'intero frammento (**Tot bp**); le dimensioni della regione codificante di ciascun frammento (**Reg. cod. bp**); il numero di nucleotidi presenti nel frammento che possono creare una mutazione deleteria (**Mut. Ns.+ spl.**) non senso o nel sito di *splicing*; la percentuale di potenziali mutazioni deleterie (nonsenso+*splicing*).

	A ^(II-V)	A ^(VI-IX)	A ^(X-XIII)	B ^(IV-IX)	D ^(II-VI)	D ^(X-XII)	D ^(VII-IX)	D ^(XVI)
Genoma	A	A	A	B	D	D	D	D
Tot (bp)	1717	1564	2095	1746	1986	2200	1000	329
Reg. cod. (bp)	493	358	498	500	580	498	294	148
Mut. (ns+spl.)	11+(2*4)	10+(2*4)	13+(2*4)	14+(2*6)	13+(2*5)	13+(2*4)	8+(2*3)	8+(2*1)
% Mut delet.	3,9	5,0	4,2	4,4	4,0	4,2	4,8	6,8

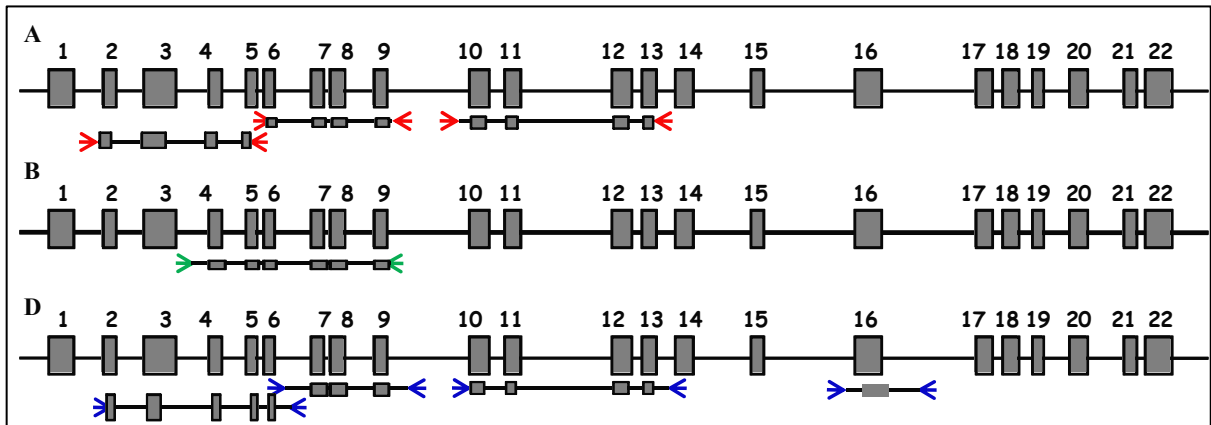


Figura 4.13. Schema dei frammenti PCR amplificati dalle coppie di oligonucleotidi genoma specifici disegnati per i tre alleli. I rettangoli in grigio rappresentano gli esoni; le regioni introniche sono rappresentate dalle linee orizzontali trasversali agli esoni. La numerazione si riferisce alla posizione degli esoni all'interno del gene. Le frecce in rosso indicano gli oligonucleotidi specifici per l'allele del genoma A; le frecce in verde e in blu indicano gli oligonucleotidi specifici, rispettivamente per *SBEIIa-B* e *SBEIIa-D*. Per l'allele A sono evidenziati i frammenti PCR: **A^(II-V)** contenente gli esoni II, III, IV, V; **A^(VI-IX)** contenente gli esoni VI, VII, VIII, IX; e **A^(X-XIII)** contenente gli esoni X, XI, XII, XIII. Per l'allele B il frammento: **B^(IV-IX)** che comprende gli esoni IV, V, VI, VII, VIII, IX. Per l'allele D i frammenti: **D^(II-VI)** che comprende gli esoni da II a VI; **D^(VII-IX)** che comprende gli esoni da VII a IX; **D^(X-XIII)** che comprende gli esoni da X a XIII; **D^(XVI)** che comprende l'esone XVI.

4.6.2 Produzione degli ampliconi per l'analisi di High Resolution Melting

Una popolazione di frumento tenero, cultivar *Cadenza*, mutagenizzata con l'agente chimico EMS (Parry *et al.*, 2009; Sestili *et al.*, 2010) è stata analizzata per l'individuazione di SNP nelle regioni target (**A^(II-V)**, **A^(VI-IX)**, **A^(X-XIII)**, **B^(IV-IX)**, **D^(II-VI)** e **D^(X-XII)**) dei tre omeoalleli *SBEIIa*. Gli ampliconi omeologo-specifici sono stati isolati da *pool* costituiti ciascuno da due genotipi della collezione di DNA genomico isolato dalle piante (M2) della popolazione mutagenizzata. L'utilizzo di *pool* composti da almeno due genotipi nel TILLING è funzionale all'individuazione degli SNP attraverso la formazione di una molecola eteroduplex tra un filamento a singola elica dell'amplicone normale e il filamento corrispondente mutante (Fig. 4.14).

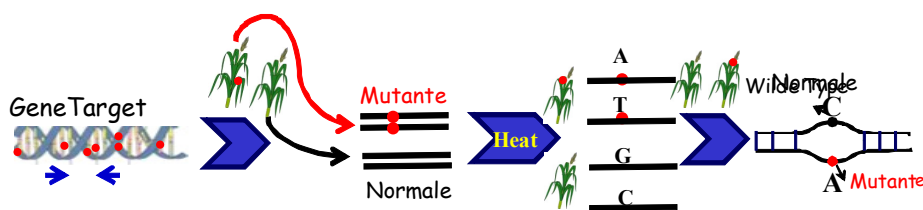


Figura 4.14. Meccanismo di formazione della molecola eteroduplex in caso di presenza di uno SNP in uno dei due genotipi presenti nel *pool*.

La tecnica utilizzata per l'individuazione degli SNP è stato l'High Resolution Melting basato sul confronto dei profili di melting degli ampliconi PCR utilizzati. Le specifiche di tale tecnica richiedono la produzione di frammenti PCR di dimensioni comprese tra 50 bp e 500 bp. Gli ampliconi di dimensioni ottimali per l'analisi HRM sono stati prodotti attraverso una strategia di Nested-PCR: i frammenti PCR omeologo-specifici, descritti nel paragrafo precedente, sono stati utilizzati come DNA stampo in una seconda reazione PCR finalizzata alla produzione di frammenti corrispondenti ciascuno alla regione genica di un singolo esone e di dimensioni comprese tra 130 e 300 bp (Fig. 4.15). Le coppie di oligonucleotidi utilizzate sono posizionate a circa 20 nt a monte (*forward*) e a valle (*reverse*) dell'esone target. Questo tipo di strategia risulta essere selettiva per l'individuazione di SNP localizzati nella regione codificante ed è ideale nel caso di geni ricchi di regione non codificante come i geni *SBEIIa*. La strategia di Nested-PCR è stata applicata a tutti le regioni geniche analizzate.

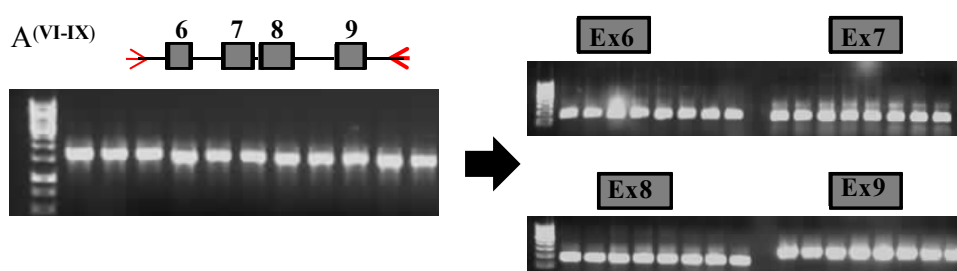


Figura 4.15. Schematizzazione della Nested-PCR per la produzione degli ampliconi per l'analisi High Melting. La figura riporta l'esempio relativo al frammento PCR $A^{(VI-IX)}$ isolato dal genoma A. La seconda reazione di PCR è stata utilizzata per la produzione degli ampliconi corrispondenti alle regioni dell'esone 6, 7, 8 e 9 di dimensioni comprese tra 120 e 190 bp.

4.6.3 Dati qualitativi sull'applicazione dell'HRM nel TILLING

Gli ampliconi prodotti attraverso la Nested PCR sono stati sottoposti all'analisi HRM utilizzando lo strumento Light Scanner (Idaho). I campioni sono stati analizzati in piastre PCR da 96 posizioni per un totale di 192 genotipi ($96 \times (2\text{-fold pool})$) analizzati in ciascun esperimento.

Nella seconda reazione di PCR è stato aggiunto, prima dell'amplificazione, una sonda fluorescente (LC-Green) che ha la proprietà di intercalarsi tra le coppie di basi del DNA a doppia elica. Quando è legato al dsDNA (DNA a doppio filamento) LCGreen Plus emette un segnale fluorescenza a 510nm dopo eccitazione a 470nm.

L'analisi al Light Scanner prevede una fase di lento riscaldamento che provoca la denaturazione degli ampliconi e il rilascio dell'intercalante fluorescente LC-Green (vd Materiali e Metodi); lo strumento provvede alla registrazione della diminuzione di fluorescenza verso l'aumento della temperatura che risulta nella produzione di curve note come “profili di melting” del DNA analizzato (Fig. 4.16). L'intervallo di temperatura nel quale si verifica il “melting” dipende dalle caratteristiche e dalla stabilità della specifica sequenza di DNA analizzata.

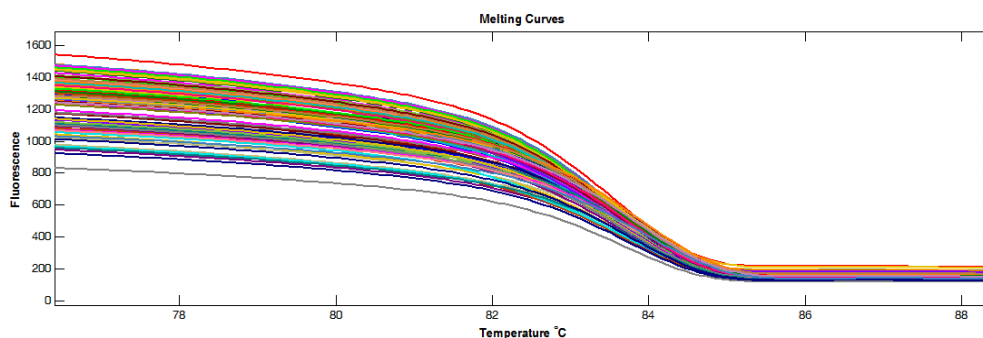


Figura 4.16. Esempio dei profili di melting ottenuti dall'analisi HRM (F/T).

La presenza di uno SNP o molecola eteroduplex è stato rilevato attraverso il confronto delle 96 curve di melting ottenute nella singola analisi; la presenza della mutazione causa una variazione nella “forma” del profilo di melting del campione. Il software Light Scanner elabora, per ciascun campione, curve differenziali che riportano la differenza di fluorescenza (ΔF), rispetto ad un campione di riferimento, verso la temperatura: le curve vengono generate scegliendo un campione di riferimento come linea di base e calcolando i valori di fluorescenza di ciascun campione rispetto alla linea di base. Questo passaggio facilita la distinzione tra campioni normali e mutati enfatizzando sia le differenze

nel profilo che nelle temperature di melting. In figura 4.17 è riportato un esempio di identificazione della mutazione attraverso l'elaborazione delle curve $\Delta F/T$; la curva in rosso rappresenta il putativo mutante identificato. Nel corso delle analisi è stato osservato che picchi caratterizzati da un profilo di tipo gaussiano sono sempre corrisposti alla reale presenza della mutazione; solitamente mutazioni nella condizione omozigote hanno dato picchi di questo tipo. Nel caso di picchi dal profilo distorto o particolarmente basso si sono verificati sia casi di falsi positivi che la presenza di reali mutazioni (Fig. 4.17).

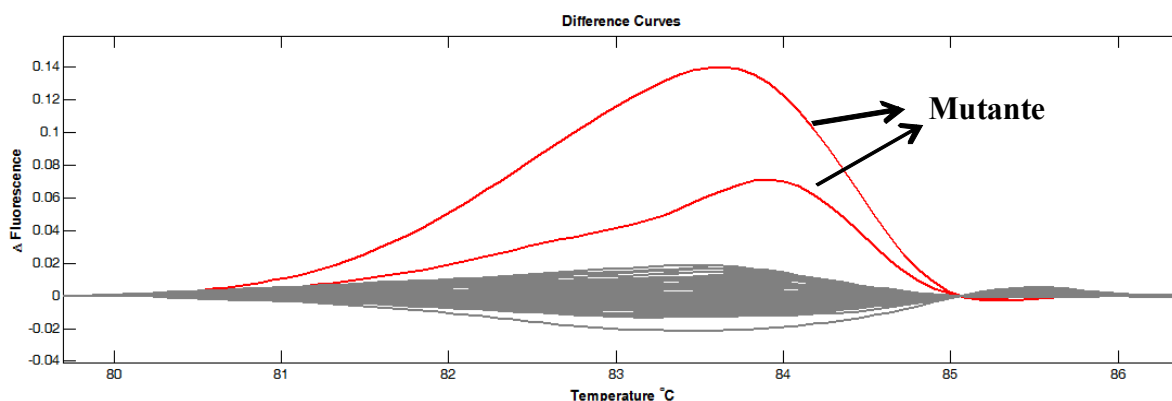


Figura 4.17. Identificazione della mutazione attraverso il software Light Scanner.

Nel corso delle analisi HRM condotte è stato osservato che la presenza di un *mismatch* (disappaiamento) all'interno dell'amplicone causa uno spostamento della curva $\Delta F/T$ a temperature più basse. Tale caratteristica è stata utilizzata, in caso di incertezza, come criterio per confermare le mutazioni rilevate dallo strumento. Come mostrato nella figura 4.18 la curva di F/T di una molecola eteroduplex “taglia” (interseca) le curve dei campioni normali in quanto è caratterizzata da un crollo più veloce della fluorescenza probabilmente dovuto alla presenza del disappaiamento della molecola mutata.

Per l'efficacia dell'analisi è risultato essenziale ottenere prodotti PCR il più possibile omogenei in termini di concentrazione e puri: la presenza di prodotti aspecifici impedisce l'analisi a causa dell'eccessiva variabilità dei profili di melting analizzati (dati non mostrati). A questo scopo la temperatura di *annealing* utilizzata per l'amplificazione, è stata validata attraverso l'analisi HRM di una PCR in gradiente. La figura 4.19 mostra l'analisi HRM dei prodotti PCR (corrispondenti all'esone VI e VII del frammento A^(VI-IX)) ottenuti utilizzando un gradiente di temperatura da 60 a 72 °C; la presenza di bande aspecifiche nelle amplificazioni PCR alle temperature di annealing più elevate è

stata associata alla presenza di piccoli domini di melting posizionati a temperature elevate del profilo HRM.

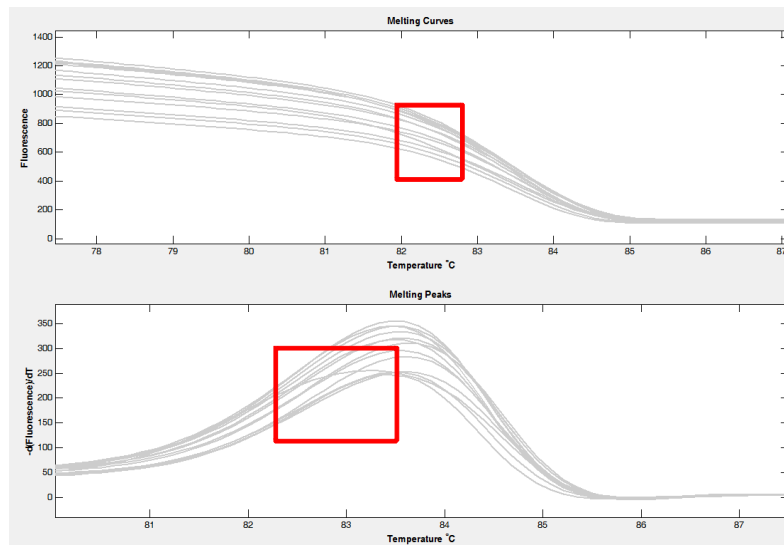


Figura 4.18. Dettaglio delle curve di melting utilizzato per verificare la presenza della mutazione.

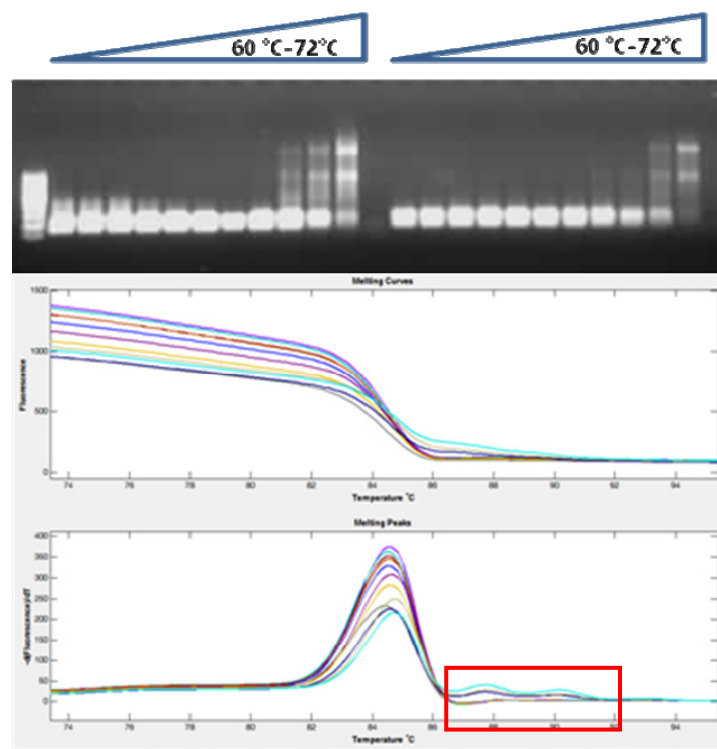


Figura 4.19. Profilo elettroforetico e analisi HRM del gradiente di PCR per i due ampliconi HRM corrispondenti all' esone VI (sinistra) e l'esone (VII) destra. Nel riquadro in rosso sono evidenziati i domini di melting dei prodotti PCR aspecifici.

La presenza di domini di melting, estranei al frammento PCR di interesse rappresenta un significativo elemento di disturbo nell'analisi. Sono state quindi selezionate temperature di annealing comprese tra 60°C e 62°C per l'amplificazione degli ampliconi HRM.

Il profilo di melting degli ampliconi analizzati è risultato fortemente influenzato dal contenuto in GC delle sequenze analizzate. In figura 4.20 è mostrato il confronto del profilo di melting tra i due frammenti PCR a più basso (34%) e più alto contenuto in GC (57%) tra quelli analizzati. L'analisi dell'esone II ha richiesto, al fine di ottenere la completa denaturazione del DNA, l'utilizzo di un intervallo di temperature più alte (88°C-98°C) rispetto a quello utilizzato solitamente (78°C-88°C); inoltre la presenza di segmenti ricchi in GC è stata associata alla presenza di multipli domini di melting all'interno della curva (Fig. 4.21); la presenza di due domini nella curva di melting può richiedere due analisi HRM indipendenti, svolte a diversi intervalli di temperatura, al fine di ottenere una migliore prestazione del metodo.

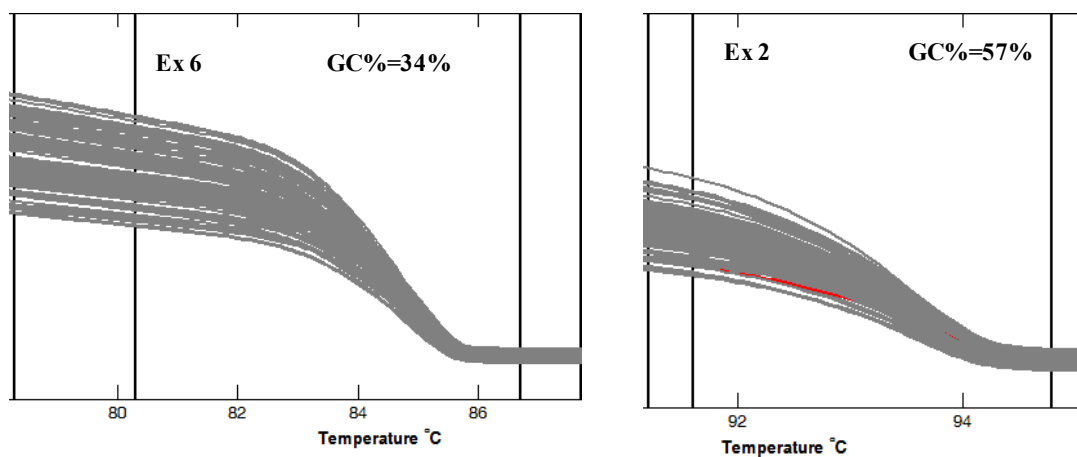


Figura 4.20. Intervallo di temperature di melting in relazione al contenuto di GC.

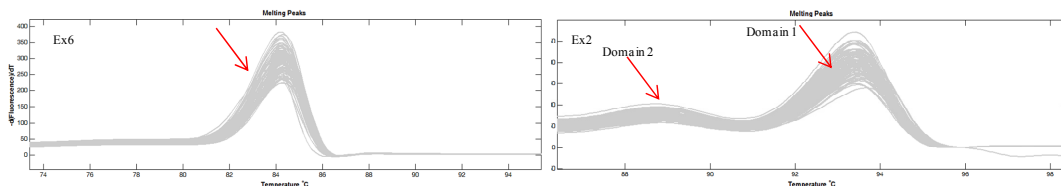


Figura 4.21. Confronto tra il profilo di melting di un amplicone standard (Ex6) e un amplicone ricco in GC (Ex2). L'esone 2 presenta due domini di melting a causa della presenza di regioni ricche in GC.

Inoltre la presenza di un elevata percentuale di GC può determinare una maggiore densità di mutazioni nel caso specifico di popolazioni trattate con EMS. Il confronto tra il contenuto in GC e il numero di mutazioni individuate negli ampliconi corrispondenti agli esoni dal II al IX del gene *SBEIIa-A* ha rilevato che il maggior numero di SNP è stato individuato nella regione dell'esone II (GC%= 65) (Fig. 4.22). Altri fattori che possono influenzare la densità di mutazione sono la dimensione del frammento analizzato e la presenza di strutture secondarie particolarmente stabili che potrebbero oscurare la presenza dell'eteroduplex.

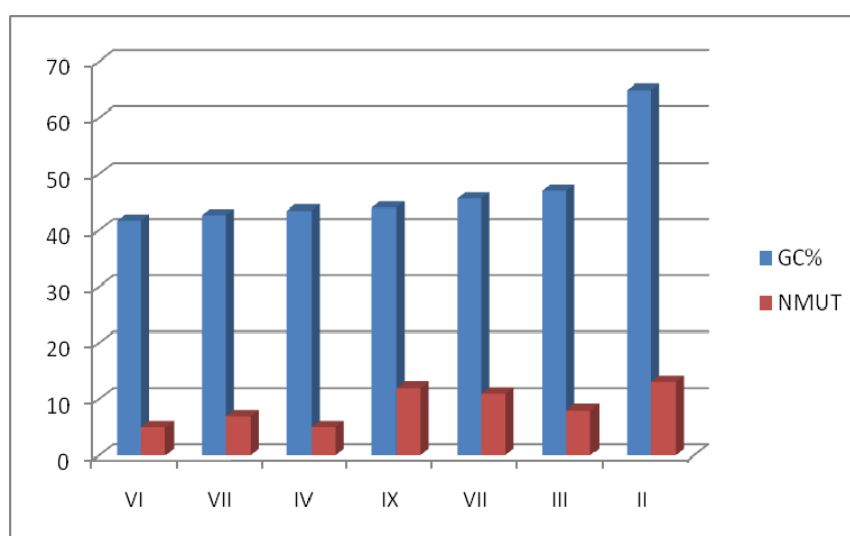


Figura 4.22. Istogramma relativo al confronto tra il contenuto in GC delle sequenze analizzate e il numero di mutazioni individuate.

A seguito dell'individuazione del putativo mutante attraverso l'analisi HRM è stata effettuata un'ulteriore analisi basata sul *re-pooling*: i due individui (DNA genomico) del *pool* "mutante" sono stati singolarmente miscelati, in rapporto 1:1, con un terzo individuo non mutante e sottoposti all'intera procedura prevista per l'analisi HRM (Fig. 4.23). In questo modo è stato possibile nella maggior parte dei casi risalire al singolo genotipo mutante.

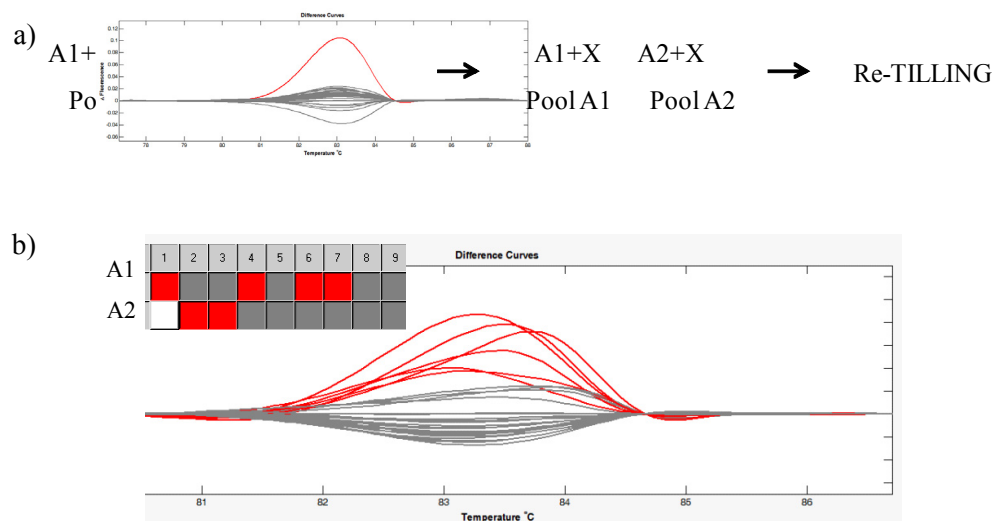


Figura 4.23. a) Strategia di *repooling* per individuare il genotipo mutante all'interno del *pool* di due genotipi. b) Esempio di analisi HRM per identificare il singolo individuo (A1, A2) mutante attraverso l'utilizzo dei nuovi *pool* (A1+X; A2+X): i quadrati in rosso indicano l'individuo mutante del *pool*. I due costituenti del *pool* originario (A1, A2) sono contenuti nelle A1 e A2, rispettivamente.

Ciascuna analisi HRM è stata eseguita in singola replica. Si sono verificati diversi casi di putative mutazioni che hanno dato un picco $\Delta F/T$ negativo; questi putativi mutanti sono risultati sempre falsi positivi e sono stati spesso associati alla presenza di “smear” o prodotti aspecifici nella reazione di PCR o sono stati attribuiti alla scarsa qualità del DNA genomico utilizzato nelle analisi. In alcuni casi, sebbene il picco sia di tipo negativo, il profilo della curva di melting $\Delta F/T$ interseca chiaramente le altre curve di melting e corrisponde alla presenza reale della mutazione.

Le mutazioni sono state caratterizzate per sequenziamento dell'amplicone mutante. Dopo aver individuato il genotipo mutante la sequenza di interesse è stata prodotta per PCR utilizzando come stampo il DNA genomico della pianta identificata.

Sono state individuate sia mutazioni in condizione omozigote, individuate attraverso il confronto della sequenza nucleotidica del mutante con quella del genotipo normale, sia nello stato eterozigote individuabili sotto forma di un doppio picco all'interno dell'elettroferogramma (Fig. 4.24). La scelta degli oligonucleotidi utilizzati nel sequenziamento si è basata sul criterio di copertura di tutto l'esone e dei siti di *splicing*.

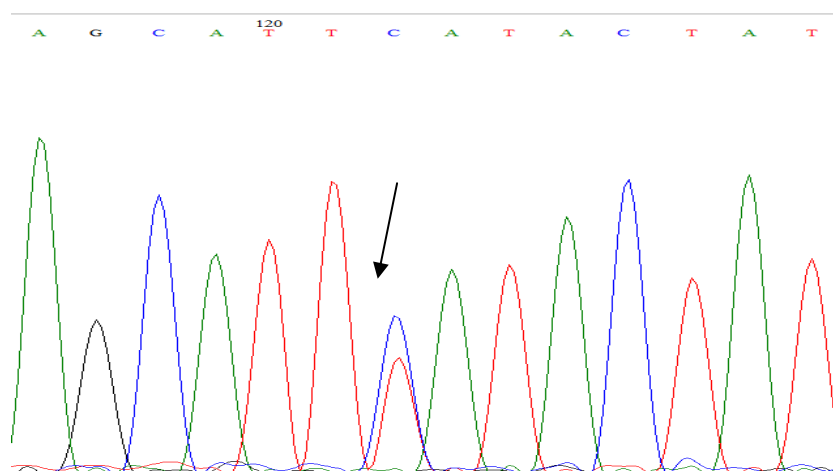


Figura 4.24. Esempio di caratterizzazione di una mutazione eterozigote attraverso l'identificazione di un doppio picco nell'elettroferogramma.

4.6.4 Nuove varianti alleliche identificate per i tre omeologhi *SBEIIa*

In tabella 4.4 sono riportati i dati relativi al numero di piante analizzate e di mutanti identificati per ciascun allele *SBEIIa*. Sono state caratterizzate, in totale, 59 nuove varianti alleliche per il gene *SBEIIa-A*, 14 per il gene *SBEIIa-B* e 49 per il gene *SBEIIa-D*. Sono state inoltre identificati 18 mutanti nella regione genica A^(X-XIII) al momento non ancora caratterizzate per sequenziamento. È stata calcolata una frequenza media di mutazioni associata alla popolazione TILLING di circa 1 SNP per ogni 36 Kb. La quasi totalità delle mutazioni identificate sono localizzate nella regione codificante dei tre alleli. Tutte le mutazioni identificate sono risultate transizioni del tipo C/T e G/A coerentemente con l'effetto del trattamento EMS applicato alle piante.

Tabella 4.4. La frequenza di mutazioni associata alla popolazione è stata calcolata secondo la seguente formula: (dimensioni regione analizzata)x(N° linee analizzate)/(numero di mutanti identificati). * indica che le 18 mutazioni identificate per il frammento A^(X-XIII) non sono state al momento caratterizzate per sequenziamento.

Frammento	Dimensioni (bp)	N° Linee analizzate	Mutazioni identificate	Frequenza mutazioni (kb)
A ^(II-V)	493	2300	29	39
A ^(VI-IX)	358	2688	35	27
A ^(X-XIII)	498	1531	18*	34*
B ^(IV-IX)	500	1152	14	40
D ^(II-VI)	580	1920	21	31
D ^(X-XII)	498	1920	28	33

Attraverso l'analisi delle sequenze dei tre geni *SBEIIa* eseguita con l'applicazione CODDLE sono state identificate le regioni interessate dalla presenza dei tre domini conservati indicati con le sigle IPB004193, IPB006048 e IPB006589 e corrispondenti rispettivamente al dominio N-terminale caratteristico della famiglia degli enzimi glicoside-idrolasi, al dominio C-terminale e al subdominio catalitico dell' α -amilasi. In figura 4.25 sono rappresentate le regioni conservate dei tre blocchi all'interno della sequenza amminoacidica di *SBEIIa-A*; l'analisi dei due omeologhi del genoma B e D ha dato un risultato identico. La determinazione dei domini conservati del gene è stata utilizzata per la valutazione dell'effetto delle mutazioni missenso sulla funzionalità della proteina.

Le nuove varianti alleliche identificate sono state analizzate attraverso l'applicazione PARSE-SNP (Tab. 4.5). Questo programma è risultato particolarmente utile nell'analisi delle mutazioni missenso: i valori di PSMM mostrati in tabella 4.5 forniscono un'indicazione delle severità dell'effetto della mutazione sulla funzionalità della proteina. Per l'allele del genoma A sono state identificate quattro mutazioni missenso, rispettivamente tre (G66D, G66D e E67K), nel dominio C-terminale beta dell' α -amilasi e una nel dominio N-terminale della glicoside idrolasi (A208V) con valori di PSMM>10. Per l'allele *SBEIIa-B* un'unica mutazione (A208V) localizzata nella regione conservata corrispondente all'N-terminale della glucoside idrolasi è stata predetta potenzialmente in grado di modificare la funzionalità della proteina. Per l'allele *SBEIIa-D* due mutazioni missenso (A201T e G390S) per il dominio N-terminale glicoside-idrolasi e una mutazione (D65N) per il dominio C-terminale-beta dell' α -amilasi hanno mostrato valori di PSMM>10. Sono inoltre state identificate rispettivamente 7, 11 e 2 mutazioni silenti per i tre alleli del genoma A, B e D. La disponibilità di nuove varianti alleliche che presentano cambiamenti amminoacidici nei domini catalici dell'enzima rappresentano uno strumento utile per la caratterizzazione della funzionalità delle diverse regioni della proteina.

M A T F A V S G A T L G V A R P A G	18
A G G G L L P R S G S E R R G G V D	36
L P S L L L R K K D S S R A V L S	53
R A A S P G K	IPB006048H (8.7e-05) IC 2.48
<u>V L V P D G E S D D L</u>	71
<u>A S P</u> A Q P E E L Q I P E D I E E	88
Q T A E V N M T G G T A E K L E S S	106
E P T Q G I V E T I T D G V T K G V	124
K E L V V G E K P R V V P K P G D G	142
Q K I Y E I D P T L K D F R S H L D	160
Y R Y S E Y R R I R A A I D Q H E	177
G G L E A F S R G Y E K L G F T R S	195
A E G I T	IPB004193A (4.0e-09) IC 1.56
<u>Y R E W A P G A H</u> S A A	212
L V G D F N N W N P N A D T M T R D	230
D Y G V W E I F L P N N A D G S P	247
A I P H G S R V K I R M D T P S G	264
V K D S I S A W I K F S V Q A P G E	282
I P F N G I Y Y D P P E E E K Y V	299
F Q H P Q P K R P	IPB004193B (1.5e-10) IC 1.44
<u>E S L R I Y E S H</u>	317
<u>I G M S S P</u> <u>E</u> P K I N S Y A N F R	334
D	IPB006589A (1.2e-08) IC 1.11
<u>E V L P R I K R L G Y N A V Q I M</u>	352
A I Q	IPB004193C (4.0e-20) IC 1.30
<u>E H S Y Y A S F G</u> <u>Y H V T N</u>	369
<u>F F A P S S R F G T P</u> E D L K S L I	387
D R A	IPB004193D (3.2e-12) IC 2.55
<u>H E L G L L V L M D I V H S</u> <u></u>	404
<u>H</u> S S N N T L D G L N G F D G T D T	422
H Y F H G G P R G H H W	IPB004193E (2.6e-05) IC 2.28
<u>M W D S R L</u>	440
<u>F N Y G S W E</u> <u>V</u> L R F L L S N A R	457
<u>W W L E E Y K F D G F R F D</u> G V T S	IPB004193E (1.6e-15) IC 2.28
475	
M M Y T H H G L Q M T F T G N Y G	492
E Y F G F A T D V D A V V Y L M L V	510
N D L I H G L Y P D A V S I G E D V	528
S G M P T F C I P V P D G	IPB004193F (6.7e-05) IC 1.07
<u>G V G F</u>	545

Figura 4.25. (continua pagina siguiente)

<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>M</u>	A	V	A	D	K	W	I	E	L	L	K		562
Q	S	D	E	S	W	K	M	G	D	I	V	H	T	L	T	N	R	580
IPB006589D (6.3e-06) IC 1.17																		
R	W	L	E	K	C	V	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	V	598
G	D	K	T	I	A	F	W	L	M	D	K		D	M	Y	D	F	611
M	A	L	D	R	P	S	T	P	R	I	D	R	G	I	A	L	H	633
IPB004193F (2.4e-07) IC 1.07																		
K	M	I	R	L	V	T	M	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	651
M	G	N	E	F	G	H	P	E		W	I	D	F	P	R	G	P	668
Q	T	L	P	T	G	K	V	L	P	G	N	N	N	S	Y	D	K	686
C	R	R	R	F	D	L		G	D	A	D	F	L	R	Y	R	G	703
M	Q	E	F	D	Q	A	M	Q	H	L	E	E	K	Y	G		F	720
M	T	S	E	H	Q	Y	V	S	R	K	H	E	E	D	K	V	I	738
I	F	E	R	G	D	L	V	F	V	F	N	F	H	W	S	N	S	756
F	F	D	Y	R	V	G	C	S	R	P	G	K	Y	K		V	A	773
L	D	S	D	D	A	L	F	G	G	F	S	R	L	D	H	D	V	791
D	Y	F	T	T		E	H	P	H	D	N	R	P	R	S	F	S	808
V	Y	T	P	S	R	T	A	V	V	Y	A	L	T	E	*			824

Figura 4.25. Identificazione delle regioni conservate corrispondenti ai domini IPB004193, IPB006048, IPB006589 all'interno della sequenza amminoacidica dedotta per l'allele *SBEIIa-A*. Le regioni sottolineate indicano i domini conservati; i residui amminoacidici in verde indicano le posizioni amminoacidi che sono meglio conservate all'interno del blocco; gli amminoacidi in rosso corrispondono ai residui meno conservati e predetti essere meno fondamentali per il funzionamento dell'enzima.

Tabella 4.5. Elaborazione delle varianti alleli che identificate con il programma PARSR-SNP. Nella prima colonna (SNP) è riportata la mutazione nucleotidica; nella seconda colonna (effetto) la sostituzione amminoacidica codone di stop (*), mutazione nel sito di *splicing* (splic. Jun.); I valori PSMM *difference* vengono mostrati per le mutazioni missenso che cadono all'interno di un Blocco-dominio conservato; valori di PSMM>10 (in rosso) indicano che la mutazione provoca un profondo cambiamento rispetto al Blocco di riferimento; valori<0 (in verde) indicano SNP che rendono la proteina più simile al blocco di riferimento. Il simbolo* indica la formazione di un codone di stop. Splic. Junc. Indica una mutazione in un sito di *splicing* (vedi pagina seguente).

Tabella 4.5. (vedi leggenda)

SBEIIa-A			SBEIIa-D			SBEIIa-B		
SNP	EFFETTO	PSMM	SNP	EFFETTO	PSMM	SNP	EFFETTO	PSMM
G444A	S53N	-	G218A	introne	-	G1735A	Splice Jun.	-
C456T	S57F	-	G438A	introne	-	C1738T	A196V	-
G467A	V61I	8.09	C443T	introne	-	C1765T	A205V	14.06
G467A	V61I	8.09	C499T	L58=	-	G1771A	G207E	7.09
G472A	L62=	-	G511A	G62S	32.01.00	C1776T	H209Y	5.01
G483A	G66D	32.06.00	G518A	S64N	-16.8	C1904T	introne	-
G483A	G66D	32.06.00	G520A	D65N	15.05	G1948A	W220*	-
G485A	E67K	10.05	G537A	P70=	-	G1970A	M227I	-
G500A	A72T	1.02	C849T	I82=	-	G2354A	E236K	-
G500A	A72T	1.02	G880A	G93R	-	G2505A	R258=	-
C830T	T90M	-	G883A	G94R	-	G2616A	E295=	-
G853A	G98R	-	C1045T	L148=	-	G2945A	E309K	3.09
G901A	E114K	-	G1061A	S153N	-	G2955A	R312K	9.02
G946A	V129M	-	C1071T	D156=	-	/	/	/
G948A	V129=	-	C1500T	R166C	-	/	/	/
G954A	E131=	-	G1774A	A201T	13.08	/	/	/
G954A	E131=	-	C1997T	T224=	-	/	/	/
G1454A	S164N	-	C3688T	A344V	6.08	/	/	/
G1507A	A182T	-	C3693T	Q346*	-	/	/	/
C1514T	S184F	-	G3695A	Q346=	-	/	/	/
G1534A	G191R	-	C3703T	A349V	4.09	/	/	/
G1534A	G191R	-	C3707T	I350=	-	/	/	/
C1541T	T193I	-	C3718T	S354L	8.03	/	/	/
C1729T	I199=	-	G3730A	S358N	-1.1	/	/	/
C1755T	A208V	10.09	C3915T	Y361=	-	/	/	/
C1945T	P222S	-	G3963A	E377=	-	/	/	/
C2351T	P240L	-	G3963A	E377=	-	/	/	/
C2360T	A243V	-	C3974T	S381F	-	/	/	/
G2362A	D244N	-	C3975T	S381=	-	/	/	/
C2381T	P250L	-	G3988A	A386T	-	/	/	/
C2383T	H251Y	-	G4000A	G390S	14.01	/	/	/
G2489A	R258=	-	G5076A	G424S	-	/	/	/
G2506A	G264D	-	G5248A	A452T	-	/	/	/
G2508A	V265M	-	G5310A	M472I	-	/	/	/
C2542T	S276F	-	G5335A	Splic.Jun	/	/	/	/
G2894T	E296D	-	/	/	/	/	/	/
C2907T	Q301*	-	/	/	/	/	/	/
C2920T	P305L	-	/	/	/	/	/	/
G2942A	R312=	-	/	/	/	/	/	/
C2969T	S321=	-	/	/	/	/	/	/

4.6.5 Mutazioni deleterie: nonsense e *splicing*

Per ciascuno dei tre alleli *SBEIIa* sono state identificate due mutazioni deleterie considerate responsabili della perdita dell'espressione genica a causa della formazione di un codone di stop prematuro o dell'alterazione delle sequenze nucleotidiche (AG al 5'/GT al 3') necessarie al corretto processamento (*splicing*) dell'mRNA.

Per l'allele *SBEIIa-A* è stata identificata una transizione C/T che ha causato la formazione di un codone di stop prematuro (TAA) nell'esone IX (mutante *SBEIIa-A1*) e di una transizione G/A nell'esone XII con formazione di un codone TGA (mutante *SBEIIa-A2*). Per l'allele *SBEIIa-B* una transizione G/A ha provocato la formazione di un codone TAG nell'esone VI (mutante *SBEIIa-B1*); è stata inoltre identificata una mutazione G/A a carico del sito di *splicing* al 5' dell'esone V (mutante *SBEIIa-B2*). Allo stesso modo sono state identificate una transizione C/T nell'esone X dell'allele *SBEIIa-D* che ha generato un codone TAG (mutante *SBEIIa-D1*) e una transizione G/A che ha causato la perdita del sito di *splicing* GT al 3' dell'esone XIII (mutante *SBEIIa-D2*) (Fig. 4.26). Tutte le mutazioni descritte, ad eccezione del mutante *SBEIIa-D1*, erano in una condizione eterozigote. In figura 4.27 è riportata la posizione di tutte le mutazioni identificate all'interno della struttura dei tre alleli.

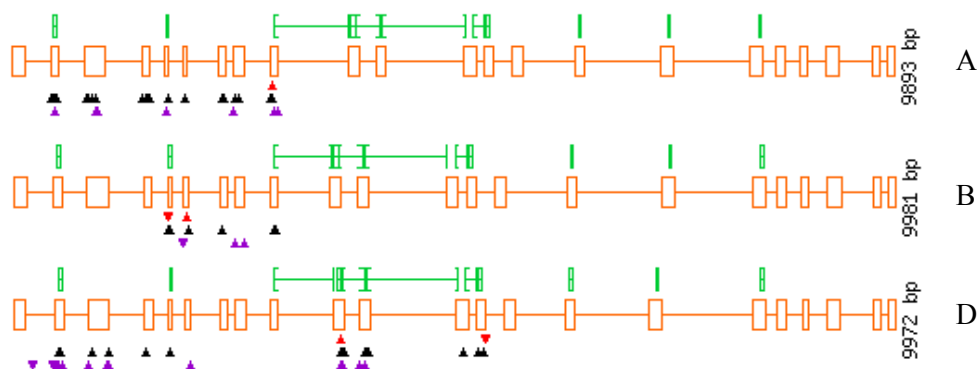


Figura 4.27. Rappresentazione schematica delle mutazioni individuate per i tre alleli *SBEIIa-A*, *SBEIIa-B* e *SBEIIa-D*. Le linee in verde rappresentano le regioni del gene interessate dalla presenza dei domini conservati. I triangoli rivolti verso l'alto rappresentano i polimorfismi localizzati nelle regioni esoniche; i triangoli in rosso mostrano le mutazioni deleterie non senso e nei siti di *splicing*; i triangoli in nero e in viola rappresentano rispettivamente le mutazioni missenso e le mutazioni silenti.

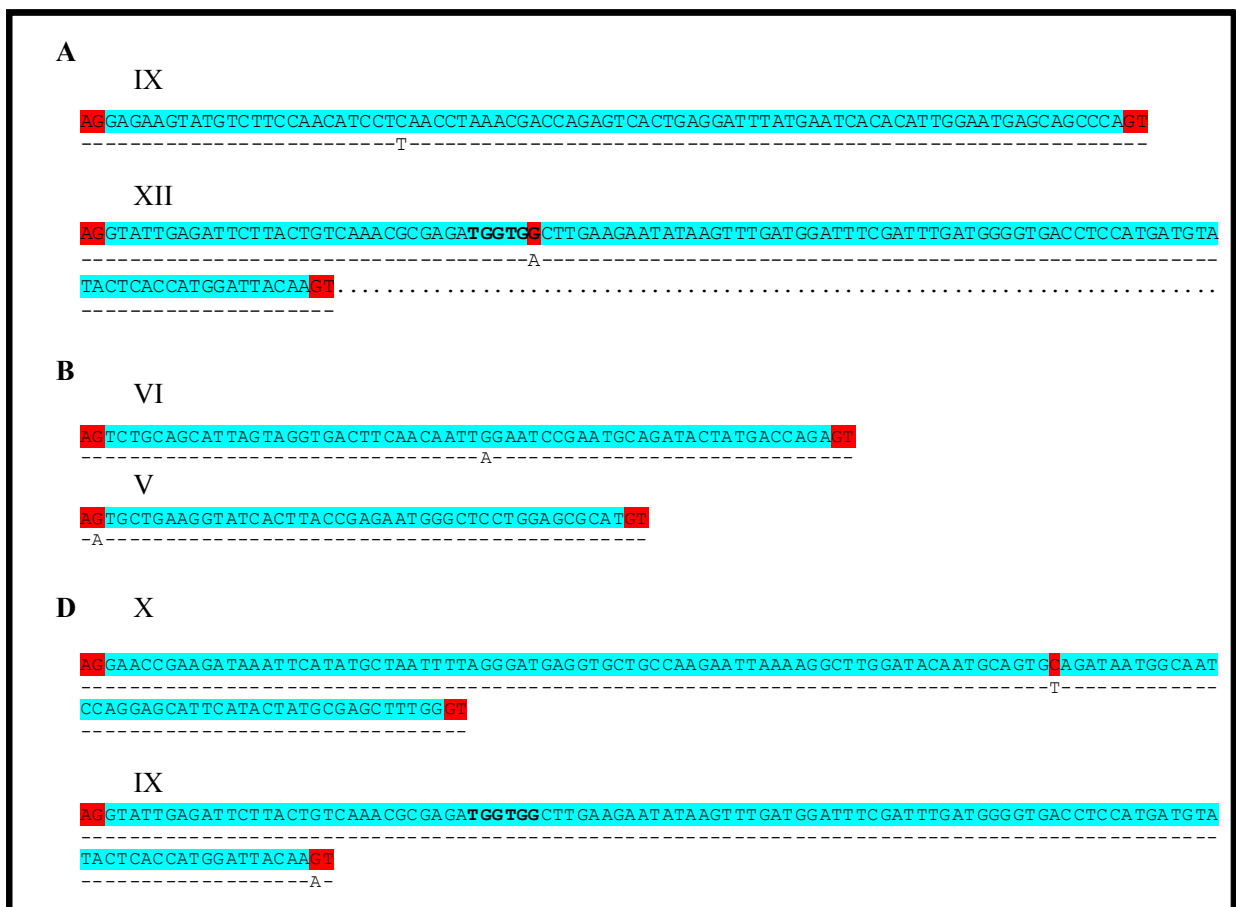


Figura 4.26. Descrizione delle mutazioni deleterie identificate per i tre alleli *SBEIIa-A*, *SBEIIa-B*, *SBEIIa-D*.

4.6.6 Analisi delle mutazioni deleterie nella progenie M3

La progenie M3 di tre dei mutanti *knock-out* *SBEIIa-A1*, *SBEIIa-A2* e *SBEIIa-B1* è stata caratterizzata al fine di selezionare gli individui che presentavano la mutazione. La strategia utilizzata si è basata su un saggio di PCR *Marker Assisted Selection* e di oligonucleotidi dCAPS.

Per ciascuno dei mutanti una sequenza di circa 60 nt, contenente la mutazione, è stata analizzata attraverso l'applicazione dCAPs Finder disponibile sul Web. dCAPs Finder effettua un'analisi dei siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione presenti nella sequenza mutante e nella sequenza *wild type* e localizzati a cavallo dello SNP oggetto di studio. Nel caso in cui venga individuato un sito di restrizione, comprendente la posizione nucleotidica interessata dalla mutazione in uno dei due genotipi, mutato o normale, dCAPs Finder suggerisce l'enzima di restrizione in grado di discriminare

tra le due sequenze (Fig. 4. 28a). Questa situazione si è verificata per il genotipo *SBEIIa-B-1*: è stata identificata la presenza della sequenza di riconoscimento per l'enzima di restrizione MunI nel genotipo *wild type*; la presenza dello SNP (G/A) ha determinato la perdita di tale sequenza di riconoscimento nel genotipo mutante.

Sono stati analizzati 29 individui delle progenie M3. Una sequenza di circa 1000 bp è stata isolata per PCR dal DNA genomico delle piante attraverso l'utilizzo di una coppia di oligonucleotidi genoma specifici. Il prodotto PCR è stato quindi sottoposto a digestione enzimatica dell'enzima MunI (Fig.4.28b). Il saggio ha permesso di distinguere il genotipo normale, quello eterozigote e quello omozigote mutante. La mancanza della banda più alta, corrispondente al frammento non digerito, indica l'assenza della mutazione; la presenza della sola banda del frammento non digerito è associata al genotipo omozigote mutante; la presenza delle tre bande indica un genotipo eterozigote.

a)

Wild Type

TCTGCAGCATTAGTAGGTGACTTCAA**CAATTG**GAATCCAAATGCAGAT

Mutant

TCTGCAGCATTAGTAGGTGACTTCAA**CAATT****A**GAATCCAAATGCAGAT

b)

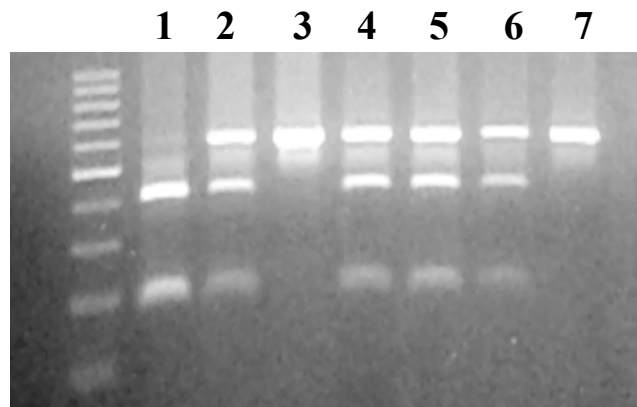


Figura 4.28. a) Identificazione del sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione MunI nella sequenza *wild type* a cavallo della posizione interessata dalla mutazione. b) ^{Profilo} elettroforetico dei prodotti della reazione enzimatica di MunI sulla progenie M3 del mutante *SBEIIa-B-1*. I campioni 2, 4, 5, 6 corrispondono al genotipo eterozigote; 3 e 7 corrispondono al genotipo omozigote mutante e il campione 1 al genotipo *wild type*.

In totale sono stati analizzati 29 piante M3 del mutante *SBEIIa-B1*: 11 piante sono risultate *wild type*, 9 eterozigoti e 9 omozigoti mutanti.

L'analisi del mutante *SBEIIa-A1* non ha riscontrato la presenza di siti di riconoscimento per enzimi restrizione a cavallo della mutazione; è stato quindi generato un oligonucleotide contenente un mismatch all'estremità 3' in grado di inserire il sito di riconoscimento per l'enzima *PsiI* a cavallo dello SNP (C/T), unicamente nel genotipo mutante. L'oligonucleotide dCAPs è stato utilizzato in combinazione con un oligonucleotide genoma specifico per isolare la regione del gene da analizzare. I frammenti PCR ottenuti dalle piante M3 del mutante *SBEIIa-A1* sono quindi stati sottoposti a digestione enzimatica con l'enzima *PsiI* (Fig. 4.29).

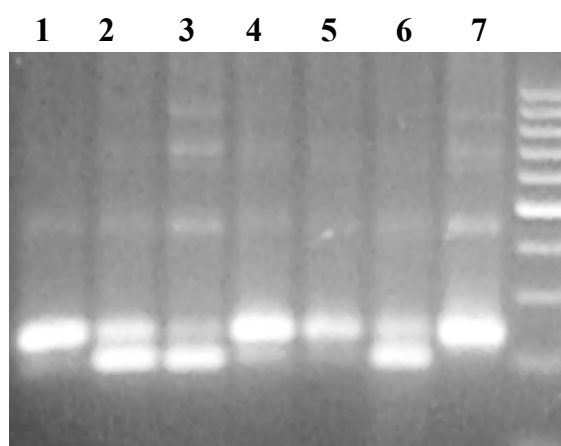


Figura 4.29. Profilo elettroforetico della progenie M3 del mutante *SBEIIa-A1*. I campioni 1, 4 e 5 corrispondono al genotipo *wild type*; i campioni 2 e 6 sono eterozigoti; il campione 3 è omozigote mutante.

In questo caso il fenotipo mutante è associato alla presenza del frammento digerito (Fig.4.29). Sono state analizzate 22 piante della progenie M3 del mutante *SBEIIa-A1* di cui 9 sono risultate omozigoti mutanti, 8 eterozigoti e 5 *wild type*.

Ugualmente per il mutante *SBEIIa-A2* è stato utilizzato un oligonucleotide dCAPs in grado di inserire la sequenza di riconoscimento per l'enzima *MfeI* negli ampliconi del genotipo *wild type*. Gli ampliconi prodotti dagli individui della generazione M3 sono stati sottoposti a digestione enzimatica con *MfeI*; in questo caso l'assenza di prodotti di digestione è associata al genotipo mutante omozigote (Fig. 4.30).

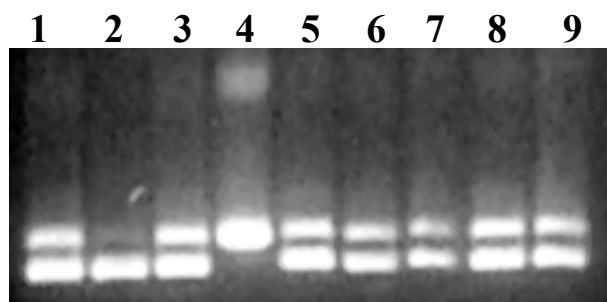


Figura 4.30. Profilo elettroforetico della progenie M3 del mutante *SBEIIa-A2*. I campioni (1, 3, 5, 6, 7, 8, 9) sono eterozigoti; il campione 4 è omozigote mutante e il 2 è *wild type*.

4.6.7 Espressione dei trascritti dell'allele target nei mutanti knock-out

Al fine di verificare l'effetto del codone di stop sull'espressione del gene *SBEIIa-A* è stata eseguita un'analisi dei trascritti dell'allele nei due mutanti *SBEIIa-A1* e *SBEIIa-A2*. L'analisi è stata condotta sul cDNA dei due genotipi sintetizzato mediante RT-PCR a partire dall'RNA isolato dalle cariossidi immature (18DPA). Sono state utilizzate tre combinazioni di oligonucleotidi specifici per il genoma A. L'allineamento delle sequenze di cDNA dei tre alleli *SBEIIa-A*, *SBEIIa-B* e *SBEIIa-D* ha consentito l'individuazione di alcune regione polimorfiche per 1 o 2 nucleotidi che sono state utilizzate per il disegno degli oligonucleotidi (Fig. 4.31). La Gliceraleide-Fosfo-Deidrogenasi (GAPDH), espressa in modo costitutivo nell'endosperma, è stata utilizzata come gene *house keeping* (controllo) per quantificare il cDNA; il frammento PCR del gene GAPDH è stato ottenuto attraverso l'utilizzo della coppia di oligonucleotidi GAPDH-Fw e GAPDH-Rev.

La specificità degli oligonucleotidi per il gene *SBEIIa-A* è stata testata per PCR utilizzando le linee di sostituzione disomiche di *Langdon* (Fig. 4. 32).

Sono stati amplificati tre frammenti del gene *SBEIIa-A* attraverso le coppie di oligonucleotidi RT-A1F/RT-1R, RT-A1F/RT-A2R e RT-A2F/RT-A2R rispettivamente dal genotipo *wild type Cadenza* e dai due mutanti *knock-out SBEIIa-A1* e *SBEIIa-A2*. L'analisi elettroforetica dei prodotti PCR ottenuti, utilizzando 30 cicli di amplificazione, hanno mostrato per tutte le coppie di oligonucleotidi utilizzate l'assenza della banda del trascritto *SBEIIa-A* nei mutanti *SBEIIa-A1* e *SBEIIa-A2* (Fig. 4.33).

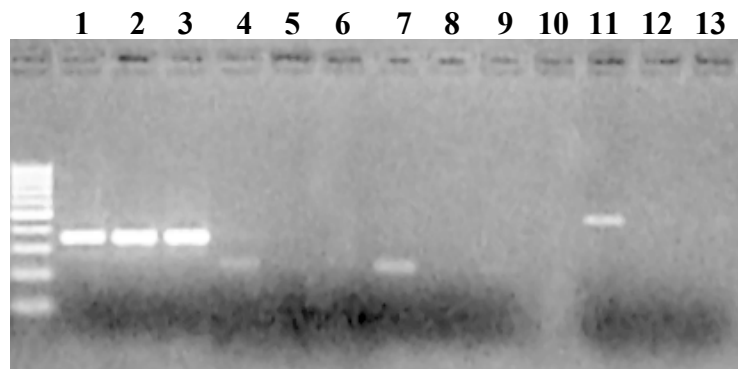


Figura 4.33. Analisi elettroforetica dei frammenti isolati per RT-PCR utilizzando le coppie di oligonucleotidi GAPDH Fw/ GAPDH Rev (1, 2, 3) GRT-A1F/RT-1R (4, 5, 6), RT-A2F/RT-A2R (7, 8, 9) e RT-A1F/RT-A2R (10, 11, 12 13) sul cDNA di: *Cadenza* (1, 4, 7, 11); *SBEIIa-A1*(2, 5, 8, 12) e *SBEIIa-A*(3, 6, 9, 13).

4.6.8 Analisi delle proteine legate ai granuli nei mutanti *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*

È stata effettuata un'analisi SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli di amido (SGP) dei mutanti *knock-out SBEIIa-A1*, *SBEIIa-A2* e *SBEIIa-B* al fine di verificare l'eventuale presenza di nuovi effetti dovuti alla presenza della mutazione nonsense nei genotipi analizzati. Il fenotipo proteico dei genotipi analizzati è risultato identico a quello riscontrato in *Cadenza* (Fig. 4.34). Questo risultato è in accordo con la tesi che la proteina SBEIIa in frumento costituisce l'isoforma maggiormente rappresentata nella frazione solubile dell'endosperma; nessun effetto pleiotropico è stato riscontrato sulle altre proteine dei granuli.

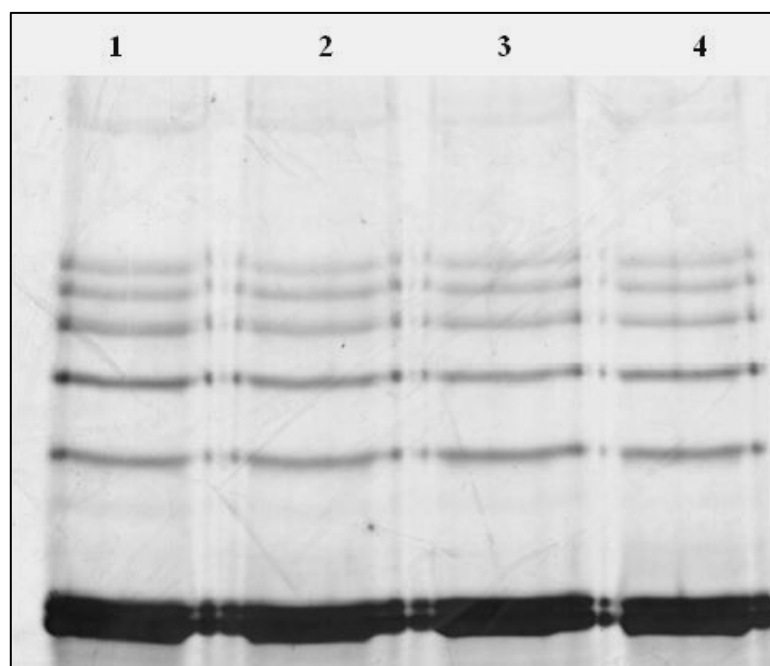


Figura 4.34. Analisi SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli in *Cadenza* (1); in *SBEIIa-A1* (2), *SBEIIa-A2* (3) e *SBEIIa-B* (4).

4.7 Caratterizzazione chimico-fisica di amido di frumento a basso e ad alto contenuto di amilosio

Nel corso del dottorato di ricerca sono state studiate le caratteristiche chimico-fisiche dell'amido di diverse linee di frumento, tenero e duro, caratterizzate da un rapporto amilosio-amilopectina alterato a seguito dell'intervento su alcune classi enzimi coinvolti nella via biosintetica dell'amido. In particolare nel nostro laboratorio erano disponibili un set di linee *Waxy* e parziali *Waxy* della linea di frumento tenero N11 e della cultivar di frumento duro Svevo (Tab. 4.6) caratterizzate dall'assenza di una o più isoforme della proteina *Waxy*.

Tabella 4.6. Descrizione del set di genotipi *waxy* di frumento tenero e frumento duro.

Genotipi	Singoli nulli	Doppio nulli	Triplo nulli
N11	<i>Wx-A1</i> ⁻ ,	<i>Wx-A1</i> ⁻ <i>BI</i> ⁻ , <i>Wx-A1</i> ⁻ <i>BI</i> ⁻ <i>DI</i> ⁻	
	<i>Wx-B1</i> ⁻	<i>Wx-A1</i> ⁻ <i>DI</i> ⁻	
	<i>Wx-D1</i> ⁻	<i>Wx-B1</i> ⁻ <i>DI</i> ⁻	
Svevo	<i>Wx-A1</i> ⁻ ,	<i>Wx-A1</i> ⁻ <i>BI</i> ⁻ ,	
	<i>Wx-B1</i> ⁻		

Sono stati inoltre utilizzati set di linee *Sgp1* nulli parziali e completi della linea frumento tenero N11 e della cultivar Svevo caratterizzate dall'assenza di una o più isoforme della proteina Sgp1 (Tab. 4.7). I due set di genotipi *Sgp1* e *waxy* sono stati ottenuti per introgressione degli allei nulli, precedentemente identificati in mutanti naturali di frumento tenero (Yamamori *et al.*, 1992; Urbano *et al.*, 2002; Yamamori *et al.*, 2000).

Sono state inoltre analizzate alcune linee di frumento duro transgeniche prodotte da Sestili *et al.* (2010, *submitted*) trasformate con un costrutto RNAi specifico per il silenziamento dell'enzima di ramificazione SBEIIa (Tab. 4.8).

Tabella 4.7. Descrizione del set di genotipi *Sgp1* nulli di frumento tenero e frumento duro.

Genotipi	Singoli nulli	Doppio nulli	Triplo nulli
N11		<i>Sgp1-A1⁻BI⁻</i> , <i>Sgp1AI⁻BI⁻DI⁻</i>	
		<i>Sgp1-A1⁻DI⁻</i> , <i>Sgp1BI⁻DI⁻</i>	
Svevo	<i>Sgp1-A1⁻</i> , <i>Sgp1-BI⁻</i>	<i>Sgp1-A1⁻BI⁻</i> , <i>Sgp1-A1⁻DI⁻</i>	

Tabella 4.8. Descrizione delle linee transgeniche RNAi (Sestili *et al.*, 2010, *submitted*).

Varietà	linee	Metodo di trasformazione
Svevo	MJ16-112	Biolistico
	MJ16-114	
Ofanto	A434	<i>A. tumefaciens</i>

4.7.1 Messa a punto di un metodo di calibrazione per la determinazione dell' amilosio in frumenti *low* e *high amylose*

Al fine di migliorare l'affidabilità delle misure del contenuto di amilosio nelle linee di frumento oggetto di studio è stato messo a punto un nuovo metodo di calibrazione nell'ambito del saggio colorimetrico di Chrastil *et al.* (1982).

Il metodo utilizzato per la determinazione dell'amilosio è un saggio colorimetrico basato sull'utilizzo di KI/I (Chrastil *et al.*, 1982). Le misure sono state effettuate su campioni di amido isolato dallo sfarinato integrale, attraverso il *dough method*, al fine di limitare l'errore dovuto alla presenza degli altri componenti della cariosside.

È stata sviluppata una procedura di calibrazione basata sull'utilizzo di miscele di campioni solubilizzati di amido waxy (circa 0% di amilosio) e amilosio di patata puro. Le miscele sono state realizzate al fine di ottenere una scala da 0% a 80% di amilosio. L'utilizzo di amilosio puro ha permesso di costruire una retta di taratura in grado di coprire un intervallo di % di amilosio molto ampio; l'utilizzo di amido waxy nella retta di taratura è stato concepito come metodo per ristabilire il background di amilopectina tipico del frumento. L'amilopectina infatti interagisce in piccola percentuale con gli ioni Iodio; l'assenza di amilopectina nei campioni utilizzati per la costruzione della retta di tarature causerebbe un errore nelle misure. Il metodo è descritto nella capitolo 3 (Materiali e Metodi).

4.7.2 Caratterizzazione delle proprietà chimico fisiche dell'amido nelle linee di frumento Waxy

4.7.2.1 Determinazione del contenuto di amilosio waxy

Nelle tabelle 4.9 e 4.10 sono riportati i valori del contenuto amilosio determinati per il set di genotipi *Waxy* di frumento tenero e frumento duro.

Le analisi sono state eseguite sull'amido isolato dallo sfarinato integrale escludendo la frazione del glutine e della crusca. È stato verificato un drastico crollo della percentuale di amilosio nei genotipi N11-*Waxy* e Svevo-*Waxy* rispetto ai genotipi normali, pari a un decremento del 94-95%. Sia in frumento duro che in frumento tenero è stato evidenziato una maggiore diminuzione del contenuto di amilosio associata ai genotipi privi dell'allele *Wx-B1*.

Tabella 4.9. Contenuto di amilosio del set di genotipi *Waxy* in 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 4.10. Contenuto di amilosio del set di genotipi *Waxy* in frumento duro.

Genotipo	Wx-A1	Wx-B1	Svevo w.t.	Svevo Wx
contenuto di				
amilosio (%)	26,4	22,2	29	1,5

4.7.1.2 Determinazione del contenuto in β -glucani nei genotipi *Waxy*

Al fine di verificare l'ipotesi riportata in letteratura, che sostiene che la manipolazione degli enzimi di sintesi dell'amido può avere come conseguenza un aumento della produzione di β -glucani, ne è stato misurato il contenuto nei genotipi *Waxy totali* e nei parentali N11 e Svevo. In figura 4.35 è riportata una rappresentazione delle vie biosintetiche dell'amido e dei β -glucani che mette in evidenza alcune possibili relazioni tra i due *pathway* biosintetici (Rudi *et al.*, 2006).

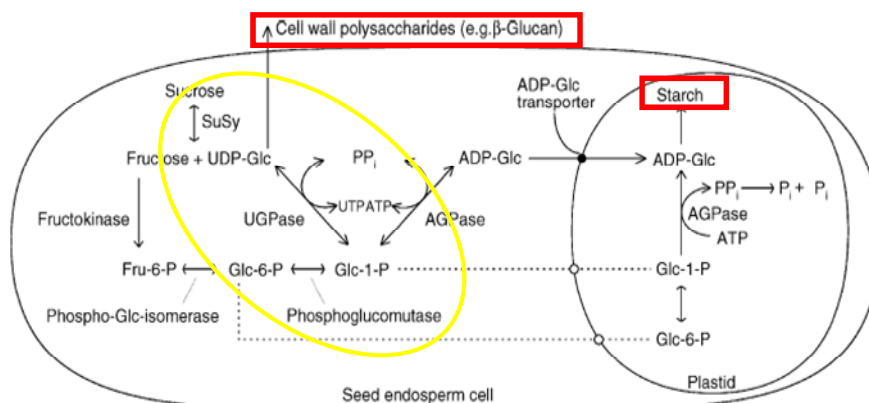


Figura 4.35. Relazione tra le vie biosintetiche dei β -glucani e dell'amido nei cereali (da Rudi *et al.*, 2006).

La concentrazione dei β -glucani è stata misurata utilizzando l'apposito Kit Megazyme. È stato riscontrato un aumento della concentrazione di β -glucani nei genotipi *waxy* completi sia in frumento duro che in frumento tenero (Tab 4.11). Questo risultato fornisce un indizio della presenza di effetti pleiotropici, dovuti all'esistenza di substrati in comune o ad alcuni enzimi coinvolti nella biosintesi delle due classi di carboidrati (Rudi *et al.*, 2006). La misura della quantità di β -glucani non è stata eseguita sui campioni *Sgp1* nulli; tuttavia è stato possibile osservare un forte aumento della parte cruscale a discapito delle rese di amido nei genotipi completi *Sgp-1* nulli sia di frumento tenero che di frumento duro. Questa osservazione sembra in accordo con l'ipotesi dell'esistenza di una forte relazione tra la via biosintetica dell'amido e degli altri carboidrati nell'endosperma.

Tabella 4.11. Determinazione del contenuto in β -glucani nei genotipi *waxy* e nei parentali N11 e Svevo.

Genotipo	β Glucan g/Kg	$\Delta\%$
Svevo W	4,5	33,9
Svevo Waxy	6,1	
N11	5	66,6
N11 Waxy	8,3	

4.7.2.3 Analisi RVA delle linee Waxy

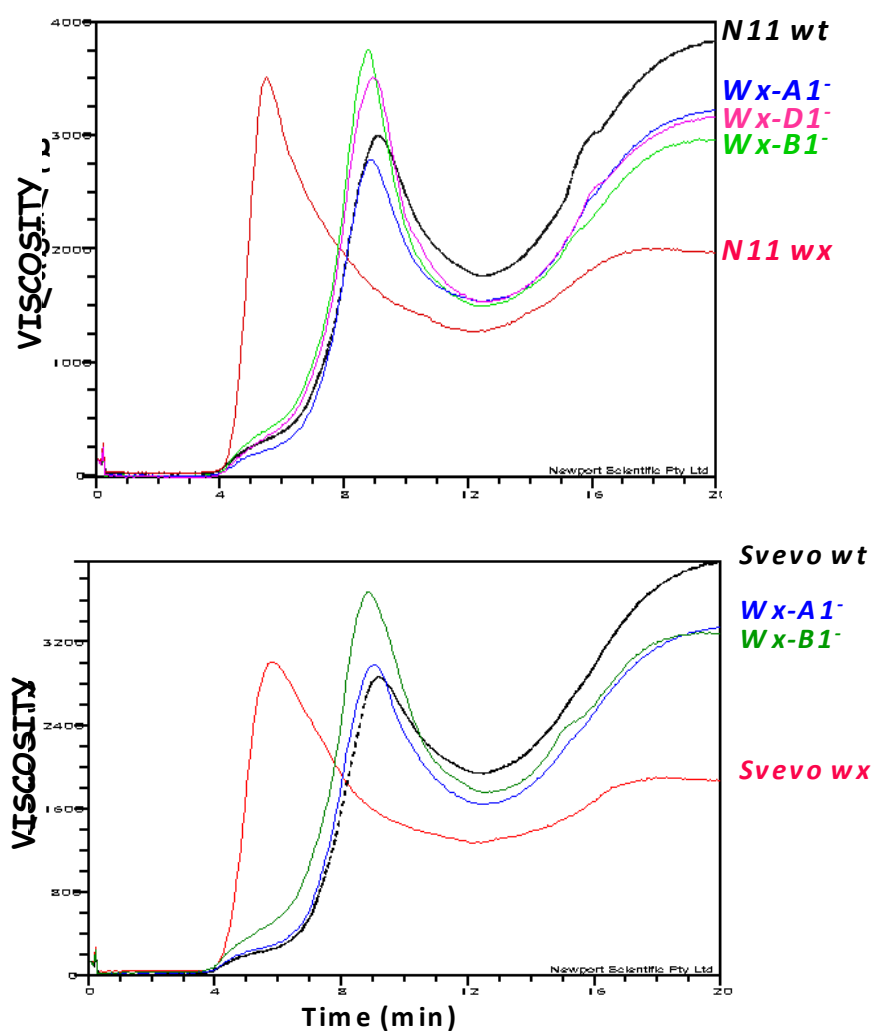


Figura 4.36. Grafici RVA del set di mutanti *waxy* singoli nulli e totali di frumento tenero

Il genotipo *waxy* nulli completo mostra, sia in frumento tenero che in frumento duro, un basso valore di viscosità finale, basso *setback*, elevato *breakdown* e raggiunge il picco di viscosità in tempi più brevi ed a temperature più basse rispetto al genotipo normale (Fig. 4.36, Tab. 4.12; 4.13). Le linee parziali mostrano un andamento della curva di viscosità variabile ma comunque più simile alla linea N11 piuttosto a quella *Waxy* completa. 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, rispetto alle altre isoforme Wx-A1 e Wx-D1, sulla viscosità finale e sugli altri parametri considerati. I valori dei parametri RVA misurati nei diversi genotipi confermano che il rapporto amilosio/amilopectina è il fattore che influisce con maggior efficacia sulle proprietà chimico-fisiche degli amidi.

Tabella 4.12. 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

Tabella 4.13. 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

4.7.2.4 Analisi delle proprietà di gelatinizzazione dell'amido del set di parziali nulli *waxy*

Attraverso l'utilizzo della tecnica di Calorimetria a scansione differenziale sono stati misurati i parametri termodinamici relativi al processo di gelatinizzazione dell'amido elencati di seguito: temperature di transizione (Temperatura di inizio (T_0), Temperatura del picco (T_p), Temperatura finale (T_c)); entalpia di gelatinizzazione (ΔH); entalpia di dissociazione del complesso lipidi-amilosio (ΔH_{LAM}). L'amido addizionato di acqua è stato portato da una temperatura iniziale di 20°C alla

temperatura finale di 150°C alla velocità di 4°C al minuto. Le analisi di calorimetria sono state effettuate in triplicato sui campioni di amido purificato. Sono stati analizzati i profili delle endoterme per i tre genotipi della N11, N11-*Waxy* e il parziale N11 *WxA1⁻/WxB1⁻*.

È stato riscontrato un aumento della temperatura di gelatinizzazione (T_p) e della temperatura finale (T_c) al diminuire del contenuto di amilosio (N11*Waxy*>N11*WxA1⁻/WxB1⁻*>N11) (Tab. 4.14). Allo stesso modo, l'entalpia di gelatinizzazione (ΔH), che rappresenta una misura della cristallinità totale dell'amido, aumenta al diminuire del contenuto di amilosio. In assenza delle regioni amorfe ricche di amilosio è necessaria infatti maggiore energia per determinare il *melting* della struttura cristallina dell'amido. Inoltre, come atteso, è stata verificata l'assenza del picco relativo alla dissociazione del complesso lipidi-amilosio nell'endoterma del genotipo *waxy* (Fig. 4. 37).

Tabella 4.14. Valori dei parametri di DSC determinati per N11, N11*Waxy* e N11*WxA1⁻/WxB1⁻*.

Genotipo	T_p °C	T_c °C	ΔH /g
N11	61, 45	73, 18	12, 59
N11 <i>WxA1⁻/WxB1⁻</i>	63, 4	74, 01	14, 03
N11 <i>Waxy</i>	65, 5	76, 16	16, 27

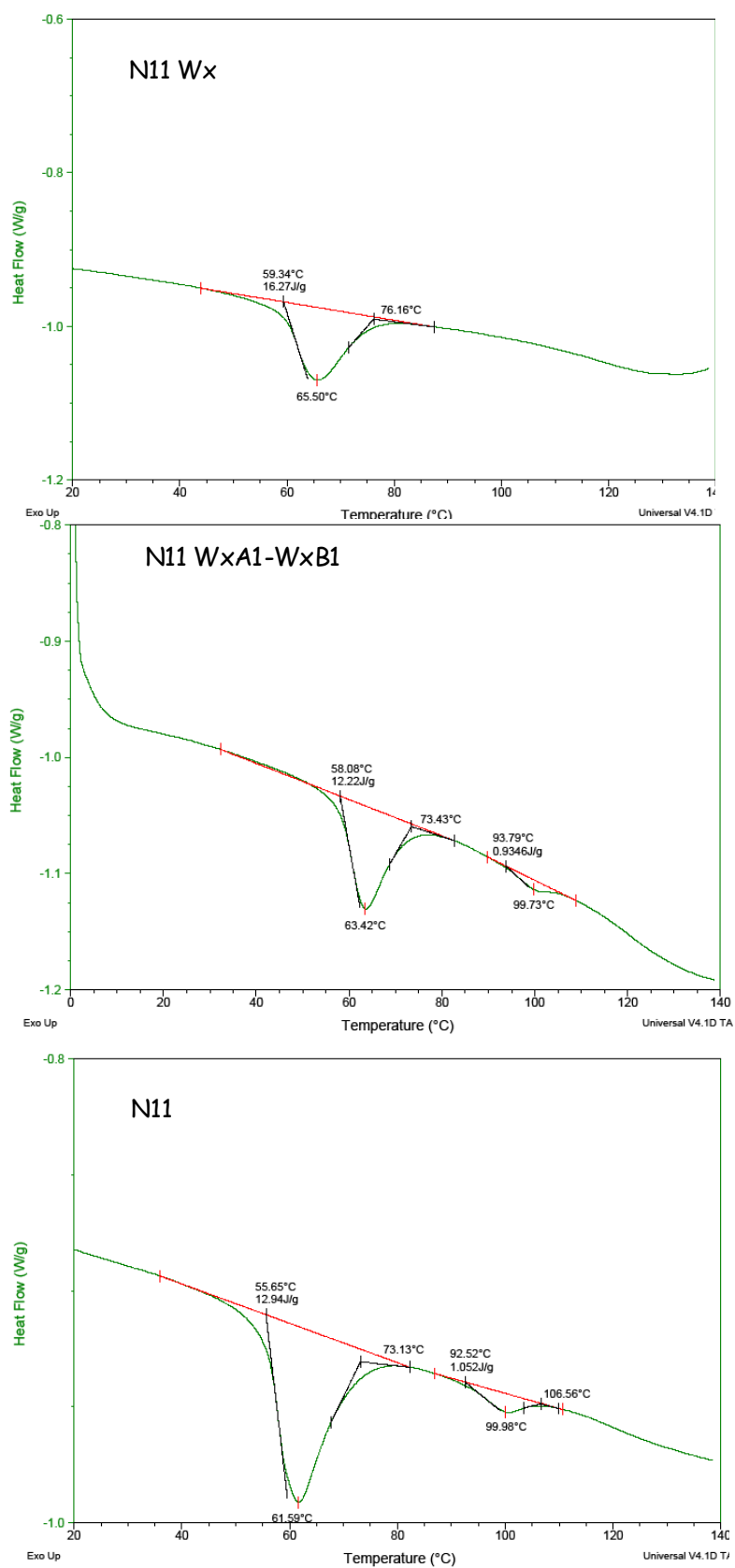


Figura 4.37. Endoterme dell'amido dei genotipi N11Waxy, N11WxA1/WxB1 e N11.

4.7.3 Caratterizzazione di linee di frumento ad alto contenuto di amilosio

4.7.3.1 Determinazione del contenuto di amilosio

Il contenuto di amilosio delle linee *Sgp1* nulli e alcune linee parziali nulli di N11 (Tab. 4.15 e 4.16) è stato misurato su campioni di amido purificato attraverso il metodo comunemente utilizzato per l'isolamento dei granuli di amido. Infatti, a causa della scarsa qualità degli sfarinati dei genotipi *Sgp1* nulli e parziali nulli, in termini di rese di amido, non è stato possibile utilizzare il *dough method*. Per il genotipo completo nulli *Sgp1* di frumento duro è stato osservato un aumento percentuale del contenuto di amilosio rispetto a Svevo dell'87 %; nel mutante *Sgp-1* triplo nulli di frumento tenero il contenuto di amilosio risulta essere incrementato del 31.73% rispetto al genotipo parentale N11, passando dal 23% al 30.3%. In frumento duro la mancanza della proteina *Sgp-B1* è stata associata ad un maggiore aumento del contenuto di amilosio, pari al 29% dell'amido totale, rispetto alla mancanza della proteina *Sgp-A1* (24, 3 % di amilosio).

Tabella 4.15. Contenuto di amilosio delle linee *Sgp1* di frumento duro.

Genotipi	<i>Sgp-A1-</i>	<i>Sgp-B1-</i>	<i>Sgp-A1-B1-</i>	Svevo
Contenuto				
amilosio (%)	24,3	29,1	43,6	23

Tabella 4.16. Contenuto di amilosio delle linee *Sgp1* di frumento tenero.

Genotipi	<i>Sgp-A1-D1-</i>	<i>Sgp-A1-B1-</i>	<i>Sgp-A1-B1-D1-</i>	N11
Contenuto				
amilosio (%)	26,1	24,4	30,3	23

4.7.3.2 Analisi RVA delle linee nulli *Sgp1* di frumento duro e tenero.

Le analisi RVA sono state condotte sugli sfarinati integrali data la difficoltà ad isolare l'amido dai genotipi *Sgp1* nulli.

Le analisi RVA effettuate sulle linee *Sgp-1* nulli parziali e complete di frumento duro confermano l'effetto differente dei due alleli, *Sgp-A1* e *Sgp-B1*, sulle proprietà di "pasting" (Fig. 4.38a).

Gli sfarinati del campione *Sgp-1* completo mostrano profili RVA caratterizzati da valori molto bassi per tutti i maggiori parametri (Tab. 4.17 e 4.18) rispetto ai genotipi parentali Svevo e N11.

I profili RVA dei mutanti singoli nulli di Svevo 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. 4.17). L'amido del mutante singolo nulli *Sgp-B1* ha una curva di viscosità con caratteristiche che si discostano maggiormente da Svevo; ciò avvalorava 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 e contenuto di amilosio.

Per quanto riguarda il set di mutanti *Sgp-I* di frumento tenero, le analisi RVA sono state effettuate sulle 3 linee *SgpI* triplo nulli, l'*Sgp-A1⁻B1⁻* e l'*Sgp-A1⁻D1⁻*. Il campione *Sgp-I* nulli completo ha mostrato un profilo RVA caratterizzato da un drastico crollo di tutti i valori di viscosità.

L'analisi dei parziali nulli *Sgp-A1⁻B1⁻* e *Sgp-A1⁻D1⁻* non ha evidenziato la presenza di un effetto maggiore attribuibile alla mancanza della proteina *Sgp-B1* come è stato verificato nel caso del frumento duro.

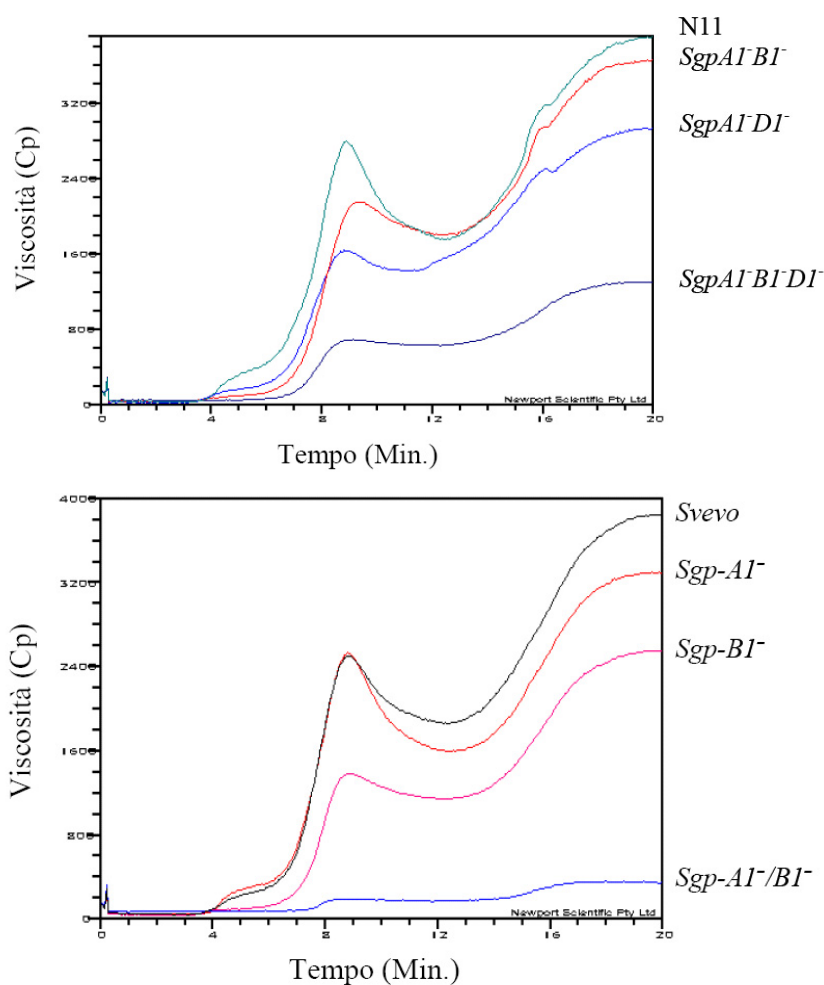


Figura.4.38. Profili RVA del set di *SgpI* di frumento tenero e duro.

Tabella 4.17. Analisi RVA del set di genotipi *Sgp1* in frumento duro.

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

Tabella 4.18. Analisi RVA del set di genotipi *Sgp1* in frumento tenero.

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

4.7.3.3 Determinazione del contenuto di amilosio e dei profili RVA delle linee transgeniche di frumento duro

È stato determinato il contenuto di amilosio e il profilo RVA delle linee di frumento duro transgenico cultivar Svevo e Ofanto trasformati con un costrutto RNAi per il silenziamento dell'enzima SBEIIa (Sestili *et al.*, 2010 *submitted*).

Il silenziamento dei geni codificanti per l'enzima SBEIIa è stato associato ad un incremento di amilosio variabile in un intervallo dal 45% al 75% rispetto al 26% riscontrato in Svevo e Ofanto (Tab. 4.19). Il profilo RVA delle linee MJ16-114 (42% di amilosio) e MJ-112 (70%) è risultato simile alla curva RVA dei genotipi *Sgp1* nulli completi di frumento tenero e frumento duro: il crollo nei valori di viscosità degli sfarinati delle linee transgeniche è risultato correlato alla diminuzione nel contenuto di amilosio.

In generale sia nelle linee *Sgp1* nulli che nelle linee transgeniche MJ è stata confermata l'esistenza di una forte relazione tra il contenuto di amilosio e la capacità dei rigonfiamento dei granuli di amido (vedi Introduzione).

Tabella 4. 19. Contenuto di amilosio delle linee transgeniche di frumento duro varietà Ofanto e Svevo.

Linea	A-434	MJ16-112-	MJ16-114	Svevo
contenuto di				
amilosio (%)	64	75	45	26

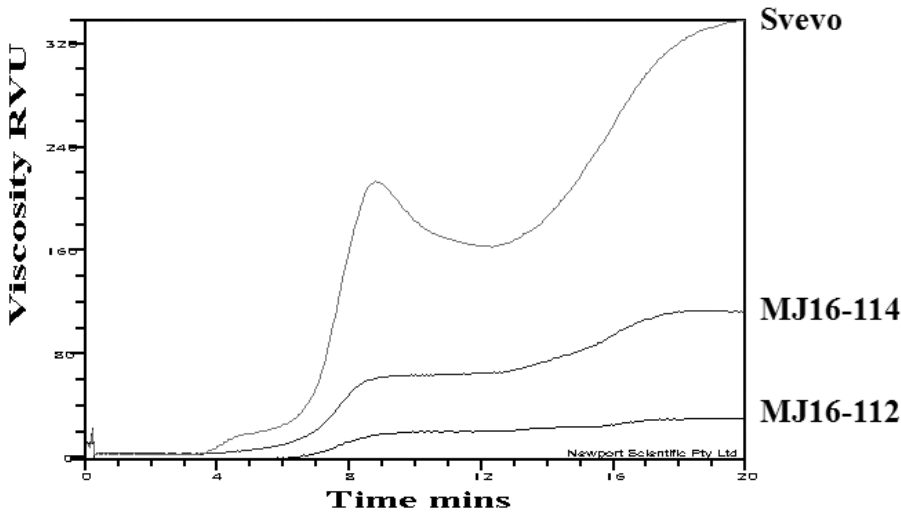


Figura 4.39. Profilo RVA delle linee di frumento duro transgeniche RNAi.

DISCUSSIONE

5 DISCUSSIONE

Reperimento delle risorse genetiche per il TILLING: isolamento e sequenziamento dei geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B*

In frumento i loci *SBEIIa* sono stati recentemente associati a tratti qualitativi di interesse relativi alle proprietà nutrizionali e tecnologiche delle farine. Il silenziamento dei geni *SBEIIa*, attraverso RNAi, ha generato linee transgeniche di frumento tenero e duro caratterizzate da un drastico incremento del contenuto di amilosio (Regina *et al.*, 2006; Sestili *et al.*, 2010, *submitted*). I frumenti *high amylose* presentano amidi con peculiari caratteristiche tecnologiche e di digeribilità apprezzate nell'industria alimentare. In questo lavoro il TILLING, una tecnologia di genetica inversa non transgenica (McCallum *et al.*, 2000), è stato utilizzato per generare nuova variabilità genetica nei loci *SBEIIa* di frumento.

Una risorsa cruciale per l'applicazione del TILLING è la disponibilità di sequenze che permettano di disegnare oligonucleotidi specifici in grado di isolare le sequenze codificanti per la proteina o il dominio proteico di interesse producendo robuste amplificazioni PCR (Comai e Henikoff, 2006). In specie poliploidi come il frumento l'utilizzo del TILLING è subordinato alla possibilità di amplificazioni PCR allele-specifiche e richiede quindi la conoscenza delle sequenze nucleotidiche degli omeologhi codificanti per la proteina di interesse.

Rahman *et al.* (2001) hanno riportato l'esistenza, in frumento tenero, di tre geni codificanti per la proteina *SBEIIa* posizionati sul braccio lungo dei cromosomi 2A, 2B e 2D.

L'allineamento delle sequenze di cDNA, disponibili in Banca Dati, (n° acc. U66376; n° acc.. Y11282, etc), ha evidenziato un elevato grado di conservazione nella regione codificante del gene *SBEIIa* in frumento.

Al fine di identificare regioni caratterizzate da un sufficiente grado di polimorfismo inter-genomico sono state isolate le sequenze genomiche dei due alleli *SBEIIa* localizzati nel genoma A e nel genoma B di frumento tenero. Per lo studio dell'allele del genoma D è stata utilizzata la sequenza genomica isolata da *Ae. tauschii* (*SBEIIa-DA1* n° acc. AF338431 Rahman *et al.*, 2001) considerato il donatore del genoma D al frumento esaploide *T. aestivum*.

L'isolamento dei due alleli è stato possibile grazie alla disponibilità della sequenza di *Ae tauschii* *SBEIIaDA1* e di tre frammenti genomici, corrispondenti alla regione compresa tra l'esone IX e l'esone XII dei geni *SBEIIa*, isolati rispettivamente dal genoma A, B e D di frumento tenero (Konovalov *et al.*, 2008 non pubblicato). L'elevato grado di polimorfismo identificato tra le tre regioni omeologhe ha permesso di disegnare oligonucleotidi genoma specifici che sono stati utilizzati in coppia con oligonucleotidi disegnati nella regione 5' UTR e 3' UTR del gene, utilizzando la sequenza *SBEIIaDA1*

di *Ae. tauschii*. La disponibilità di enzimi di sintesi del DNA di nuova generazione, in grado di amplificare frammenti di PCR di dimensioni superiori a 10 kb, ha infine permesso di isolare i due geni attraverso la produzione di due frammenti PCR sovrapposti (di dimensioni da 4 Kb a 7 Kb) in grado di coprire l'intera sequenza genomica dei due alleli dall'ATG al codone di stop.

La struttura dei due alleli è risultata identica alla struttura del gene *SBEIIaDA1* di *Ae. tauschii*.

Analisi e caratterizzazione dei polimorfismi identificati nei loci *SBEIIa*

L'allineamento delle sequenze nucleotidiche ha evidenziato l'esistenza di un elevato grado di similarità tra le sequenze di cDNA dei tre alleli *SBEIIa-A*, *SBEIIa-B* e *SBEIIa-DA1* (97%-98%).

L'esone I e l'esone II hanno dimensioni differenti nei tre omeologhi a causa della presenza di alcuni polimorfismi di tipo *indel*. Le *indel* identificate sono state localizzate nella regione codificante per il peptide segnale (Nair *et al.*, 1997); questi polimorfismi non influiscono sull'attività della proteina matura ma potrebbero indurre comportamenti differenti delle tre isoproteine nel processo di modificazioni post-traduzionale e compartimentalizzazione all'interno dei tessuti della pianta.

La comparazione delle sequenze genomiche ha rilevato una similarità di circa il 90-91% tra i tre alleli, evidenziando la presenza di un grado di polimorfismo maggiore nelle regioni introniche.

Sono state identificati diversi polimorfismi di tipo *indel* nelle regioni introniche dei tre alleli.

In particolare è stata identificata una inserzione nell'introne IX dell'allele *SBEIIa-A* risultata simile al gene di frumento U3 snRNA e caratterizzata dalla presenza di elementi che suggeriscono che l'inserzione sia stata mediata da un elemento trasponibile di tipo L1 (Konovalov *et al.* 2008). L'interazione tra geni snRNA e elementi L1 è stata riportata, anche, nel genoma umano (Buzdin *et al.*, 2002.).

Il confronto di tale inserzione con la sequenza corrispondente di *T. monococcum*, disponibile in Banca Dati, ha evidenziato una delezione di 56 bp nell'introne IX di *T. monococcum* rispetto alla sequenza del genoma A di *T. aestivum*.

La regione caratterizzata dalla delezione di 56 bp è stata studiata in diversi frumenti poliploidi e nei diploidi *T. urartu*, *T. boeoticum* e *T. monococcum*. L'inserzione è risultata assente nei due frumenti diploidi caratterizzati da genoma A^mA^m e presente in *T. urartu* (A^uA^u). Questo dato avvalorava ulteriormente la tesi che *T. urartu* sia il progenitore del genoma A dei frumenti poliploidi.

L'analisi Blast Search ha rilevato che diverse inserzioni, identificate negli alleli *SBEIIa* dei genomi B e D, presentano un elevato grado di similarità con elementi trasponibili di tipo *Minature Inverted-repeat Transposable Element* (MITE).

Gli elementi trasponibili costituiscono circa l'80% del genoma di frumento (Jiang e Wessler, 2001; Cantrell *et al.*, 2001). Gli elementi MITE hanno dimensioni comprese tra 100-500 bp e vengono

riconosciuti per la presenza di una sequenza caratteristica nota come *Terminal Inverted repeat* e dei siti *Target Site Duplication* TSDs costituiti da due o tre nucleotidi (Mason-Gamer, 2007).

Studi comparativi, eseguiti in precedenza, hanno mostrato che le inserzioni TE non risultano conservate tra i tre genomi di frumento; al contrario porzioni significative di elementi TE sono risultate conservate tra i genomi A e D e i loro rispettivi progenitori *T. urartu* e *Ae. tauschii* (Wicker *et al.*, 2003; Dvorak *et al.*, 2006;).

Uno studio di comparazione tra le gli elementi TE presenti nel locus SPA (*Storage Protein activator*) del genoma S di *Ae. speltoides* e nel genoma B di frumento ha mostrato che nessun TE risultava conservato tra i due genomi (Salse *et al.*, 2008); questo risultato ha portato gli autori a concludere che *Ae. speltoides*, considerato uno degli antenati più vicini al genoma B di frumento, si sia separato molto presto dal progenitore dell'attuale genoma B.

Nel presente studio sono state identificate due inserzioni di tipo MITE localizzate nell'introne XIV e XV dell'allele *SBEIIa* del genoma B.

L'inserzione di tipo MITE localizzata nell'introne XIV appartiene alla famiglia *Stowaway*. La regione del gene interessata dalla presenza dell'elemento MITE-*Stowaway* è stata studiata in diverse accessioni dei frumenti poliploidi selvatici e coltivati e nei diploidi caratterizzati dal genoma SS appartenenti alla sezione *Sitopsis* di *Aegilops*. L'assenza dell'inserzione in tutte le specie con genoma SS ha suggerito che l'inserzione dell'elemento MITE sia stata posteriore alla divergenza del progenitore del genoma B dalle specie della sezione *Sitopsis*. Questo risultato è in accordo con quanto riportato dallo studio di Salse *et al.* (2008). L'elemento MITE è risultato presente nel locus *SBEIIa-G* dei frumenti *T. araraticum* e *T. timophevii* caratterizzati da genoma (AAGG).

Sorprendentemente l'analisi di due accessioni di *T. dicoccoides* e di *T. turgidum* ha rilevato l'assenza dell'inserzione MITE nel frammento isolato dal genoma B che è risultato, al contrario, presente nel coltivato *T. dicoccum*. Questo risultato andrà confermato attraverso l'analisi di un maggior numero di accessioni dei frumenti tetraploidi con genoma AABB. In ogni caso in letteratura è stato riportato che elementi TE della famiglia *Stowaway* siano stati interessati, nell'ambito del tribù delle *Triticeae*, da un complesso processo evolutivo caratterizzato da eventi multipli di inserzioni e delezioni in un singolo locus (Mason-Gamer, 2008). Inoltre è noto dalla letteratura che il genoma B sia stato interessato, durante il processo evolutivo, da una maggiore frequenza di cambiamenti rispetto ai genomi A e D (Wendel, 2000). Un'ipotesi possibile è che l'inserzione dell'elemento MITE nel locus *SBEIIa-B* e G si sia verificata in un antenato del progenitore dei genomi B e G più recente rispetto ai frumenti con genoma SS; l'inserzione potrebbe essere stata persa in *T. durum* a causa dell'elevata attività degli elementi TE. L'inserzione è risultata presente nella specie coltivata *T. dicoccum* (AABB) suggerendo che la perdita dell'elemento MITE non sia stato un evento sistematico nei frumenti con genoma AABB ma abbia interessato alcune sottospecie selvatiche e coltivate.

Selezione delle regioni bersaglio nel TILLING

Le sequenze genomiche dei tre alleli *SBEIIa* rappresentano la “risorsa genetica” alla base del progetto di TILLING descritto nel presente lavoro. Specifiche regioni dei tre alleli sono state analizzate in una popolazione di frumento tenero caratterizzata da un’elevata densità di mutazioni puntiformi indotte dal trattamento mutageno con l’EMS.

Le regioni bersaglio per il TILLING sono state selezionate in base a diversi parametri in grado di fornire una stima della probabilità di identificare “SNP funzionali” nei geni di interesse. Sono considerati “SNP funzionali” le mutazioni in grado di determinare la perdita dell’espressione del gene target (mutazioni non senso e splicing) e le mutazioni missenso che provocano sostituzioni amminoacidiche deleterie per l’attività catalitica dell’enzima di interesse.

Nelle specie poliploidi come il frumento la possibilità di generare cambiamenti apprezzabili del fenotipo è subordinata all’identificazione di mutazioni efficaci in tutte le copie dei geni codificanti per la proteina *target* e alla successiva combinazione dei rispettivi genotipi mutanti. Per tale ragione sono state sottoposte all’analisi di TILLING le tre copie omeologhe del gene *SBEIIa*. Il programma CODDLE è stato utilizzato per l’identificazione delle posizioni amminoacidiche maggiormente conservate e considerate importanti per l’attività catalitica dell’enzima. Tuttavia le impostazioni dell’applicazione CODDLE permettono la selezione di frammenti genici di dimensioni massime fino a 1,5 Kb. In questo studio sono state selezionate regioni target di dimensioni fino ad un massimo di 2,2 Kb, dimostrando la possibilità di ottenere amplificazioni PCR, robuste e specifiche, di frammenti di dimensioni maggiori rispetto a quelle classicamente utilizzate nel TILLING. L’analisi della sequenza genomica ha inoltre evidenziato la presenza di una regione, corrispondente all’esone XVI, che è risultato un bersaglio particolarmente interessante per l’elevata probabilità di generare mutazioni deleterie nonostante sia caratterizzato da dimensioni molto ridotte dell’ordine di 200 bp.

Applicazione dell’High Resolution Melting per l’identificazione di SNP nel TILLING

Il presente lavoro rappresenta una delle prime applicazioni dell’HRM nell’identificazione di mutazioni puntiformi nel TILLING. Lo studio di Gady *et al.* (2009), pubblicato lo scorso ottobre, ha riportato l’utilizzo di tale metodologia nel TILLING in pomodoro. Uno studio molto recente (Dong *et al.*, 2009) ha descritto l’applicazione dell’HRM in frumento tenero. In quest’ultimo lavoro gli autori hanno combinato l’HRM con l’utilizzo di un *software* per l’analisi di sequenza in grado di discriminare la presenza di mutazioni puntiformi in amplificazioni PCR non allele specifiche.

La tecnica dell’HRM è adatta all’analisi di frammenti di dimensioni fino a 400 bp (Reed e Wittwer, 2004).

Nel presente lavoro sono stati sottoposti all’analisi HRM frammenti di DNA allele specifici, di dimensioni comprese tra 150 e 400 bp, ottenuti attraverso una strategia di Nested PCR. I frammenti

analizzati corrispondono ciascuno alla regione di un singolo esone. Sebbene il TILLING classico, basato sull'utilizzo dell'enzima *Cell*, consenta di analizzare frammenti di DNA dell'ordine di 1.5 kb, questo metodo porta all'identificazione di numerose mutazioni localizzate nelle regioni non codificanti del gene (Slade *et al.*, 2005). L'utilizzo dell'HRM è risultato ideale per l'analisi dei geni *SBEIIa*, che presentano esoni di piccole dimensioni (da 43 a 242 bp) separati da estese regioni introniche, in quanto ha consentito di identificare, prevalentemente, SNP localizzati nella regione codificante del gene.

È stata calcolata una densità di mutazioni, associata alla popolazione di frumento analizzata, dell'ordine di 1 SNP ogni 36 Kb analizzati. Questo valore è risultato leggermente migliore della frequenza di mutazione, precedentemente attribuita alla stessa popolazione, calcolato da studi basati sul TILLING classico (1 SNP/ 40 kb) (Parry *et al.*, 2009). Questo dato dimostra che l'HRM rappresenta una tecnica efficiente nelle applicazioni di TILLING negli organismi vegetali.

L'HRM è un saggio *closed-tube* che viene eseguito direttamente sui frammenti PCR e non prevede alcun processamento post PCR degli ampliconi; tale tecnica offre vantaggi in termini di costi e soprattutto di tempo rispetto agli altri metodi di identificazione di mutazione utilizzati nel TILLING (Hofinger *et al.*, 2009). Sebbene il costo degli strumenti HRM sia paragonabile a quelli del 4300 DNA Analyzer (Li-Cor) o al dHPLC WAVEtm system (Transgenomic) comunemente utilizzati nel TILLING, il metodo HRM offre notevoli vantaggi nel risparmio di materiale consumabile perché non richiede analisi su gel o di cromatografia liquida degli ampliconi. L'analisi al Light Scanner richiede inoltre al massimo 10 min per generare le curve di melting degli ampliconi e l'identificazione dei profili mutanti.

Le specie poliploidi come il frumento hanno un'elevata capacità di tolleranza al trattamento mutageno che risulta in un'elevata densità di mutazioni indotte nel genoma (Parry *et al.*, 2009); per questo motivo l'utilizzo di pool costituiti da due genotipi è sufficiente a garantire una buona efficienza nell'identificazione degli SNP. L'utilizzo di pool di dimensioni maggiori aumenta il *through-put* dell'analisi; l'HRM è risultato abbastanza sensibile da identificare gli SNP in pool costituiti da cinque genotipi (Hofinger *et al.*, 2009),

Hofinger *et al.* (2009) hanno riportato che l'HRM risulta poco efficiente nell'identificazione di SNP localizzati a meno di venti nucleotidi di distanza dagli oligonucleotidi PCR. I risultati del nostro studio sembrano confermare questa tesi, in quanto, sono state identificate solo due mutazioni localizzate nei siti di *splicing*, posizionati all'estremità dell'amplicone, ed, in entrambi i casi, la loro distanza dagli oligonucleotidi PCR è risultata maggiore di 20 nucleotidi. Per alcuni degli ampliconi analizzati nel nostro studio gli oligonucleotidi PCR erano stati disegnati attraverso il software HRM Primer Design che prevede una regione *buffer*, tra gli oligonucleotidi e le estremità di *splicing* dell'esone, di circa 5 nucleotidi; questa caratteristica potrebbe spiegare la bassa percentuale di SNP identificati nei siti di *splicing* degli esoni analizzati.

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

Sono state generate nuove serie alleliche per ciascuno dei tre loci *SBEIIa*.

L'analisi delle nuove varianti alleliche ha consentito di individuare diversi polimorfismi localizzati nei domini conservati dell'enzima di ramificazione. La disponibilità dei genotipi caratterizzati da quest'ultime mutazioni rappresenta una risorsa di interesse per studi di natura biochimica tesi a stabilire il ruolo svolto da singole posizioni amminoacidiche nell'attività catalitica della proteina. Inoltre tali mutazioni rappresentano una fonte di nuova variabilità genetica che potrebbe originare fenotipi di interesse.

Tuttavia la potenzialità maggiore del TILLING è la generazione di mutanti *knock-out* ossia di genotipi caratterizzati dalla perdita dell'espressione del gene di interesse. Il vantaggio associato alle mutazioni deleterie è la possibilità di prevedere l'effetto sulla funzionalità della proteina target. In generale questo aspetto risulta vantaggioso negli studi di genomica funzionale tesi a stabilire il ruolo svolto dalla proteina studiata. Il TILLING presenta diversi vantaggi rispetto ad altre tecniche di genetica inversa come, ad esempio, la mutagenesi inserzionale. L'applicazione della mutagenesi inserzionale implica l'utilizzo di tecniche di trasformazione e rigenerazione delle piante, processi mal tollerati dai cereali. Inoltre tale approccio non permette di generare serie alleliche ma unicamente mutanti *loss of function*.

Il TILLING è stato, inoltre, riconosciuto un valido strumento per il miglioramento delle colture e in particolare del frumento (Slade *et al.*, 2005). I mutanti EMS sono caratterizzati da polimorfismi a singolo nucleotidi che hanno un effetto poco invasivo nel genoma della specie target. Le varietà generate attraverso il TILLING non sono sottoposte a norme restrittive in quanto non transgeniche; il rilascio di varietà generate attraverso tale tecnologia risulta molto più semplice di quello delle varietà prodotte con approcci transgenici quali, ad esempio, l'RNAi (Regina *et al.*, 2006; Sestili *et al.*, 2010, *submitted*).

In questo lavoro sono state generate varianti alleliche caratterizzate dalla presenza di SNP deleteri per i tre omeologhi del gene *SBEIIa* di frumento. In particolare sono stati identificati due piante di frumento che presentano un codone di stop nell'allele *SBEIIa-A* e due genotipi, rispettivamente con un codone di stop e una mutazione nel sito di splicing, per ciascuno dei due alleli *SBEIIa-B* e *SBEIIa-D*.

La disponibilità di mutanti *loss of function* per il gene *SBEIIa* rappresenta una risorsa di forte interesse applicativo. La perdita dell'espressione del gene *SBEIIa* in frumento è stata precedentemente associata ad un fenotipo di interesse. Le piante di frumento tenero e duro, caratterizzate dal silenziamento dei geni *SBEIIa*, prodotte da Regina *et al.* (2006) e Sestili *et al.* (2010) con la tecnica dell'RNAi, hanno mostrato valori del contenuto di amilosio superiori al 70% dell'amido totale contro il 25-28 % tipico delle varietà normali. Elevate percentuali di amilosio sono state associate all'incremento di una

frazione di amido caratterizzato da una struttura resistente all'azione degli enzimi digestivi umani. L'“amido resistente” è un composto bioattivo che svolge diverse funzioni benefiche sulla salute umana e previene importanti malattie legate a disturbi alimentari (vedi Introduzione).

In questo lavoro sono state analizzate le linee di frumento transgeniche RNAi prodotte da Sestili *et al.*, (2010, submitted). La misura del contenuto di amilosio delle piante transgeniche ha rivelato che linee caratterizzate da un diverso grado di silenziamento del gene presentano diverse percentuali di amilosio dal 45% al 70% dell'amido totale. Attualmente sono in corso gli esperimenti di incrocio tra i mutanti singoli nulli *SBEIIa-A*, *SBEIIa-B* e *SBEIIa-D*. La generazione di un set di genotipi nulli e parziali nulli per gli alleli *SBEIIa* permetterà, anche in questo caso, l'ottenimento di una serie fenotipica caratterizzata da diversi valori del contenuto di amilosio.

PCR Marker Assisted Selection per la selezione delle mutazioni nel programma di incrocio

L'utilizzo di strategie di *Marker Assisted Selection* (MAS) rappresenta uno strumento largamente consolidato nei programmi di *breeding* moderni.

In questo lavoro sono stati messi a punto due saggi di tipo MAS per l'identificazione degli alleli nulli *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* nella progenie (M3) dei genotipi (M2) utilizzati nell'analisi di screening. Il saggio relativo all'identificazione dell'allele nullo *SBEIIa-D* non è stato descritto in quanto le piante, attualmente, non sono state analizzate. I saggi sono basati sulla presenza, nell'allele di interesse, di siti di riconoscimento per enzimi restrizione che permettono di discriminare il genotipo mutante omozigote da quelli eterozigoti e wild type. Qualora assente nella sequenza, il sito di restrizione è stato introdotto attraverso amplificazioni PCR basate sull'utilizzo di *primers* dCAPs (Neff *et al.*, 1998). Questi saggi saranno utilizzati per la selezione della progenie degli incroci tra i tre genotipi singoli nulli *SBEIIa-A*, *SBEIIa-B* e *SBEIIa-D* attualmente in corso.

Analisi dei trascritti nei mutanti singoli nulli generati attraverso il TILLING

L'analisi dei trascritti dell'allele del genoma A nei due mutanti singoli nulli *SBEIIa-A*¹ e *SBEIIa-A*² non ha rilevato la presenza di alcun prodotto PCR visibile nei due mutanti nulli. Saito e Nakamura (2005) hanno riportato un risultato simile nel caso di un mutante naturale *Wx-A1* caratterizzato dalla presenza di un codone di stop all'interno della sequenza del gene. Al contrario il mutante naturale *waxy* di orzo (Patron *et al.*, 2002), caratterizzato da una delezione nella regione 5' UTR, presentava lo stesso livello di trascritti riscontrato nel genotipo wild type. Zhu *et al.* (2005) hanno caratterizzato una linea di frumento priva della glutenina HMW Bx14 prodotto con la mutagenesi chimica. La sequenza del gene codificante per la Bx14 presentava un codone di stop; anche in questo caso l'analisi del

trascritto del gene ha rilevato la presenza di livelli simili nel genotipo mutante e nel *wild type*. In *Arabidopsis* una linea di una collezione di mutanti inserzionali, priva dell'enzima SSIV, ha mostrato livelli normali dell'espressione del trascritto corrispondente (Roldan et al., 2007).

Nel nostro caso, l'assenza della banda dei trascritti dei due mutanti singoli nulli suggerisce che l'mRNA sia stato riconosciuto e degradato attraverso un processo noto come *nonsense-mediated RNA decay* (NMD) (Cai et al., 1998). NMD costituisce un meccanismo di controllo qualità dell'mRNA che previene l'accumulo di proteine tronche degradando mRNA aberranti. Nei mammiferi questo meccanismo è stato ampiamente studiato. Nei mammiferi il sistema NMD agisce solo nel caso in cui la mutazione nonsense sia posizionata a più di 55 nucleotidi a monte dell'ultima giunzione esone-esone; l'NMD non entra in azione nel caso di geni privi di introni (Maquat, 2004).

Negli organismi vegetali il sistema NMD non è stato ben caratterizzato. Sono noti, in pianta, esempi di degradazione dei trascritti nel caso di mutazioni non senso localizzate in geni privi di introni (Jofuku et al. 1989). Sono inoltre stati riportati diversi esempi di riduzione dei livelli di mRNA per geni con introni; in questi casi il codone di stop risultava localizzato ad una distanza maggiore di 55 nucleotidi dall'ultima giunzione esone-esone (Dehesh et al., 1993; Marchant and Bennett, 1998; Isshiki et al. 2001; Saito e Nakamura, 2005). Nei nostri mutanti *SBEIIa-A'1* e *SBEIIa-A'2* le mutazioni non senso sono posizionate ad una distanza maggiore di 55 nucleotidi dall'ultima giunzione esone-esone; lo stesso vale per le mutazioni deleterie identificate per gli alleli *SBEIIa-B* e *SBEIIa-D*.

Studio del fenotipo di linee di frumento caratterizzate da alterazioni del pathway biosintetico dell'amido

L'assenza di uno o più isoforme della proteina waxy, in frumento è stata precedentemente associata a fenotipi caratterizzati da una diminuzione del contenuto di amilosio (Yamamori et al 2000).

Le misure del contenuto di amilosio nei set di linee *waxy* e parziali *waxy* di frumento ha rilevato un drastico crollo nei genotipi *waxy* totali di frumento tenero e frumento duro; i mutanti parziali presentano valori di amilosio lievemente ridotti. Questo dato suggerisce un possibile effetto di compensazione svolto dalle isoproteine attive nei mutanti parziali.

L'analisi RVA dei set di parziali nulli ha rilevato, sia in frumento tenero che duro, che la mancanza delle diverse isoproteine waxy è associata a proprietà viscoelastiche differenti nei rispettivi genotipi. Il singolo nullo *Wx-B1* ha mostrato il profilo di viscosità più simile ai genotipi totali nulli sia in frumento tenero che in frumento duro. Nei genotipi *waxy* completi è stata riscontrata una tendenza a raggiungere il valore di massima viscosità in tempi più brevi rispetto ai genotipi normali e parziali; il valore di viscosità finale, indice del livello di retrogradazione dell'amido, è risultato significativamente ridotto nei genotipi *waxy* completi. I mutanti parziali hanno in generale mostrato valori di viscosità finale intermedi tra il genotipo nullo e quello normale; non è stata al contrario osservata la tendenza a

raggiungere il picco di viscosità in tempi minori rispetto al *wild type*. Questo comportamento è in accordo con i dati relativi al contenuto di amilosio misurato nel set di linee waxy. Questi dati confermano il ruolo prioritario dell'amilosio nel processo di retrogradazione dell'amido; la diminuzione dell'amilosio provoca una diminuzione della percentuale di amido retrogradato e di conseguenza dei valori di viscosità finale. Lo *shift* dei profili RVA a temperature minori è dovuta all'assenza dei complessi amilosio lipidi e alla diminuzione di energia necessaria a indurre la gelatinizzazione dell'amido. L'assenza del complesso amilosio lipidi è stata confermata nel genotipo waxy totale di tenero dalle analisi di DSC.

È stato registrato un forte aumento della percentuale dei β -glucani nei due genotipi waxy completi di frumento tenero e duro. Questo risultato fornisce un indizio della presenza di effetti pleiotropici, dovuti all'esistenza di substrati in comune o ad alcuni enzimi coinvolti nella biosintesi delle due classi di carboidrati (Rudi *et al.*, 2006). Inoltre l'aumento di β -glucani potrebbe costituire un valore aggiunto per le varietà waxy a causa dell'effetto benefico delle fibre alimentari sulla salute umana (Rudi *et al.*, 2006).

La mancanza delle tre isoproteine Sgp1 in frumento tenero è stata associata a un significativo aumento dell'amilosio da Yamamori *et al.* (2000).

In questo studio è stato caratterizzato un set di mutanti *Sgp-I* nulli parziali e completi di frumento tenero e frumento duro. La misura del contenuto di amilosio della linea *Sgp-I* nulli completa di frumento tenero ha confermato il dato di Yamamori *et al.* 2000, evidenziando un livello di amilosio pari al 35 % rispetto al 25 % del wild type. Il genotipo *Sgp-I* nulli completo di frumento duro ha mostrato un aumento maggiore dell'amilosio risultato pari al 43% dell'amido totale. Inoltre l'analisi delle linee parziali di frumento duro ha rilevato un incremento maggiore dell'amilosio nel genotipo *Sgp-B1*, suggerendo un ruolo predominante di questa isoforma nella sintesi dell'amilopectina. L'analisi RVA dei genotipi Sgp1 nulli completi ha rilevato un drastico crollo di tutti i valori di viscosità. In frumento duro l'analisi RVA dei parziali ha confermato l'ipotesi che la proteina Sgp-B1 abbia un ruolo maggioritario rispetto all'isoforma Sgp-A1.

Sono state inoltre caratterizzate le linee transgeniche di frumento duro prodotte da Sestili *et al.*, 2010.

Il silenziamento del gene *SBEIIa*, ottenuto attraverso la tecnologia dell'RNAi, ha prodotto diverse linee di frumento duro con elevati valori di amilosio compresi in un intervallo tra il 45% e il 70% dell'amido totale.

Questi dati confermano quanto riportato da Regina *et al.* (2006). Le linee transgeniche in generale hanno mostrato valori del contenuto di amilosio maggiori rispetto ai genotipi *Sgp-I* nulli; inoltre tali linee presentano rese paragonabili al genotipo normale. Al contrario le cariossidi del genotipo Sgp-1 nulli mostrano rese inferiori e il caratteristico fenotipo raggrinzito. L'analisi RVA delle linee RNAi ha

inoltre confermato che elevate percentuali di amilosio determinano un drastico crollo di tutti i valori di viscosità. La produzione di un set di nulli parziali e completi nulli *SBEIIa* e la disponibilità di linee di frumento transgeniche prive dello stesso enzima *SBEIIa* (Sestili et al., 2010, *submitted*) permetterà di effettuare analisi di comparazione interessanti per stabilire le differenze e le analogie associate a piante generate attraverso approcci transgenici e non transgenici. Studi di questo tipo possono dare un contributo di conoscenza utile alla risoluzione delle diverse problematiche, di natura sociale e legislativa, associate agli organismi OGM.

CONCLUSIONI

6 CONCLUSIONI

In questo lavoro di dottorato, è stata realizzata la produzione, in frumento, di genotipi di interesse attraverso l'utilizzo di una tecnologia di genetica inversa di nuova generazione, il TILLING.

Recentemente il TILLING è stato largamente utilizzato come strumento di miglioramento delle specie coltivate. Slade *et al.* (2005) hanno riportato la generazione di nuova variabilità genetica nei loci *waxy* dimostrando l'efficienza del TILLING nella produzione di linee di frumento caratterizzate da amidi con nuove proprietà e di interesse applicativo. In Dong *et al.* (2009) sono state prodotte nuove serie alleliche per i geni che codificano le proteine PinA e PinB coinvolte nel controllo della "hardness" della cariosside, un'altra caratteristica importante per la qualità del frumento tenero. La diffusione delle applicazioni del TILLING alle specie cerealicole e, in particolare, al frumento, è dovuta ad una serie di vantaggi legati alle potenzialità della tecnica e alla natura dei cereali. Il TILLING e la mutagenesi chimica permettono, al contrario di altri approcci quali la mutagenesi inserzionale, la produzione di numerosi varianti alleliche del gene target associate a diversi livelli di alterazione del fenotipo corrispondente; le nuove serie alleliche rappresentano un'opportunità sia per gli studi di genomica funzionale sia per la produzione di fenotipi con caratteristiche intermedie tra il *wild-type* e il mutante *knock-out*. Inoltre la mutagenesi chimica non prevede l'utilizzo di tecnologie transgeniche; questo aspetto risulta vantaggioso in ragione della natura recalcitrante delle maggiori specie cerealicole ai processi di trasformazione e rigenerazione in vitro (Baylan *et al.*, 2008). Le varietà prodotte con il TILLING non sono soggette ad alcuna legislazione restrittiva particolare come previsto, al contrario, per le varietà OGM.

La poliploidia di specie come il frumento comporta un'elevata capacità di tolleranza ai trattamenti di mutagenesi classica che consente la produzione di popolazioni ad elevata densità di mutazioni; inoltre le popolazioni TILLING rappresentano uno strumento unico per lo studio di mutazioni letali per la pianta, in quanto, la maggior parte di tali mutazioni vengono comunque conservate in uno stato eterozigote.

Altro vantaggio del TILLING è rappresentato dalla possibilità di generare nuova variabilità genetica utilizzando varietà commerciali già esistenti delle specie coltivate. Gli organismi selvatici rappresentano un'importante fonte di variabilità genetica che ha consentito la produzione di numerose varietà con caratteristiche agronomiche o qualitative migliorate (vedi Introduzione). Tuttavia queste specie presentano caratteri agronomici non desiderati che le rendono meno adatte ai moderni programmi di breeding rispetto alle moderne specie coltivate.

In questo lavoro il TILLING è stato utilizzato per generare nuove varianti alleliche nei loci *SBEIIa* di frumento tenero.

I geni *SBEIIa* rappresentano un target di interesse per la produzione di linee di frumento caratterizzate da amidi *high amylose*. Il fenotipo *high amylose*, nei cereali, ha recentemente suscitato l'interesse di diversi programmi di miglioramento per le sue potenzialità di produrre alimenti ricchi in amido resistente, un componente bioattivo che apporta notevoli benefici alla salute umana. L'amido resistente è un componente ad azione prebiotica e stimola la produzione di SCFA, in particolare il butirrato, composti che contribuiscono al mantenimento dei colonociti e alla prevenzione di importanti malattie come il cancro. Inoltre l'aumento della percentuale di amido non digerito contribuisce alla diminuzione dell'indice glicemico degli alimenti e rappresenta una nuova opportunità nella gestione di diverse malattie legate a disturbi alimentari, molto diffuse nel mondo occidentale.

In particolare sono state generate nuove serie alleliche per i tre omeologhi codificanti l'enzima di ramificazione *SBEIIa*. In totale sono state generate 59 nuove varianti alleliche per il gene *SBEIIa-A*, 14 per il gene *SBEIIa-B* e 49 per il gene *SBEIIa-D*. È stato possibile selezionare mutanti caratterizzati dalla modificazione in posizioni amminoacidiche conservate negli enzimi di ramificazione dell'amido che rappresentano una risorsa di interesse per studi di natura biochimica tesi a stabilire il ruolo svolto da singoli amminoacidi nell'attività catalitica della proteina. Il TILLING è risultato efficiente per la produzione di mutanti *loss of function* caratterizzati dalla perdita dell'espressione dei geni *SBEIIa*.

In questa Tesi di Dottorato sono stati identificati 6 mutanti *knock-out*, due per ciascun allele *SBEIIa*. L'analisi RT-PCR dei due mutanti *Knock-out SBEIIa-A* ha confermato una drastica riduzione dell'espressione dell'allele target.

Le linee di frumento *SBEIIa-A⁻*, *SBEIIa-B⁻* *SBEIIa-D⁻* saranno combinate per la produzione di un fenotipo nulli completo che ci si attende sia caratterizzato da un significativo aumento del contenuto di amilosio. Al fine di selezionare gli alleli di interesse nella progenie degli incroci tra i tre genotipi *SBEIIa-A⁻*, *SBEIIaB⁻*, *SBEIIa-D⁻* sono stati messi appunto saggi di PCR Marker Assisted Selection basati sull'utilizzo di oligonucleotidi dCAPS.

L'applicazione della strategia di TILLING è subordinata alla disponibilità delle opportune risorse genetiche. Quindi in un'ottica di TILLING sono stati isolati e sequenziati i due geni *SBEIIa-A* e *SBEIIa-B* non disponibili in Banca Dati. L'analisi dei polimorfismi inter-genomici rilevati e il confronto con diverse specie del genere *Triticum* e *Aegilops* ha prodotto nuovi indizi sulle relazioni che intercorrono tra gli attuali frumenti coltivati e i loro antenati. È stata identificata e caratterizzata un'inserzione dell'allele *SBEIIa-A* risultata presente in tutti i frumenti poliploidi e nel diploide *T. urartu* e assente nei diploidi con genoma A^mA^m; questo risultato rappresenta un'ulteriore evidenza

che la specie selvatica *T. urartu* (A^uA^u) rappresenti il progenitore dei frumenti poliploidi. L'assenza dell'inserzione *transposon like*, identificata nel gene *SBEIIa-B* di *aestivum*, nelle specie diploidi con genoma SS è in accordo con quanto osservato da altri autori (Salse *et al.*, 2008) che hanno verificato l'assenza di conservazione di elementi MITE tra il genoma B dei moderni frumenti coltivati e il loro antenato, il genoma S di *Ae. speltoides*. Inoltre la mancanza di conservazione dell'inserzione tra le diverse sottospecie analizzate dei frumenti tetraploidi con genoma AABB potrebbe, se confermata, costituire un'ulteriore evidenza della maggiore suscettibilità ai cambiamenti del genoma B rispetto ai genomi A e D. La conservazione dell'inserzione nei frumenti con genomi AAGG potrebbe indicare che l'evento di inserzione si sia verificato in un antenato comune ai genomi A e B più recente di *Ae. speltoides*.

Il crescente interesse per le potenzialità della tecnologia del TILLING ha prodotto recentemente lo sviluppo di nuove ed efficienti metodologie per l'identificazione delle mutazioni puntiformi nel genoma vegetale. A partire dallo scorso anno sono stati riportati alcuni esempi di applicazione della tecnica dell'High Resolution Melting per l'identificazione delle mutazioni nelle specie vegetali (vedi Introduzione). In letteratura sono ad oggi disponibili due esempi di applicazione dell'HRM allo screening di popolazioni mutagenizzate con EMS: Gady *et al.* (2009) e Dong *et al.* (2009) rappresentano i primi esempi di applicazione dell'HRM nel TILLING in due specie coltivate, rispettivamente, il pomodoro, caratterizzato da genoma diploide, e il frumento esaploide. Il confronto dei due studi ha confermato la differente efficienza della strategia TILLING nelle specie diploidi e poliploidi, dovuta alla maggiore tolleranza di queste ultime alle mutazioni.

Nel presente lavoro è stata confermata l'efficienza dell'HRM nelle applicazioni di TILLING. L'HRM è risultato efficiente nell'individuazione degli SNP e vantaggioso in termini di costi, tempi e facilità di esecuzione. Infatti in un'ottica di analisi *high-throughput* il tempo e i costi dell'analisi rappresentano fattori importanti per la fattibilità dello studio.

Infine la disponibilità di diversi genotipi, caratterizzati da varie alterazioni del pathway biosintetico dell'amido, ha consentito di migliorare la conoscenza delle relazioni intercorrenti tra gli enzimi chiave e le caratteristiche chimico fisiche dell'amido e ad aumentare la conoscenza delle relazioni tra diverse vie biosintetiche presenti nell'endosperma. Sono inoltre stati ottimizzati diverse metodiche per l'analisi delle caratteristiche chimico fisiche dell'amido che saranno in seguito utilizzate per la caratterizzazione del set di linee nulli parziali e completi *SBEIIa* attualmente in via di produzione.

BIBLIOGRAFIA

7 BIBLIOGRAFIA

- Aaronsohn A.** (1910). Agricultural and botanical explorations in Palestine. *Bulletin N° 180 USDA Bureau of Plant Industry, Washington DC.*
- 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.
- Aldoori W, Giovannucci E, Rockett H, Sampson L, Rimm E, Willett W.** (1998). A prospective study of dietary fiber types and symptomatic diverticular disease in men. *J Nutr.* 128: 714-719.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Sci.* 301: 653-657.
- Ao Z, Jane JL.** (2007). Characterization and modeling of the A-and B-granule starches of wheat, triticale, and barley. *Carbohydr Polym.* 67: 46-55.
- Båga M, Glaze S, Mallard CS, Chibbar RN.** (1999a). A starch-branching enzyme gene in wheat produces alternatively spliced transcripts. *Plant Mol Biol.* 40: 1019-1030.
- Båga M, Repellin A, Demeke T, Caswell K, Leung N, Abdel-aal ESM, Hucl P, Chibbar RN.** (1999b). Wheat starch modification through biotechnology. *Starch.* 51: 111-116.
- Båga M, Nair R B, Repellin A, Scoles GJ, Chibbar RN.** (2000). Isolation of a cDNA encoding a granule-bound 152-kilodalton starch-branching enzyme in wheat1 *Plant Physiol.* 124: 253-264.
- Baik BK, Ullrich SE.** (2008). Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *J Cereal Sci.* 48: 233-242.
- Bailey LB, Clark HE.** (1976). Plasma amino acids and nitrogen retention of human subjects who consumed isonitrogenous diets containing rice and wheat or their constituent amino acids with and without additional lysine. *Am J Clin Nutr.* 21: 827-835.
- Baima S.** (2005). Plant genomics and plant breeding: at the root of human nutrition and health. *Curr Top Nutra Res.* 3: 95-112.
- Baldwin PM.** (2001). Starch granule-associated proteins and polypeptides: a review. *Starch.* 53: 475-503.
- Ball SG, Morell MK.** (2003). From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Ann Rev Plant Biol.* 54: 207-233.

- Balmer Y, Vensel WH, Cai N, Manieri W, Schurmann P, Hurkman WJ, Buchanan BB.** (2006). A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 2988-2993.
- Balyan HS, Sreenivasulu N, Riera-Lizarazu O, Azhaguvel P, Kianian F.** (2008). Mutagenesis and high-throughput functional genomics in cereal crops: Current status. *Adv in Agron*. 98: 357-417.
- Banks W, Greenwood CT, Muir DD.** (1973). Studies on the biosynthesis of starch granules. Part 5: properties of the starch components of normal barley, and barley with starch of high amylose-content, during growth. *Starch* 25: 153–156.
- Batista R, Saibo N, Lourenco T, Oliveira MM.** (2008). Microarray analysis reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 3640-3645.
- Baulcombe DC.** (2004) RNA silencing in plants. *Nat*. 431: 356-363.
- Bello-Pérez LA, Paredes-López O.** (1994). Starch and amylopectin—rheological behavior of gels. *Starch*. 46: 411-413.
- Bettge AD, Morris CF, Greenblatt GA.** (1995). Assessing genotypic softness in single wheat kernels using starch granule-associated friabilin as a biochemical marker. *Euphytica* 86: 65-72.
- Bertoft E.** (1991). Investigation of the fine structure of alpha-dextrines derived from amylopectin and their relationship to the structure of waxy maize. *Carbohydr Res*. 212: 229-244.
- Biliaderis CG, Seneviratne HD.** (1990). On the supermolecular structure and metastability of glycerol monostearate-amylose complex. *Carbohydr. Polym*. 13: 185-206.
- Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon, F, Kesse E, Nieters, A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou, A, Naska A, Vineis, P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita, HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans, G, Lund E, Skeie G, Kaaks, R, Riboli E.** (2003). European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European prospective Investigation into cancer and Nutrition. (EPIC): an observational study. *Lancet*. 361: 1496-1501.
- Bird A R, Brown I L, Topping D L.** (2000). Starches, Resistant Starches, the Gut Microflora and Human Health. *Curr Issues Intest Microbiol*. 1: 25-37.
- Bjorck HJ, I, Ostrouska S, Eliasson AC, Asp NG, Larsson K.** (1983) Digestibility of amylose-lipid complexes in vitro and in vivo. *Starch*. 35: 294-297.

Blake NK, Leheldt BR, Lavin M, Talbert LE. (1999). Phylogenetic reconstruction based on low copy DNA sequence data in an allopolyploid: the B genome of wheat. *Genome* 42: 351-360.

Blakeney AB, Cracknell RL, Crosbie GB. (1995). Hierarchical Cluster Analysis of Wheat End-use Qualities. *Proc. of the 45th Austr. Cereal Chem. Conference.* 95: 534-537.

Blazek J, Copeland L. (2008). Pasting and swelling properties of wheat flour and starch in relation to amylose content. *Carbohydr Polym.* 71: 380–387.

Blauth SL, Kim KN, Klucinec J, Shannon JC, Thompson D, Guiltinan M. (2002). Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (sbe1) in *Zea mays* L. *Plant Mol Biol.* 48: 287-297.

Blauth SL, Yao Y, Klucinec JD, Shannon JC, Thompson DB, Guiltinan MJ. (2001). Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn *Plant Physiol.* 125: 1396-1405.

Blazek J, Salman H, Lopez-Rubio A, Gilbert EP, Hanley T, Copeland L. (2009). Structural characterization of wheat starch granules differing in amylose content and functional characteristics. *Carbohydr Polym.* 75: 420-427.

Blennow A, Hansen M, Schulz A, Jørgensen J, Donald AM, 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.

Boltz KW, Thompson DB. (1999). Initial Heating Temperature and Native Lipid Affects Ordering of Amylose During Cooling of High-Amylose Starches. *Cereal Chem.* 76: 204-212.

Bresolin NS, Li Z, Kosar-Hashemi B, Tetlow IJ, Chatterjee M, Rahman S, Morell M K, Howitt C A. (2005). Characterisation of disproportionating enzyme from wheat endosperm. *Planta.* 224: 20-31.

Brown IL, Wang X, Topping DL, Playne MJ, Conway PL. (1998). High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria. *Food Australia.* 50: 603-610.

Brown-Guedira GL, Badaeva ED, Gill BS. (1996). Chromosome substitutions of *Triticum timopheevii* in common wheat and some observations on the evolution of polyploid wheat species. *Theor Appl Genet.* 93: 1291-1298.

Burkitt DP. (1970). Relationship as a clue to causation. *Lancet* 2: 1237-1240.

Burton RA, Bewley JD, Smith AM, Bhattacharyya MK, Tatge H, Ring S, Bull V, Hamilton WDO, Martin C. (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *Plant J.* 7: 3-15.

- Burton RA, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher GB, Hylton C, Laurie DA, Parker Bustos R, Fahy B, Hylton CM, Seale R, Nebane NM, Edwards A, Martin C, Smith AM.** (2004). Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 2215-20.
- Burton RA, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher GB, Hylton C, Laurie DA, Parker M, Waite D, van Wegen S, Verhoeven T, Denyer, K.** (2002). Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J*. 31: 97–112.
- Bustos R, Fahy B, Hylton CM, Seale R, Nebane NM, Edwards A, Martin C, Smith AM.** (2004). Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 2215–2220.
- Buzdin A, Ustyugova S, Gogvadze E, Vinogradova T, Lebedev Y, Sverdlov E.** (2002). A new family of chimeric retrotranscripts formed by a full copy of U6 small nuclear RNA fused to the 3' terminus of L1. *Genomics*. 80: 402-406.
- Cai XL, Wang ZY, Xing YY, Zhang JL, Hong MM.** (1998). Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of waxy gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *Plant J*. 14: 459-465.
- Caldwell DG, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer GJ, Marshall DF, Waugh R.** (2004). A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley. (*Hordeum vulgare* L). *Plant J*. 40: 143-150.
- Candido EPM, Reeves R, Davies JR.** (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell*. 14: 105-113.
- Cantrell MA, Filanoski BJ, Ingermann AR, Olsson K, DiLuglio N, Lister Z, Wichman HA.** (2001). An ancient retrovirus-like element contains hot spots for SINE insertion. *Genetics*. 158.: 769-777.
- Carthew RW.** (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol*. 13: 244-248.
- Chagne D, Gasic K, Crowhurst RN, Han Y, Bassett HC, Bowatte DR, Lawrence TJ, Rikkerink EHA, Gardiner SE, Korban SS.** (2008). Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. *Genomics* 92: 353-358.
- Chanvrier H, Appelqvist IAM, Bird AR, Gilbert E, Htoon A, Li Z, Lillford P J, Lopez-Rubi A, Morell M K, Topping DL.** (2007). Processing of Novel Elevated Amylose Wheats: Functional Properties and Starch Digestibility of Extruded Products. *J Agric Food Chem*. 55: 10248-10257.

- Chao S, Sharp PJ, Worland AJ, Warham EJ, Koebner RMD, Gale MD.** (1989). RFLPbased genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet* 78: 495-504.
- Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS, Webb C.** (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *Int J Food Microbiol.* 79: 131-141.
- Chiotelli E, Le Meste M.** (2002). Effect of small and large wheat starch granules on thermomechanical behavior of starch. *Cereal Chem.* 79: 286-293.
- Chou LS, Lyon E, Wittwer CT.** (2005). A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model. *Am J Clin Pathol.* 124: 330-338.
- Chrastil J.** (1987). Improved colourimetric determination of amylose in starches of flours. *Carbohydr Res.* 159: 154-158.
- Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S.** (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.* 126: 480-484.
- Colleoni C, Dauvillee D, Mouille G, Buleon A, Gallant D, Bouchet B, 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 MC, 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.
- Comai L, Henikoff S.** (2006). TILLING: Practical single-nucleotide mutation discovery. *Plant J.* 45: 684-94.
- Comai L, Young K, Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Henikoff S.** (2004). Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by EcoTILLING. *Plant J.* 37: 778-786.
- Cracknell RL, Crosbie GB, Blakeney AB, Miskelly D, O'Brien L, Quai KJL, Westcott CT, Williams RM.** (2005). Commonalities in quality requirements of wheat products. *Proc 55th Aust Cereal Chem Conference.*

- Critchley JH, Zeeman SC, Takaha T, Smith AM, Smith SM.** (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis. *Plant J.* 26: 89-100.
- Cross MJ, Waters DLE, Lee LS, Henry R.** (2008). Endonucleolytic mutation analysis by internal labeling. (EMAIL). *Electrophoresis.* 29: 1291-1301.
- Croxford AE, Rogers T, Caligari PDS, Wilkinson MJ.** (2008) Highresolution melt analysis to identify and map sequence-tagged site anchor points onto linkage maps: a white lupin (*Lupinus albus*) map as an exemplar. *New Phytol.* 180:594–607.
- Crowe TC, Seligman SA, Copeland L.**(2000). Inhibition of enzymic digestion of amylose by free fatty acids in vitro contributes to resistant starch formation. *J Nutr.* 130: 2006-2008.
- Cummings JH, Beatty ER, Kingman S M, Bingham SA, Englyst HN.** (1996). Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Brit J Nutr.* 75: 733-747.
- Darlington HF, Rouster J, Hoffman L, Halford NG, Shewery PR, Simpson DJ.** (2001). Identification and molecular characterization of hordoin dolines from barley grain. *Plant Mol Biol.* 47: 785-794.
- Debet MR, Gidley MJ.** (2006). Three classes of starch granule swelling: influence of surface proteins and lipids. *Carbohydr. Polym.* 64(3): 452-465.
- Dehesh K, Franci C, Parks BM, Seeley KA, Short TW, Tepperman JM, Quail PH.** (1993). Arabidopsis HY8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* 5:1081-1088.
- Delatte T, Trevisan M, Parker ML, Zeeman SC.** (2005). Arabidopsis mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J.* 41: 815-30.
- Delvalle D, Dumez S, Wattebled F, Roldan I, Planchot V, Berbezy P, Colonna P, Vyas D, Denyer K, 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, Hylton CM, Jenner CF, Smith, AM.** (1995). Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm. *Planta.* 196: 256-265.
- Denyer K, Dunlap F, Thorbjornsen T, Keeling P, Smith A M.** (1996). The major form of ADPglucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial *Plant Physiol.* 112: 779-785.

- Denyer K, Waite D, Edwards A, Martin C, Smith, AM.** (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 BL, Smith AM.** (1999b). Granule-bound starch. synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochem J.* 340: 183-191.
- Dewettinck K, Van Bockstaele F, Kühne B, Van de Walle D, Courtens T M, Gellynck X.** (2008). Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *J Cereal Sci.* 48: 243-257.
- Dexter JE, Matsuo RR.** (1978). The influence of temperature and light traction rate on semolina characteristics and spaghetti quality. *Cereal Chem.* 58: 841-852.
- 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: 261-268.
- 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.
- Dong C, Dalton-Morgan J, Vincent K, Sharp P.** (2009). A modified TILLING method for wheat breeding. *Plant Gen.* 2: 10-12.
- Dong C, Vincent K, Sharp S.** (2009). Simultaneous mutation detection of three homoeologous genes in wheat by High Resolution Melting analysis and Mutation Surveyor. *BMC Plant Biol.* 9: 143.
- Donovan JW.** (1979). Phase transitions of the starch-water system. *Biopolym.* 18: 263-275.
- Doublier L, Llamas G.** (1993). A rheological description of amylose-amylopectin mixtures. In: *Food colloids and polymers: stability and mechanical properties*. E Dickinson and P Waslstra, Eds. Royal Chemical Society, Cambridge, UK. 138-146.
- Dubcovsky J, Dvorak J.** (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploidy wheat under domestication. *Sci.* 316: 1862-1866.
- Dvorak J, McGuire PE, Cassidy B.** (1988). Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* 30: 680-689.
- Dvorak J, Zhang HB.** (1990). Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 9640-9644.

Dvorak J, Akhunov ED, Akhunov AR, Deal KR, Luo MC. (2006). Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat. *Mol Biol Evol.* 23: 1386-96.

EC, 2006 Regulation. (EC). No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *O J. L* 12: 3-18.

Edwards A, Vincken JP, Suurs L, Visser, RGF, Zeeman S, Smith A, Martin C. (2002). Discrete forms of amylose are synthesized by isoforms of GBSSI in pea. *Plant Cell.* 14: 1767-1785.

Ellis RP, Cochrane MP, Dale MFB, Duffus CM, Lynn A, Morrison IM, Prentice RDM, Swanston JS, Tiller SA. (1998). Starch production and industrial use. *J Sci Food Agric.* 77: 289-311.

Feldman M. (1995). Wheats In: *Evolution of crop plants*. Smartt J, Simmonds NW, Eds Harlow, UK: Longman Scientific and Technical. 185-192.

Feldman M. (2001). Origin of cultivated wheat. In: *The world wheat book: a history of wheat breeding*. Bonjean AP, Angus WJ, Eds Paris, France: Lavoisier Publishing. 3-56.

Freire A, Podczec F, Veiga F, Sousa J. (2009). Starch-based coatings for colon-specific delivery Part II: Physicochemical properties and in vitro drug release from high amylose maize starch films C. *Eur J Pharmac Biopharmac.* 72: 587-594.

Fu D, Uauy C, Blechl A, Dubcovsky J. (2007). RNA interference for wheat functional gene analysis *Transgenic Res.* 16: 689-701.

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: 1070-1084.

Gady ALF, Hermans FWK, Van de Wal MHB, van Loo EN, Visser RGF, Bachem CWB. (2009). Implementation of two high through-put techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant populations. *Plant Methods.* 5: 13.

Gallant DJ, Bouchet B, Baldwin, PM. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr Polym.* 32: 177-191.

Gao M, Wanat J, Stinard PS, James MG, Myers AM. (1998). Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell.* 10: 399-412.

- Genschel U, Abel G, Lorz H, Lutticke S.** (2002). The sugary-type isoamylase in wheat: tissue distribution and subcellular localization. *Planta*. 214: 813-820.
- Gianibelli, MC, Sissons, MJ, Batey, IL.** (2005). Effect of source and proportion of waxy starches on pasta cooking quality. *Cereal Chem*. 82: 321-327.
- Gidley MJ, Bulpin PV.** (1987). Crystallization of malto-oligosaccharides as models of the crystalline forms of starch. *Carbohydr Res*. 161: 291-300.
- Gidley MJ.** (1989). Molecular mechanisms underlying amylose aggregation and gelation. *Macromolecules*. 22: 351-358.
- Giroux MJ, Morris CF.** (1997). A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theor Appl Genet*. 95: 857-864.
- Giroux MJ, Morris CF.** (1998). Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 6262-6266.
- Godwin D, Williams SB, Pandit PS, Laidlaw HKC.** (2009). Multifunctional grains for the future: genetic engineering for enhanced and novel cereal quality. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 45: 383-399.
- Greenblatt GA, Bettge AD, Morris CF.** (1995). The relationship among endosperm texture, friabilin occurrence, and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chem*. 72: 172-176.
- Greenwell, P, Scholfield, J D.** (1986). A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat *Cereal Chem*. 63: 379-380.
- Gupta PK, Mir RR, Mohan A, Kumar J.** (2008). Wheat genomics: present status and future prospects. *Int J Plant Genomics*. 2008: 896451.
- Guraya HS, Kadan RS Champagne ET.** (2005). Effect of rice starch-lipid complexes on in vitro digestibility, complexing index, and viscosity. *Cereal Chem*. 74: 561-565.
- Gustafsson, Å.** (1947). Mutation in agricultural plants. *Hereditas*. 33: 1-100.
- Harn C, Knight M, Ramakrishnan A, Guan HP, Keeling PL, Wasserman BP.** (1998). Isolation and characterization of the zSSIa and zSSIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Mol Biol*. 37: 639-649.
- Hay FR, Probert R J.** (1995). Seed maturity and the effect of different drying conditions on desiccation tolerance and seed longevity in foxglove (*Digitalis purpurea* L). *Annals of Botany*. 76: 427-639.

- Hay RKM.** (1995). Harvest index-A review of its use in plant breeding and crop physiology. *Ann App Biol.* 126: 197.
- Henry RJ.** (2004). Genetic Improvements of Cereals. *Cereal Foods World.* 49: 122.
- Henry RJ.** (2007). 'Genomics as a tool for cereal chemistry. *Cereal Chem.* 84: 365-369.
- Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV.**(2006). Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem.* 52: 494-503.
- Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV.** (2007). Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem.* 53: 1544-1548.
- Heun M, Schafer-Pregl R, Klawan D, Castagna R, Accerbi M, Borghi B, Salamini F.** (1997). Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Sci.* 278: 1312-1314.
- Hirose T, Terao T** (2004). A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice. (*Oryza sativa* L). *Planta* 220: 9-16.
- Hizukuri S, Maehara Y.** (1990). Fine structure of wheat amylopectin: the mode of A to B chain binding. *Carbohydr Res.* 206: 145-159.
- Hofinger BJ, Jing HC, Hammond KE, Kanyuka K.** (2009). High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley. *Theor Appl Genet.* 119: 851-865.
- Huang S, Sirikhachornkit A, Su X.** (2002). Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 8133-8138.
- Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P.** (2002). Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploidy wheat *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 8133-8138.
- Huber KC, BeMiller J N.** (2000). Channels of maize and sorghum starch granules *Carbohydr Polym.* 41: 269-276.
- Hung PV, 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.

- Hug-Iten S, Handschin S, Conde-Petit B, Escher F.** (1999). Changes in starch microstructure on baking and staling of wheat bread. *Food Sci Technol.* 32: 255-260.
- Imparl-Radosevich JM, Nichols DJ, Li P, McKean AL, Keeling PL, Guan HP.** (1999). Analysis of purified maize starch synthases IIa and IIb: SS isoforms can be distinguished based on their kinetic properties. *Arch Biochem Biophys.* 362: 131-138.
- Isshiki M, Yamamoto Y, Satoh H, Shimamoto K.** (2001). Nonsense-mediated decay of mutant waxy mRNA in rice. *Plant Physiol.* 125: 1388-1395.
- James MG, Robertson DS, Myers AM.** (1995). Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell.* 7: 417-429.
- Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M.** (2005). Trends in the Leading Causes of Death in the United States. *JAMA* 294: 1255-1259.
- Jenkins, Donald AM.** (1998). Gelatinisation of starch: A combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. *Carbohydr Res.* 308: 133-147.
- 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.
- Jiang N, Wessler SR.** (2001). Insertion preference of maize and rice miniature inverted repeat transposable elements as revealed by the analysis of nested elements. *Plant Cell.* 13: 2553-2564.
- Jobling SA, Schwall GP, Westcott RJ, Sidebottom CM, Debet M, Gidley MJ, Jeffcoat R, Safford R.** (1999). A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum* L) tubers has a major effect on starch structure: cloning and characterisation of multiple forms of SBE A. *Plant. J.* 18: 163-171.
- Jofuku KD, Schipper RD, Goldberg RB.** (1989). A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. *Plant Cell.* 1: 427-435.
- Johnson BL, Dhaliwal HS.** (1976). Reproductive isolation of *T boeoticum* and *T urartu* and the origin of the tetraploid wheats. *Am J Bot.* 63: 1088-1094.
- Johnson PE, Patron NJ, Bottrill AR, Dinges JR, Fahy BF, Parker ML, Waite DN.** (2003). A low-starch barley mutant, Riso 16, lacking the cytosolic small subunit of ADPglucose pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform and the identity of the plastidial small subunit. *Plant Physiol.* 131: 684-696.

- Jolly CJ, Rahman S, Kortt AA, Higgins TJV.** (1993). Characterization of the wheat Mr 15000 "grain-softness protein" and analysis of the relationship between its accumulation in the whole seed and grain softness. *Theor. Appl. Genet.* 86: 589-597.
- Joppa LR., Williams ND.** (1988). Langdon durum disomic substitution lines and aneuploid analysis in tetraploid wheat. *Genome.* 30: 222-228.
- Kaur N, Street K, Mackay M, Yahiaoui N, Keller B.** (2008). Molecular approaches for characterization and use of natural disease resistance in wheat. *Eur J Plant Pathol.* 121: 387-397.
- Keetels CJAM, Van Vliet T, Walstra P.** (1996). Gelation and retrogradation of concentrated starch systems: 1 Gelation. *Food Hydrocolloids.* 10: 343-353.
- Keetels C, Oostergetel G T, van Vliet T.** (1996). Retrogradation of amylopectin in concentrated starch gels. *Carbohydr Polym.* 30: 61-64.
- Kihara H.** (1944). Discovery of the DD-analyzer, one of the ancestors of vulgare wheats. *Agric. Hortic.* 19: 889-890.
- Kilian B, Ozkan H, Deusch O.** (2007). Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes, *Mol Biol Evol.* 24: 217-227.
- Kochko A, Hamon S.** (1990). A rapid and efficient method for the isolation of restrictable total DNA from plants of the genus *Abelmoschus*. *Plant Mol Biol Reprtr.* 8: 3-7.
- Kong BW, Kim JI, Kim MJ, Kim JC.** (2003). Porcine pancreatic α -amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area. *Biotechnol Prog.* 19: 1162-1166.
- Konovalov FA, Shaturova AS, Kudryavtsev AM.** (2008). The sequence polymorphism of SBEIIa gene in wheat. *Proc 11th Int Wheat Genet Symp.*
- 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.
- Körnicker F.** (1889). Über *Triticum vulgare* var *dicoccoides* Bericht Über den Zustand und die Tätigkeit der Niederrheinischen Gesselschat für Natur und Heilkunde. (in Bonn). *Während des Jahres.* 1888 21.

Lafiandra D, Sestili F, D'Ovidio, R Janni M, Botticella E, Ferrazzano G, Silvestri M Ranieri, R, DeAmbrogio E. (2010). Approaches for Modification of Starch Composition in Durum Wheat. *Cereal Chem.* 87: 28-34.

Lehmensiek A, Sutherland MW, McNamara RB. (2008) The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. *Theor Appl Genet.* 117: 721–728.

Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Bird AR, Jackson, M, Esterman, A, Young, GP. (2005). A symbiotic combination of resistant starch and Bifidobacterium lactis facilitates apoptotic deletion of carcinogendamaged cells in rat colon. *J Nutr.* 135: 996-1001.

Leloup VM, Colonna P, Ring SG. (1991). α -Amylase adsorption on starch crystallites. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 127-134.

Leszczynski W. (1987). New methods for determination of starch gelatinization temperatures. *Starch* 39: 375-378.

Leterrier M, Holappa LD, Broglie K E, Beckles DM. (2008). Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: Functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biol.* 8: 98.

Li ZY, Chu XS, Mouille G, Yan LL, Kosar-Hashemi B, Hey S, Napier J, Shewry P, Clarke B, Appels R, Morell MK, Rahman S. (1999). The localization and expression of the class II starch synthases of wheat. *Plant Physiol.* 120: 1147-1155.

Li ZY, Mouille G, Kosar-Hashemi B, Rahman S, Clarke B, Gale KR, Appels R, Morell MK. (2000). The structure and expression of the wheat starch synthase III gene. Motifs in the expressed gene define the lineage of the starch synthase III gene family. *Plant Physiol.* 123: 613-624.

Liu Q, Gu Z, Donner E, Tetlow I, Emes M. (2007). Investigation of digestibility in vitro and physicochemical properties of A-and B-type starch from soft and hard wheat flour. *Cereal Chem.* 84: 15-21.

Lloyd JR, Tomlinson K, Barber L, Edwards A, Wang TL, Martin C, Hedley CL, Smith AM. (1998). Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* 10: 413-426.

Loukoianov A, Yan L, Blechl A, Sanchez A, Dubcovsky J. (2005). Regulation of VRN-1 vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat. *Plant Physiol.* 138: 2364-2373.

- Mackey J.** (1954). The biological action of mustards on dormant seeds of barley and wheat. *Acta Agric Scand.* 4: 419-429.
- Mackay JF, Wright CD, BonWglioli RG.** (2008) A new approach to varietal identiWcation in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the veriWcation of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods.* 4:8.
- Maquat LE.** (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 89-99.
- Marchant A, Bennett MJ.** (1998). The Arabidopsis AUX1 gene: a model system to study mRNA processing in plants. *Plant Mol Biol.* 36: 463-471.
- Marx J.** (2000). Interfering with gene expression. *Sci.* 288: 1370-1372.
- Mascie-Taylor NCG, Karim E.** (2003). The Burden of Chronic Disease. *Sci.* 302: 1921-1922.
- Mathers JC, Mickleburgh I, Chapman P C, Bishop D T, Burn J.** (2003). Can resistant starch and/or aspirin prevent the development of colonic neoplasia? *Proc Nutr Soc.* 62: 51-57.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S.** (2000). Targeted screening for induced mutations *Nat Biotechnol.* 18: 455-457.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S.** (2000). Targeting induced local lesions in genomes. (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123: 439-442.
- McFadden ES, Sears ER.** (1946). The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J Hered.* 37: 81-89.
- Mikkelsen R, Baunsgaard L, Blennow A.** (2004). Functional characterization of alphaglucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem J.* 377: 525-32.
- Miles MJ, Morris VJ, Ring SG.** (1985). Gelation of amylose. *Carbohydr Res.* 135: 257-269.
- Mouille G, Maddelein ML, Ball S.** (1996). Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell* 8: 1353-1366.
- Miller HE, Rigelhof F, Marquart L.** (2000). Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J Am Coll Nutr.* 19: 312S-319S.
- 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.

- 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.
- Mochida K, Yamazaki Y, Ogihara Y.** (2003). Discrimination of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags. *Mol Gen Genomics.* 270: 371-377.
- Mohammadkhani A, Stoddard FL, Marshall DR.** (1998). Survey of amylose content in *Secale cereale*, *Triticum monococcum*, *T. turgidum* and *T tauschii*. *J Cereal Sci.* 28: 273-280.
- Mouille G, Maddelein ML, Ball S.** (1996). Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell* 8: 1353-1366.
- Morell MK, Blennow A, Kosar-Hashemi B, Samuel MS.** (1997). Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. *Plant Physiol.* 113: 201-208.
- Morell MK, Kosar-Hashemi B, Cmiel M, Samuel MS, Chandler P, Rahman S, Buleon A, Batey IL, Li ZY.** (2003). Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant J.* 34: 172-184.
- Morell MK, Mukai Y, Rahman S.** (2003). The starch branching enzyme I locus from *Aegilops tauschii*, the donor of the D genome to wheat. *Funct Integr Genomics.* 3: 69-75.
- Morell MK, Konik-Rose C, Ahmed R, Li Z and Rahman S.** (2004). Synthesis of resistant starches in plants. *J AOAC Int.* 87: 740-748.
- Mori N, Liu Y-G, Tsunewaki K.** (1995). Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA 2 Wild tetraploid wheats. *Theor Appl Genet.* 90: 129-134.
- Morita N, Maeda T, Miyazaki M, Yamamori M, Miura H, Ohtsuka I.** (2002). Dough and baking properties of high-amylose and waxy wheat flours. *Cereal Chem.* 79: 491-495.
- Morris CF, Greenblatt GA, Bettge AD, Malkawi HI.** (1994). Isolation and characterization of multiple forms of friabilin. *J Cereal Sci.* 2: 167-174.
- Morrison WR.** (1988). Lipids in cereal starches: a review. *J Cereal Sci.* 8: 1-15.
- Morrison WR.** (1995). Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Foods World.* 40: 437-446.

- Mouille G, Maddelein M L, Ball S.** (1996). Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell*. 8: 1353-1366.
- Nair RB, Baga M, Scoles GJ, Kartha KK, Chibbar RN.** (1997). Isolation, characterization and expression analysis of a starch branching enzyme II cDNA from wheat. *Plant Sci*. 122: 153-163.
- Nakamura, T, M Yamamori, 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.
- Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S.** (1993). Decrease of Waxy (Wx) protein in two common wheat cultivars with low amylose content. *Plant Breed*. 111: 99-105.
- Nakamura Y.** (2003). Starch-Branching Enzyme I-Deficient Mutation Specifically Affects the Structure and Properties of Starch in Rice Endosperm. *Plant Physiol*. 133: 1111-1121.
- Neff MM, Neff JD, Chory J, Pepper AE.** (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J*. 14: 387-392.
- Neff MM, Turk E, Kalishman M.** (2002). Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet*. 18: 613-615.
- 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.
- Nishikawa K.** (1983). Species relationship of wheat and its putative ancestors as viewed from isozyme variation. *Proc 6th Int. Wheat Genet. Symp. Kyoto* 59-63.
- Nugent AP.** (2005). Health properties of resistant starch. *Nutr Bulletin*. 30: 27-54.
- Oda S, Komae K, Yasui T.** (1992). Relation between starch granule protein and endosperm softness in Japanese wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Jpn J Breed*. 42: 161-165.
- Ohdan T, Francisco PB Jr, Sawada T, Hirose T, Terao T, Satoh H, Nakamura Y.** (2005) Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J Exp Bot* 56: 3229-3244.
- Paravouri P, Manelius R, Suortti T, Bertoft E, Autio K.** (1997). Effect of enzymatically modified amylopectin on the rheological properties of amylose-amylopectin mixed gels. *Food Hydrocolloids*. 4: 471-477.

- Parker ML.** (1985). The relationship between A-type and B-type starch granules in the developing endosperm of wheat. *J Cereal Sci* 3: 271-278.
- Park SH, Wilson JD, Chung OK, Seib PA.** (2004). Size distribution and properties of wheat starch granules in relation to crumb grain score of pup-loaf bread. *Cereal Chem.* 81: 699-704.
- Park SH, Chung OK, Seib PA.** (2005). Effects of varying weight ratios of large and small wheat starch granules on experimental straight-dough bread. *Cereal Chem.* 82: 166-172.
- Parry MAJ, Madgwick PJ, Bayon C, Tearall K, Lopez AH, Baudom, Rakszegi M, Hamada W, Al-Yassin A, Ouabbou H, Labhilili H, Phillips A.** (2009). Mutation discovery for crop improvement. *J Exp Bot.* 60: 2817-2825.
- Patron NJ, Smith AM, Fahy BF, Hylton CM, Naldrett MJ, Rosnagel BG, Denyer K.** (2002). The altered pattern of amylose accumulation in the endosperm of low-amylose barley cultivars is attributable to a single mutant allele of granule-bound starch synthase I with a deletion in the 5'-non-coding region *Plant Physiol.* 130: 190-198.
- Peat S, Whelan WJ, Thomas GJ.** (1952). Evidence of multiple branching in waxy maize starch. *J Chem Soc.* 4: 4546-4548.
- Peng M, Gao M, Baga M, Hucl P, Chibbar RN.** (2000). Starch-branching enzymes preferentially associated with A-type starch granules in wheat endosperm. *Plant Physiol.* 124: 265-72.
- Plaami SP.** (1997). Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. *Food Rev Int.* 13: 29-76.
- Planchot V, Colonna P, Buleon A, Gallant D.** (1997). Amylolysis of starch granules and α -glucan crystallites In: *Starch: Structure and functionality*. P J Frazier, A M Donald e P Richmond, Eds. The Royal Society of Chemistry, London. 141-152.
- Preiss J.** (1991). Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. In: *Oxford Survey of Plant Molecular and Cellular Biology*. Miflin, B.J. Eds Oxford University Press Oxford, UK. 7: 59-114.
- Preiss J, Sivak M.** (1996). Starch synthesis in sinks and sources In: *Photoassimilate distribution in plants and crops: sink-source relationships*. Zamski E, Schaffter AA, Eds New York: Marcel Dekker 63-96.
- Raghavan C, Naredo MEB, Wang HH, Atienza G, Liu B, Qiu FL, McNally KL, Leung H.** (2007). Rapid method for detecting SNPs on agarose gels and its application in candidate gene mapping. *Mol Breed.* 19: 87-101.

Rahman S, Kosar-Hashemi B, Samuel MS, Mili A, Abbott DC, Skerritt JH, Preiss J, Appels R, Morell M. (1995). The major proteins of wheat endosperm starch granules. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 793-803.

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, 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.

Reddy I, Seib PA. (2000). Modified waxy wheat starch compared to modified waxy corn starch. *J Cereal Sci.* 31: 25-39.

Reed GH, Wittwer CT. (2004). Sensitivity and specificity of single nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem.* 50: 1748-1754.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* 8: 597-608.

Regina A, Kosar-Hashemi B, Li Z, Rampling L, Cmiel M, Gianibelli MC, Konik-Rose C, Larroque O, Rahman S, Morell MK. (2004). Multiple Isoforms of Starch Branching Enzyme-I in Wheat: Lack of the Major Sbe-I Isoform Does Not Alter Starch Phenotype. *Funct Plant Biol.* 31: 591-601.

Regina A, Kosar-Hashemi B, Li, Pedler A, Mukai Y, Yamamoto M, Gale K, Sharp PJ, Morell MK, Rahman S. (2005). Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-syntenic locus. *Planta.* 222: 899-909.

Regina A, Bird A, Topping D, Freeman S, Barsby T, Kosar-Hashemi B, Rahman S, Morell, M. (2006). High-amylose wheats generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 3546-3551.

Ring SG Colonna P, I'anson KJ, Kalichevsky MT, Miles MJ, Morris VJ, Orford PD. (1987). The gelation and crystallisation of amylopectin. *Carbohydr Res.* 162: 277-293.

Ring SG, Gee JM, Whittam M, Orford P, Johnson IT. (1988). Resistant starch: its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility in vitro. *Food Chem.* 28: 97-109.

Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M. (2002). The starch related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7166-7171.

Rodriguez J, Perera E, Maestra B, Diez M, Naranjo T. (2000). Chromosome structure of *Triticum timopheevii* relative to *T. turgidum*. *Genome* 43: 923-930.

Roldán I, Wattebled F, Lucas M M, Delvallé D, Planchot V, Jiménez S, Pérez R, Ball S, D'Hulst C, Mérida Á. (2006). The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.* 49: 492-504.

Roldán I, Lucas MM, Delvalle D, Planchot V, Jimenez S, Perez R, Ball S, D'Hulst C, Mérida A. (2007). The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.* 49: 492-504.

Rudi H, Uhlen AK, Harsta OM, Munck L. (2006). Genetic variability in cereal carbohydrate compositions and potentials for improving nutritional value. *Anim Feed Sci Technol.* 130: 55-65.

Sahlstrom S, Baevre A B, Brathen E. (2003). Impact of starch properties on hearth bread characteristics II Purified A-and B-granule fractions. *J Cereal Sci.* 37: 285-293.

Sahlstrom S, Brathen E, Lea P, Autio K. (1998). Influence of starch granule size distribution on bread characteristics *J Cereal Sci.* 28: 157-164.

Saito M, Nakamura T. (2005). Two point mutations identified in emmer wheat generate null Wx-A1 alleles. *Theor Appl Genet.* 110: 276-282.

Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. (2006). Resistant Starch: A Review. *Comprehensive Rev In Food Sci Food Safety.* 5: 5-17

Sakamura T. (1918). Kurze mitteilung uber die chromosomenzahlen und die verwandtschaftsverhaltnisse der triticum-arten. *Bot Mag.* 32: 151-4.

Salman H, Copeland L. (2009). Effect of repeated heating and cooling cycles on the pasting properties of starch. *J Cereal Sci.* In press

Salse J, Chagué V, Bolot S, Magdelenat G Huneau,c, Pont C Belcram, H, Couloux H, Gardais S, Evrard A, Segurens B, Charles M, Ravel C, Samain S, Charmet G, Boudet N, Chalhoub B. (2008). New insights into the origin of the B genome of hexaploid wheat: Evolutionary relationships at the SPA genomic region with the S genome of the diploid relative *Aegilops speltoides*. *BMC Genomics.* 9: 555.

Sands DC, Morris CE, Dratz EA, Pilgeram AL. (2009). Elevating optimal human nutrition to a central goal of plant breeding and production of plant-based foods. *Plant Sci.* 177: 377-389.

- Satoh H, Nishi A, Yamashita K, Takemoto Y, Tanaka Y, Hosaka Y, Sakurai A, Fujita N, Schulz A.** (1913). *Die Geschichte der kultivierten Getreide*, Nerbert, Halle.
- Scarascia-Mugnozza GT.** (1965). Induced mutations in breeding for lodging resistance. In: *The Use of Induced Mutations in Plant Breeding*. Pergamon Press, Oxford. 537-558.
- Schupp N, Ziegler P.** (2004). The Relation of Starch Phosphorylases to Starch Metabolism in Wheat *Plant Cell Physiol.* 45: 1471-1484.
- Schweizer P, Pokorný J, Schulze-Lefert P, Dudler R.** (2000). Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J.* 24: 895-903.
- Sebecic BL, Sebecic B.** (1995). Wheat flour starch granule-size distribution and rheological properties of dough 2 Extensographic measurements. *Die Nahrung* 39: 117-123.
- Seilmeier W, Belitz HD, Wieser H.** (1991). Separation and quantitative determination of high-molecular-weight subunits of glutenin from different wheat varieties and genetic variants of the variety Siccio. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 192: 124-129.
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, et al.** (2002). A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* 14: 2985-2994.
- Sestili F, Janni M, Doherty A, Botticella E, D'Ovidio R, Masci S, Jones H, Lafiandra D.** (2010). Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes. *BMC Plant Biol.*, submitted.
- Sestili F, Botticella E, Bedo Z, Phillips A, Lafiandra D.** (2010). Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis. *Mol Breed.* 25: 145-154.
- 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.
- Sharma A, Yadav BS, Ritika.** (2008). Resistant starch: Physiological roles and food applications. *Food Rev Int.* 24: 193-234.
- Shewry PR, Halford NG, Tatham AS, Popineau Y, Lafiandra D, Belton PS.** (2003). The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Adv Food Nutr Res.* 45: 221-302.
- Shewry PR, Halford NG.** (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot.* 53: 947-958.

- Shewry PR, Underwood C, Wan Y, Lovegrove A, Bhandari D, Toole G, Mills ENC, Denyer K, Mitchell RAC.** (2009). Storage product synthesis and accumulation in developing grains of wheat. *J Cereal Sci.* 50: 106-112.
- Shewry PR.** (2009). Wheat. *J Exp Bot.* 60: 1537-1553.
- Sikka VK, Choi SB, Kavakli IH, Sakulsingharoj C, Gupta S, Ito H, Okita TW.** (2001). Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.* 161: 461-468
- Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A.** (2008). Functional food Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite* 51: 456-467.
- 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 Plant Sci.* 5: 1360-1385.
- 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.
- Southgate DAT.** (1991). Determination of Food Carbohydrates. *Elsevier Applied Science London.* 109-112.
- Spiller GA.** (1993). Definition of dietary fiber. In: *Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition* Spiller, GA. Eds CRC, Boca Raton, 15.
- Stadler LJ.** (1929). Chromosome number and the mutation rate in *Avena* and *Triticum*. *Proc Nat Acad Sci USA.* 15: 876-881.
- Stahl Y, Coates S, Bryce JH, Morris PC.** (2004). Antisense downregulation of the barley limit dextrinase inhibitor modulates starch granule size distribution, starch composition and amylopectin structure. *Plant J.* 39: 599-611.
- Stinard PS, Robertson DS, Schnable PS.** (1993). Genetic isolation, cloning, and analysis of a mutator-induced, dominant antimorph of the maize amylose extender1 locus. *Plant Cell.* 5: 1555-1566.
- Stoddard FL.** (1999). Survey of starch particle-size distribution in wheat and related species. *Cereal Chem.* 76: 145-149.

- Stoddard FL, Sarker, R.** (2000). Characterization of starch in *Aegilops* species.. *Cereal Chem.* 77: 445-447.
- Stoddard FL.** (2003). Genetics of starch granule size distribution in tetraploid and hexaploid wheats. *Aust J Agric Res.* 54: 637-648.
- Sugawara T, Miyazawa T.** (2001). Beneficial effect of dietary wheat glycolipids on cecum short-chain fatty acid and secondary bile acid profiles in mice. *J Nutr Sci Vitaminol.* 47: 299-305.
- Suzuki A, Suzuki T, Tanabe F, Toki S, Washida H, Wu CY, Takaiwa F.** (1997). Cloning and expression of five myb-related genes from rice seed. *Gene.* 198: 393-398.
- Suzuki G, Moriyama M, Fujioka K, Yamamoto M, Subrahmanyam N C, Li, Z, Appels R, Suzuki T, Eiguchi M, Kumamaru T, Satoh H, Matsusaka H, Moriguchi K, Nagato Y, Kurata N.** (2008). MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol Genet Genomocis.* 279: 213-223.
- Swaminathan M S.** (1961). Effect of diplontic selection on the frequency and spectrum of mutations induced in polyploids following seed irradiation In: *Effects of Ionizing Radiations on seEds, IAEA, Vienna.* 279-288.
- Takeda Y, Hizukuri S.** (1987). Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. *Carbohydr Res.* 168: 79-88.
- Talamè V, Bovina R, Sanguineti MC, Tuberosa R, Lundqvist U, Salvi S.** (2008). TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. *Plant Biotechnol J.* 6: 477-485.
- Talbert LE, Blake NK.** (2000). Comparative DNA sequence analysis and the origin of wheat. *Proc Plt & Anim. Genom.* VIII Conference, Town & Country Convention Center, San Diego, Calif, USA.
- Taylor NE, Greene EA.** (2003). PARSESNP: a tool for the analysis of nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 31: 3808-3811.
- Tester RF.** (1997). Starch: the polysaccharide fractions In: P J Frazier, A M Donald and P Richmond, Edss, *Starch: Structure and Functionality*, The Royal Society of Chemistry, London, UK, 163-171.
- Tester RF, Debon S JJ, Karkalas J.** (1998). Annealing of wheat starch. *J Cereal Sci.* 28: 259-272.
- Tester RF, Morrison WR.** (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches II Waxy rice starches. *Cereal Chem.* 67: 558-563.

- Tetlow IJ, Wait R, Lu Z, Akkasaeng R, Bowsher C G, Esposito S, Kosar-Hashemi B, Morell M K, Emes MJ.** (2004). Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell*. 16: 694-708.
- Tetlow IJ, Davies EJ, Vardy KA, Bowsher CG, Burrell MM, Emes MJ.** (2003). Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of a plastidial isoform. *J Exp Bot*. 54: 715-725.
- Thorbjørnsen T, Villand P, Denyer K, Olsen O A, Smith A M.** (1996). Distinct isoforms of ADPglucose pyro pyrophosphorylase. *Plant Sci*. 161: 461-468.
- Till BJ, Burtner C, Comai L, Henikoff S.** (2004). Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases *Nucleic Acids Res*. 32: 2632-2641.
- Till BJ, Reynolds SH, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E., Codomo CA, Enns LC, Odden AR, Greene EA, Comai L, Henikoff S.** (2004). Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol*. 4: 12.
- Toden S, Bird AR, Topping DL, Conlon MA.** (2007). Dose-dependent reduction of dietary protein-induced colonocyte DNA damage by resistant starch in rats correlates more highly with caecal butyrate than with other short chain fatty acids. *Cancer Biol Ther*. 6: 253-258.
- Topping D.** (2007). Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. *Trends Food Sci Technol*. 46: 220-229.
- Topping DL, Clifton PM.** (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 81: 1031-1064.
- Travella S, Klimm T E, Keller B.** (2006). RNA interference based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat *Plant Physiol*. 142: 6-20.
- Triques K, Sturbois B, Gallais S, Dalmais M, Chauvin S, Clepet C, Aubourg S, Rameau C, Caboche M, Bendahmane A.** (2007). Characterization of *Arabidopsis thaliana* mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J*. 51: 1116-1125.
- Truswell A.** (1992). Glycaemic index of foods. *Eur J Clin Nutr*. 46: S91-S101.
- Tsai CY, Nelson OE.** (1966). Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate:glucose pyrophosphorylase activity. *Sci*. 151: 341-343.
- Umemoto T, Aoki N.** (2005). Single-Nucleotide Polymorphisms in rice starch synthase *ii*a that alter starch gelatinisation and starch association of the enzyme. *Funct Plant Biol*. 32: 763-768.

- Umemoto T, Aoki N, Lin HX, 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.
- Vansteelandt J, Delcour JA.** (1998). Physical behavior of durum wheat starch (*Triticum durum*) during industrial pasta processing. *J Agric Food Chem.* 7: 2499-2503.
- Vignaux N, Doehlert D C, Elias EM, McMullen MS, Grant LA, Kianian SF.** (2005). Quality of spaghetti made from full and partial waxy durum wheat. *Cereal Chem.* 82: 93-100.
- Waigh TA, Kato KL, Donald AM, Gidley MJ, Clarke CJ, Riekkel C.** (2000). Side-chain liquid-crystalline model for starch. *Starch.* 52: 450-460.
- Waite DM, van Wegen S, Verhoeven T, Denyer K.** (2002). Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J.* 31: 97-112.
- Waring S.** (2005). Functionality of resistant starch in food applications. <http://www.foodinnovations.com/pdf/functresist.pdf>. Accessed November 2005.
- 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.
- Weigel D, Ahn JH, Blázquez MA, Borevitz J, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrándiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang Z, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky M F, Chory J.** (2000). Activation Tagging In Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122: 1003-1014.
- Weil CF.** (2009). TILLING in grass species. *Plant Physiol.* 149: 158-164.
- Wicker T, Yahiaoui N, Guyot R, Schlagenhauf E, Liu ZD, Dubcovsky J, Keller B.** (2003). Rapid genome divergence at orthologous low molecular weight glutenin loci of the A and Am genomes of wheat. *Plant Cell.* 15: 1186-1197.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN.** (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 49: 853-860.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ.** (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 49: 853-860.
- Wu SB, Wirthensohn MG, Hunt P, Gibson JP, Sedgley N.** (2008). High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theor Appl Genet.* 118: 1-14.

- Xin ZG, Wang ML, Barkley NA, Burow G, Franks C, Pederson G, Burke J.** (2008). Applying genotyping. (TILLING). and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biol.* 8: 103.
- Yamamori, M, 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, 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, Endo TR.** (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.
- Yamamori M, Kato M, Yui M, Kawasaki M.** (2006). Resistant starch and starch pasting properties of a starch synthase IIa-deficient wheat with apparent high amylose. *Aust J Agric Res.* 57: 531-535.
- Yamanouchi H, Nakamura Y.** (1992). Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme. (Q-enzyme). in rice. *Plant Cell Physiol.* 33: 985-991.
- Yan L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V, Dubcovsky J.** (2004). The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Sci.* 303: 1640-1644.
- Yao Y, Thompson DB, Gultinan MJ.** (2004). Maize starch-branching enzyme isoforms and amylopectin structure In the absence of starch-branching enzyme IIb, the further absence of starchbranching. enzyme Ia leads to increased branching. *Plant Physiol.* 136: 3515-23.
- Yasui T, Matsuki J, Sasaki T, M Yamamori.** (1997). Waxy endosperm mutants of bread wheat (*Triticum aestivum* L) and their starch properties. *Breed. Sci.* 47: 161-163.
- Yoo SH, Jane JL.** (2002a). Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors. *Carbohydr Polym.* 49: 307-314.
- Yoo SH, Jane JL.** (2002b). Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches *Carbohydr Polym.* 49: 297-305.

- Yue P, Waring S.** (1998). Functionality of resistant starch in food applications. *Food Aust.* 50: 615-21.
- Yun S, Matheson NK.** (1993). Structures of the amylopectins of waxy, normal, amylose-extender, and wx: ae genotypes and of the phytoglycogen of maize. *Carbohydr Res.* 243: 307-321.
- Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Auyeung P, Martin C, Smith A M, Chen J.** (1998). A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell.* 10: 1699-1711.
- Zeng M, Morris CF, Batey I L, Wrigley CW.** (1997). Sources of Variation for Starch Gelatinization, Pasting, and Gelation Properties in Wheat. *Cereal Chem.* 74: 63-71.
- Zhang J, Guo D, Chang YX.** (2007). Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13 804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library. *Plant J.* 49: 947-959.
- Zhang X, Colleoni C, Ratushna V, Sirghie-Colleoni M, James MG, Myers AM.** (2004). Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase. isoform SSIIa. *Plant Mol Biol.* 54: 865-79.
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP.** (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist.* 181: 777-794.
- Zhao X, Gao M, Fisher DK, Kim KN, Shannon JC, Gultinan MJ.** (1997). Independent genetic control. of maize starch-branching enzymes IIa and IIb-Isolation and characterization of a *Sbe2a* cDNA. *Plant Physiol.* 114: 69-78.
- Zhu Y F, Li YW, Chen Y.** (2005). Generation and characterization of a high molecular weight glutenin *IBx14*-deficient mutant in common wheat. *Plant Breed.* 124: 421-427.
- Zohary D, Feldman M.** (1962). Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat. (*Aegilops-Triticum*). Group. *Evolution* 16: 44-61.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il professore Domenico Lafiandra per il supporto scientifico, per la fiducia e per l'entusiasmo che ha saputo trasmettermi durante gli anni del Dottorato.

Ringrazio la professoressa Stefania Masci per aver coordinato con instancabile pazienza il mio Dottorato, per i preziosi consigli inerenti il lavoro di ricerca e per la sua infinita disponibilità.

Ringrazio il professore Renato D'Ovidio per la sua disponibilità e i suoi consigli di natura scientifica e per aver "quasi sempre" firmato, in qualità di Vice Direttore, gli ordini urgenti.

Ringrazio il dottor Francesco Sestili per la collaborazione incondizionata e sconfinata, per i preziosi consigli e per la sua amicizia.

Ringrazio Daniela Panichi per i suoi preziosi consigli sulle analisi delle proteine e naturalmente per la sua amicizia.

Ringrazio il dottor Andy Phillips (Rothamsted Research) che mi ha permesso di condurre gli esperimenti di TILLING fornendo la popolazione di frumento tenero cv Cadenza e la strumentazione per le analisi di High Resolution Melting.

Ringrazio il professor Jan Delcour per la sua ospitalità e per avermi permesso di condurre gli esperimenti di DSC nel suo laboratorio di Leuven (Università Cattolica- Belgio).

Ringrazio il dottor Roberto Ranieri per aver sostenuto la scelta di questo Dottorato e per l'interesse costante mostrato in questi anni.

Ringrazio la Produttore Sementi Bologna in particolare i dottori Andrea DeMontis e Gianluca Ferrazzano per la collaborazione negli esperimenti di incrocio.

Voglio ringraziare Francesco, Paolo, Daniela, Lina, Eleonora, Federica, Roberta, Gaetan per l'amicizia, la simpatia, la solidarietà che rendono il nostro laboratorio un posto accogliente e divertente.

Ringrazio i mie genitori e il mio fratellino perché hanno sempre creduto in me e mi hanno sempre sostenuto con il loro affetto .

E poi ringrazio Federico che mi è stato vicino, mi ha confortato nei momenti difficili, si è entusiasmato per i miei piccoli successi, mi ha sostenuto, sopportato e aiutato.