

*Genotipi di grano duro ad elevata qualità panificatoria:
risultati e prospettive*

N. Pogna¹, L. Gazza¹

¹ Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Via Cassia 176, 00191 Roma

1. Il miglioramento genetico del grano duro

Il miglioramento genetico della qualità tecnologica del grano duro ha come obiettivo finale la costituzione di nuove varietà produttive e dotate di superiori caratteristiche nutrizionali, molitorie e reologiche. Dopo la prima “rivoluzione verde” ad opera di Nazareno e Carlotta Strampelli nel ventennio 1910-1930, rivoluzione che portò alla costituzione della varietà di grano duro “Cappelli”, secondo alcuni il grano più bello mai prodotto, agli inizi degli anni 40 in Italia prese avvio una intensa attività di miglioramento genetico che oltre a sfruttare la variabilità naturale presente nelle popolazioni locali (soprattutto siciliane), introdusse nuova variabilità attraverso l’incrocio tra genotipi di tipo africano (ad esempio la succitata varietà Cappelli) con genotipi siro-palestinesi precoci e a bassa taglia. Da questi incroci emersero eccellenti varietà, alcune delle quali sono state coltivate fino a pochi anni fa (ad esempio Appulo e Trinakria). In questo periodo la produttività è stato l’obiettivo pressoché esclusivo del costituente varietale. Tuttavia, negli ultimi 30 anni la qualità tecnologica del grano duro è diventata sempre più importante. I principali caratteri qualitativi presi in considerazione sono stati il contenuto proteico, la vitrosità della granella, le proprietà visco-elastiche del glutine e la tenuta alla cottura della pasta. Infine nell’ultimo decennio sono stati perseguiti nuovi obiettivi quali la qualità panificatoria del grano duro, il colore delle semole, la composizione dell’amido, la durezza della cariosside e le proprietà dietetiche e farmacologiche.

2. La qualità panificatoria del grano duro

L’uso del grano duro per la produzione di pane riguarda principalmente alcune regioni meridionali d’Italia, alcuni Paesi del bacino mediterraneo (Turchia, Siria, Paesi del Nord Africa) e l’India. Tuttavia, le semole o le farine di grano duro danno tendenzialmente origine ad impasti tenaci e poco estensibili dai quali si ottiene un pane “pesante” e poco voluminoso.

Gran parte delle informazioni riguardanti i fattori fisici e chimici della

granella che influiscono sulla qualità panificatoria derivano dagli studi condotti a partire dagli anni 80 sul grano tenero. Questi studi hanno suggerito che le proprietà visco-elastiche del glutine dipendono soprattutto dalle proteine della granella, sia in termini quantitativi che qualitativi.

2.1. Contenuto proteico

Il contenuto proteico (espresso in percentuale del peso secco della cariosside) è un carattere genetico fortemente influenzato dalle condizioni di coltivazione (suolo, clima, disponibilità di sostanze nutritive). Esso è inoltre correlato inversamente con la produttività. La localizzazione cromosomica dei geni che controllano caratteri quantitativi poligenici come il contenuto proteico è difficile da determinare. I geni che influiscono su questo carattere sono localizzati su tutti i cromosomi, e questa localizzazione può essere diversa nelle diverse varietà.

Attualmente sono disponibili numerosi modelli matematici e software da utilizzare nell'analisi dei rapporti di concatenazione tra geni marcatori e geni che controllano il contenuto proteico. Una enorme quantità di dati genetici sono stati ottenuti utilizzando le tecniche molecolari basate sul polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism), sui RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) o gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) in alcuni cereali come il mais ed il riso. Sfortunatamente queste tecniche hanno dato scarsi risultati in grano. I costi delle tecniche molecolari nella ricerca di geni per il contenuto proteico ed altri fattori qualitativi e nella costituzione varietale sono tuttora piuttosto elevati, mentre rimangono incerti i risultati.

2.2 Composizione proteica

È universalmente accettato che il fattore principale che causa variabilità nella qualità tecnologica di una singola varietà di grano è il contenuto proteico. Tuttavia quando si confrontano genotipi diversi di grano ci si accorge che le rette di correlazione tra contenuto proteico e parametri qualitativi hanno pendenze diverse. Ciò deriva dal fatto che le diverse varietà di grano e la materia prima da esse derivata possono presentare differenze significative nella composizione proteica e, in particolare, nei rapporti tra le frazioni proteiche che costituiscono il glutine (Wasik e Bushuk 1975; Heubner e Wall 1976). A

partire dagli anni '80, l'attività di miglioramento genetico della qualità tecnologica del grano ha avuto un notevole impulso dalla individuazione di specifiche proteine correlate con la qualità del glutine (Damidaux *et al.* 1978; Kosmolak *et al.* 1980; Payne *et al.* 1979, 1984). In particolare, è stato dimostrato che tra le due principali frazioni proteiche del glutine, gliadine e glutenine, è quest'ultima che determina in maggior misura le caratteristiche reologiche degli impasti (elasticità ed estensibilità) attraverso la formazione di polimeri proteici costituiti da subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW-GS) e ad alto peso molecolare (HMW-GS) (Payne *et al.* 1979, 1984; Branlard *et al.* 1985; Pogna *et al.* 1990; Gupta *et al.* 1991; Halford *et al.* 1992).

La composizione delle proteine di riserva è dunque il più importante fattore qualitativo del grano. Le proteine di riserva appartengono a tre famiglie principali, le gliadine, le subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW) e le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW). Esse costituiscono la parte preponderante del glutine, una massa proteica elastica che si ottiene impastando la semola o la farina sotto un rivolo d'acqua. Le proprietà reologiche degli impasti di grano duro dipendono soprattutto dalle caratteristiche di elasticità ed estensibilità del glutine.

2.2.1 Le proteine di riserva

Le gliadine costituiscono il 40% circa delle proteine dell'endosperma di grano e sono una miscela eterogenea di proteine monomeriche solubili in alcool. In una singola varietà si possono identificare mediante tecniche elettroforetiche bidimensionali 20-30 componenti. Sulla base della loro mobilità elettroforetica questi componenti vengono classificati in α , β , γ e gliadine.

Le subunità gluteniniche LMW e HMW sono presenti nell'endosperma sotto forma di grandi polimeri ramificati nei quali le subunità sono legate tra loro da ponti disolfuro in corrispondenza dei residui cisteinici.

I geni che codificano per le proteine di riserva di grano duro sono portati dai cromosomi 1A, 1B, 6A e 6B. In particolare i geni che controllano la sintesi delle gliadine sono riuniti in gruppi di 10 – 15 in loci noti come Gli-A1 e Gli-B1 (nei bracci corti dei cromosomi 1A e 1B) e Gli-A2 e Gli-B2 (nei bracci corti dei cromosomi 6A e 6B) (Payne 1987). Esiste una vasta serie di forme alleliche per ciascun locus gliadinico, per un totale di alcune decine di alleli. Altri loci gliadinici minori (Gli-A3, Gli-B3, Gli-A5, Gli-B5 e Gli-A6) sono stati recentemente individuati nei bracci corti dei cromosomi 1A e 1B. Si calcola che si possano ottenere circa 10.000 genotipi di grano duro dalla

combinazione degli alleli gliadinici attualmente noti, a dimostrazione dell'elevato polimorfismo di queste proteine.

Anche i geni che codificano per le subunità gluteniniche sono portati dai cromosomi 1A e 1B. In particolare, quelli che codificano per le subunità HMW risiedono nei loci Glu-A1 e Glu-B1 nei bracci lunghi dei suddetti cromosomi, mentre quelli che controllano la sintesi delle subunità LMW stanno nei loci Glu-A3 e Glu-B3 nei bracci corti degli stessi cromosomi, nelle strette vicinanze dei loci gliadinici Gli-A1 e Gli-B1. Recentemente è stato identificato nel braccio corto del cromosoma 1B un locus addizionale Glu-B2 che codifica per poche subunità LMW (Liu *et al.* 1995). Il locus Glu-A3 codifica per 1-2 subunità LMW mentre il locus Glu-B3 codifica per 7-8 subunità LMW; le tecniche di elettroforesi bidimensionale sviluppate recentemente (Redaelli *et al.* 1995) dimostrano che ad entrambi i loci esiste un esteso polimorfismo allelico (Figura 1).

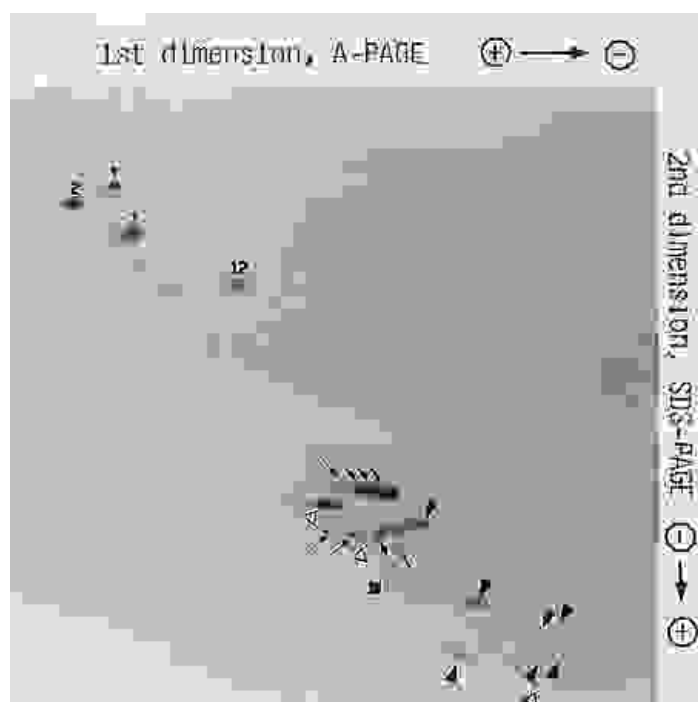


Figura 1. Separazione elettroforetica bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE delle subunità gluteniniche della varietà di grano tenero Costantino. Vengono mostrate le subunità a basso peso molecolare (LMW) codificate dai loci Glu-A3 (triangoli), Glu-B3 (freccie) e Glu-D3 (punte di freccia). La subunità LMW indicata da un quadrato è codificata da un gene non ancora localizzato. Le subunità ad alto peso molecolare (HMW) sono numerate secondo la nomenclatura di Payne and Lawrence (1983).

Ciascuno dei loci Glu-A1 e Glu-B1 contiene due geni che codificano per una subunità HMW di tipo x a maggior peso molecolare e una subunità di tipo y più leggera. In realtà, il gene del locus Glu-A1 che codifica per la subunità di tipo y è sempre inattivo mentre lo è quasi sempre l'altro gene di questo locus. Inoltre alcune subunità codificate dal locus Glu-B1 particolarmente frequenti in grano tenero (subunità 7+9 o 17+18) sono assenti in grano duro. Come vedremo successivamente, alcune subunità HMW e LMW svolgono un importante ruolo nel determinare le proprietà funzionali del glutine e, di conseguenza, la qualità panificatoria del grano duro (Figura 2).

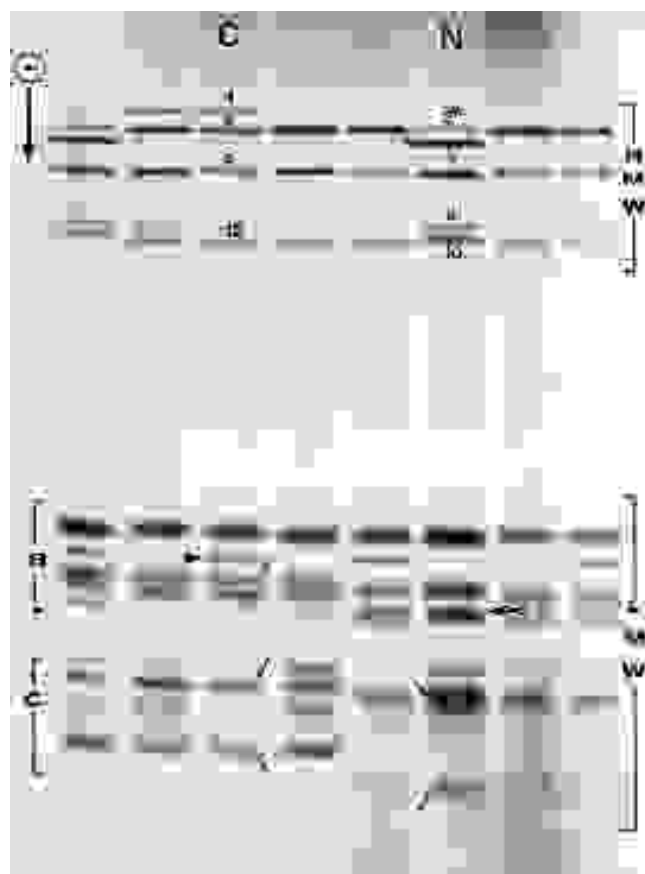


Figura 2. Frazionamento elettroforetico mediante SDS-PAGE di subunità gluteniniche di grano tenero. Vengono mostrate le subunità a basso peso molecolare (LMW) codificate dai loci Glu-A3 (punte di freccia), Glu-B3 (doppie punte di freccia) e Glu-D3 (freccie). Le subunità ad alto peso molecolare (HMW) sono numerate secondo la nomenclatura di Payne e Lawrence (1983).

2.3. Relazione tra composizione proteica e qualità

Gli studi condotti da Damidaux *et al.* (1978) e Payne *et al.* (1987) hanno rappresentato senza dubbio una pietra miliare nella storia del miglioramento genetico della qualità tecnologica del grano. Damidaux *et al.* (1978) trovarono una forte relazione tra la presenza della gliadina -45 e la buona qualità della pasta (tenuta alla cottura) e tra la presenza della gliadina -42 e la scadente qualità della pasta. Queste gliadine, separabili facilmente mediante elettroforesi in ambiente acido (A-PAGE), sono forme alleliche codificate dal locus Gli-B1 nel cromosoma 1B. In realtà, studi successivi condotti da ricercatori italiani e francesi (Pogna *et al.* 1990) hanno dimostrato che queste gliadine sono solo dei marcatori genetici della qualità, la quale dipende invece dalle subunità gluteniniche LMW-2 codificate dal locus Glu-B3 distante solo 2 centiMorgan dal locus Gli-B1 che codifica per la gliadina -45. In altre parole la relazione tra le gliadine -45 / -42 e la qualità del glutine riflette questo legame genetico con le subunità LMW. In ogni caso, l'osservazione di Damidaux ha fornito uno strumento semplice ed efficace per la selezione qualitativa delle progenie nei programmi di miglioramento genetico. D'altra parte, l'individuazione delle subunità LMW come i fattori funzionali della qualità del glutine ha dato avvio a numerosi studi biochimici e molecolari sulla struttura di queste proteine, portando anche alla individuazione di subunità LMW "di buona qualità".

P. I. Payne è stato il primo a dimostrare che la presenza di certe subunità HMW è correlata alla buona qualità panificatoria del grano tenero. L'osservazione che le subunità 1, 2*, 5+10, 7+9 e 17+18 sono presenti prevalentemente nelle varietà di grano tenero con glutine forte e buona qualità panificatoria ha fornito ai costitutori un metodo semplice per scegliere i genotipi da incrociare e per selezionare le progenie sulla base della loro composizione in subunità HMW. In effetti la composizione in subunità HMW è in grado di spiegare una quota significativa (anche il 50%) della variabilità osservata nella qualità panificatoria.

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

Dal punto di vista del miglioramento genetico è importante osservare che gli effetti delle subunità HMW e LMW sulla elasticità ed estensibilità degli impasti sono additivi. Il ruolo svolto da queste subunità deriva dalla loro

capacità di dare origine a polimeri di dimensioni variabili attraverso la formazione di ponti disolfuro intermolecolari. La presenza di alcune subunità HMW e LMW è infatti risultata strettamente correlata con la formazione di polimeri gluteninici di grandi dimensioni rispetto a quelli formati da altre subunità. Alla luce di queste scoperte, l'approccio genetico al miglioramento qualitativo del grano deve mirare alla manipolazione del numero, della struttura e dell'espressione dei geni che codificano per le subunità gluteniniche in modo da incrementare la quantità di polimeri gluteninici di grandi dimensioni.

Grossi polimeri si possono ottenere attraverso l'aumento del numero di geni gluteninici attivi, l'aumento della loro efficienza di trascrizione e traduzione, oppure attraverso l'incremento della capacità delle subunità di formare ponti disolfuro intermolecolari.

Come noto, il glutine di grano duro rispetto a quello di grano tenero mostra una elevata tenacità e una ridotta estensibilità. Questa carenza di estensibilità è probabilmente dovuta all'assenza del genoma D, e più precisamente alla mancanza delle proteine di riserva codificate dal cromosoma 1D e, forse, di quelle codificate dal cromosoma 6D. In ogni caso gli studi condotti sulla qualità panificatoria del grano duro hanno dimostrato gli effetti positivi sul volume del pane delle subunità HMW 7+8 e LMW-2, le stesse subunità coinvolte nella qualità pastificatoria. Inoltre, l'introggressione di alcune subunità HMW codificate dal locus Glu-A1, normalmente silente in grano duro, ha dato origine a genotipi tetraploidi dotati di elevata qualità panificatoria.

Recentemente sono state sviluppate linee di grano duro che contengono proteine di riserva codificate dal cromosoma 1D di grano tenero (vedi successivamente). Ciò è stato possibile utilizzando la varietà di grano tenero Perzivan-2, la quale possiede una traslocazione cromosomica spontanea in cui un segmento del cromosoma 1D è portato dal cromosoma 1A. Dal ripetuto reincrocio di questa varietà con varietà di grano duro sono state ottenute linee tetraploidi che possiedono i loci Gli-D1 e Glu-D3 e mostrano un significativo incremento di estensibilità del glutine. Inoltre utilizzando tecniche di ingegneria cromosomica sono state prodotte linee di grano duro contenenti le subunità HMW 5 + 10 codificate dal locus Glu-D1 di grano tenero.

3. La durezza della cariosside

La durezza del seme è una importante caratteristica varietale che è correlata con la resa in macinazione e la qualità del prodotto finale. Il frumento tenero con cariosside dura (noto anche come grano “hard”) richiede più acqua e un tempo doppio di condizionamento prima della macinazione rispetto al frumento tenero con cariosside soffice e farinosa. Inoltre la farina del frumento “hard” ha un assorbimento idrico più elevato. Le varietà di grano duro hanno sempre cariossidi particolarmente dure.

Il controllo genetico della durezza del seme è piuttosto semplice ed interessa un solo gene principale Ha nel braccio corto del cromosoma 5D. La forma allelica dominante Ha determina la sofficità della cariosside, mentre la forma recessiva ha (o la sua assenza, come in grano duro) determina la durezza della cariosside. Questo gene produce un gruppo eterogeneo di proteine note come friabiline che sono presenti in grano tenero sia nelle cariossidi dure che in quelle soffici ma in queste ultime sono associate ai granuli d’amido, mentre nelle prime sono libere nella matrice dell’endosperma.

Le friabiline sono costituite da una serie di polipeptidi con peso molecolare di 15 kD, due dei quali hanno una elevata omologia di sequenza aminoacidica N-terminale con la puroindolina-a (pinA) e la puroindolina-b (pinB), proteine basiche ricche in cisteina e in grado di legare i lipidi. PinA e pinB hanno un 60% circa di omologia nella sequenza aminoacidica, ma il dominio ricco in triptofano di pinA è parzialmente deleto in pinB. I geni che controllano le puroindoline sono stati localizzati nel cromosoma 5D, come il suddetto gene Ha. Recentemente i geni delle friabiline sono stati trasferiti dal cromosoma 5D di grano tenero nel cromosoma 5B di varietà italiane di grano duro allo scopo di produrre cultivar di grano duro con cariosside soffice, con nuove caratteristiche tecnologiche. Questo aspetto verrà discusso successivamente.

4. Caratterizzazione di genotipi di grano duro a modificata composizione proteica

L’attività di miglioramento genetico della qualità panificatoria del grano duro svolta nell’ambito del programma POP Misura 10.4 ha avuto due principali obiettivi:

- Sviluppo e caratterizzazione biochimica e tecnologica di genotipi di grano duro a modificata composizione in proteine di riserva.

- Sviluppo e caratterizzazione di genotipi di grano duro a modificata tessitura della cariosside.

Come verrà illustrato nei capitoli successivi, la creazione di nuovi genotipi di grano duro da destinare alla panificazione è stata programmata sulla base delle conoscenze genetiche e biochimiche acquisite in studi precedenti ed è stata perseguita attraverso tecniche di (a) incrocio interspecifico con grano tenero e selezione mediante elettroforesi, (b) trasferimento per reincrocio di una traslocazione cromosomica spontanea e (c) ingegneria cromosomica utilizzando il gene mutato *ph1c* che promuove la ricombinazione tra cromosomi omeologhi.

4.1 Genotipi di grano duro a modificata composizione in proteine di riserva.

Come sottolineato precedentemente, le varietà di grano duro non contengono le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW) 7+9 o 17+18 che si possono invece trovare in alcune varietà di grano tenero ad elevata qualità panificatoria come Salmone (subunità 7+9) e Manital (subunità 17+18). Studi precedenti avevano messo in evidenza che le suddette subunità hanno un effetto positivo sulla estensibilità del glutine (parametro alveografico L o G) ed un leggero effetto negativo sulla tenacità (parametro P).

Allo scopo di introdurre le subunità 7+9 e 17+18 in grano duro, la varietà commerciale Grazia è stata incrociata con la varietà di grano tenero Salmone, mentre la varietà commerciale Simeto è stata incrociata con la varietà di grano tenero Manital.

Le progenie F1 di ciascun incrocio sono state reincrociate con il genitore ricorrente tetraploide per 4 generazioni, selezionando ad ogni generazione gli individui contenenti le subunità HMW 7+9 o 17+18. Le progenie ottenute dal quarto reincrocio sono state autofecondate per produrre individui omozigoti per la presenza delle suddette subunità (Figura 3). Questi ultimi sono stati moltiplicati per produrre le linee quasi-isogeniche “Grazia 7+9” e “Simeto 17+18” le quali sono state allevate in parcelle replicate a confronto con le varietà Grazia e Simeto contenenti rispettivamente le subunità HMW 20 e 7+8 (Tabella 1).

L’analisi alveografica delle semole ottenute dai genotipi in prova ha messo in evidenza che l’introduzione delle subunità 17+18 nelle linee quasi-isogeniche “Simeto 17+18” ha determinato un significativo abbassamento del valore di W e del rapporto tra tenacità ed estensibilità (P/L) rispetto alla varietà Simeto (Tabella 1). D’altra parte, la presenza delle subunità HMW 7+9 nelle

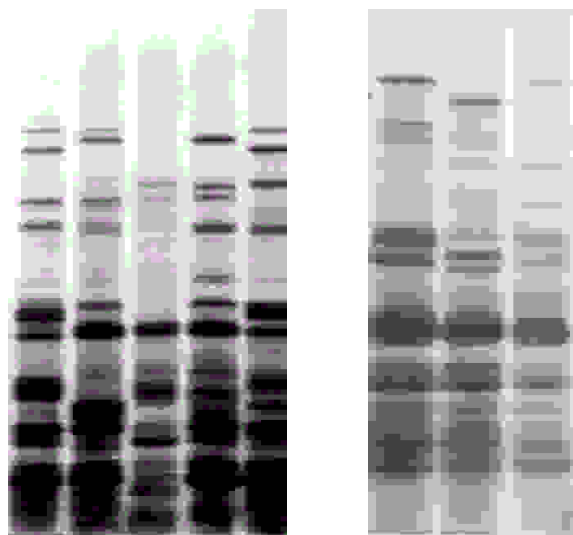


Figura 3. Separazione elettroforetica delle proteine totali delle varietà di grano tenero Manital (Ma) e Salmone (Sa) e delle linee quasi-isogeniche di grano duro "Grazia 7+9" (Gr) e "Simeto 17+18" (Si). Le subunità HMW 7+9 sono indicate da frecce mentre le subunità HMW 17+18 sono indicate da una punta di freccia.

Tabella 1. Contenuto proteico, W alveografico e rapporto P/L in linee quasi-isogeniche di grano duro contenenti le subunità HMW 7+9 o 17+18.

Genotipo	HMW	Contenuto proteico %	W (J x 0,0001)	P/L
Salmone	7+9			
Manital	17+18			
Grazia	20	12.9	250	1.9
Simeto	7+8	13.5	385	2.3
Grazia 7+9	7+9	12.6	295*	1.2 ns
Simeto 17+18	17+18	13.1	270**	0.6**

ns= non significativo; * significativo per $P < 0,05$; ** significativo per $P < 0,01$

linee quasi-isogeniche “Grazia 7+9” ha determinato un leggero ma significativo incremento del parametro W e una riduzione statisticamente non significativa del rapporto P/L. Questi risultati suggeriscono che la qualità panificatoria del grano duro può essere migliorata significativamente introducendo in questa specie le subunità 17+18, le quali sembrano avere un effetto positivo sulla estensibilità del glutine e di conseguenza sul volume del pane. Un effetto analogo ma molto meno intenso sembrano esercitare le subunità 7+9.

La presenza delle subunità gluteniniche HMW e LMW codificate dal cromosoma 1D è stata associata alla superiore attitudine panificatoria del grano tenero rispetto al grano duro. Infatti, precedenti ricerche hanno dimostrato che la rimozione in linee di grano tenero delle subunità LMW codificate dal locus Glu-D3 localizzato nel cromosoma 1D determina una significativa riduzione della estensibilità del glutine e un incremento del rapporto P/L.

La scoperta di una varietà di grano tenero (cv. Perzivan) contenente una traslocazione spontanea del locus Glu-D3 dal cromosoma 1D al cromosoma 1A ha consentito di trasferire questo locus mediante incrocio interspecifico tra la cv Perzivan e la varietà di grano duro Rodeo (Figura 4). In particolare, la progenie F1 del suddetto incrocio è stata reincrociata per 4 generazioni con la varietà Rodeo, selezionando ad ogni generazione gli individui contenenti le subunità LMW codificate dal locus Glu-D3 e le gliadine codificate dal locus adiacente Gli-D1. L'ultima generazione da reincrocio è stata autofecondata per produrre individui omozigoti per le suddette proteine di riserva e questi ultimi sono stati moltiplicati per sviluppare linee tetraploidi quasi-isogeniche.

Infine le linee quasi-isogeniche sono state allevate in parcelle replicate e le semole ottenute da questo materiale sono state sottoposte ad analisi biochimiche e alveografiche (Tabella 2).

Come atteso, la presenza nelle linee tetraploidi quasi-isogeniche delle proteine codificate dai loci Gli-D1/Glu-D3 ha modificato significativamente le proprietà visco-elastiche del glutine. In particolare, è stata osservata una riduzione altamente significativa del rapporto P/L a seguito di un forte incremento del parametro “estensibilità” (L), accompagnata da una riduzione contenuta ma significativa (+10%) del parametro “forza” (W). Questi cambiamenti sono indubbiamente associati alla presenza dei suddetti loci, come dimostrato dalla invarianza dei parametri alveografici delle linee quasi-isogeniche prive di questi loci (LQS -) rispetto alla varietà ricorrente Rodeo (Tabella 2).

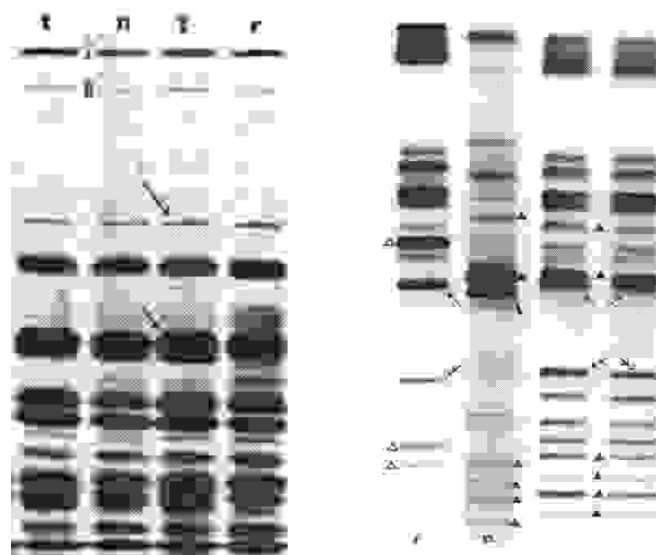


Figura 4. Separazione SDS-PAGE (a sinistra) e A-PAGE (a destra) della varietà di grano tenero Perzivan (p), della varietà di grano duro Rodeo (r) e delle linee tetraploidi quasi-isogeniche contenenti le proteine codificate dai loci *Gli-D1* (triangoli pieni) e *Glu-D3*. Le frecce e le doppie frecce indicano le gliadine codificate da *Gli-B1*.

Tabella 2. Contenuto proteico e parametri alveografici della varietà Rodeo e di linee quasi-isogeniche caratterizzate dalla presenza (LQI +) o assenza (LQI -) delle proteine codificate dai loci *Gli-D1* e *Glu-D3*.

Genotipo	Contenuto proteico (%)	W alveografico (J X 0,0001)	P/L alveografico
Rodeo	13,1	300	2,5
LQI +	13,3	270*	0,7**
LQI -	13,0	295 ns	2,9 ns

LQI += 4 linee quasi-isogeniche con *Gli-D1/Glu-D3*; LQI - = 3 linee quasi-isogeniche senza *Gli-D1/Glu-D3*

ns = non significativo; * e ** = significativo rispettivamente per $P < 0,05$ e $P < 0,01$.

4.2 Genotipi di grano duro a modificata tessitura della cariosside

La puroindolina a (pinA) e la puroindolina b (pinB) sono i principali componenti delle friabiline, un gruppo di polipeptidi di circa 15 kDa presenti in maggior quantità sulla superficie dei granuli di amido delle varietà di grano tenero con cariosside a tessitura soffice rispetto a quelle con tessitura dura (Greenwell e Schofield, 1986; Gautier *et al.*, 1984). Nella cariosside matura le puroindoline sono localizzate nell'endosperma amilaceo e nelle cellule aleuroniche (Dubreil *et al.*, 1998). I geni Pina-D1 and Pinb-D1 codificano rispettivamente per pinA and pinB e sono strettamente concatenati tra loro nella parte distale del braccio corto del cromosoma 5D (Tranquilli *et al.* 1999), molto vicino o in corrispondenza del locus Ha che controlla la durezza del seme in grano tenero. Ovviamente questi geni sono assenti nelle varietà di grano duro, tutte caratterizzate da una tessitura della cariosside particolarmente dura (Giroux e Morris 1997). In effetti le puroindoline sono ritenute i fattori principali della durezza della cariosside, carattere che influisce sulla resa in farina alla macinazione, sul grado di danneggiamento dell'amido e sull'assorbimento idrico degli impasti. Inoltre, per le loro proprietà lipofile, le puroindoline manifestano effetti positivi sulla tessitura della mollica e sul volume del pane.

L'attività di ricerca e sperimentazione svolta nell'ambito del presente progetto ha riguardato il trasferimento dei geni *PinA-D1* e *PinB-D1* dal grano tenero al grano duro e la valutazione degli effetti delle puroindoline sulla durezza della cariosside e sulle caratteristiche reologiche e nutrizionali delle semole di grano duro.

Per trasferire i geni puroindolinici si è ricorso all'incrocio tra due genotipi particolari: la linea tetraploide di sostituzione cromosomica Langdon 5D(5B) e la linea mutata Cappelli ph1c. La prima è una linea tetraploide in cui il cromosoma 5B è stato sostituito dal cromosoma 5D della varietà di grano tenero Chinese Spring, la seconda è una linea derivata dalla varietà di grano duro Cappelli in cui manca il gene Ph1 portato dal cromosoma 5B (Giorgi, 1978). L'assenza di quest'ultimo gene in un parentale dell'incrocio e la mancanza del cromosoma 5B nell'altro fa sì che nella progenie dell'incrocio stesso vengano facilitati l'appaiamento e la ricombinazione tra i cromosomi omeologhi 5D e 5B, con possibile trasferimento dei geni puroindolinici dal primo cromosoma al secondo.

Nel presente lavoro, la progenie F₁ è stata autofecondata per 5 generazioni e poi utilizzata per studi biochimici e analisi tecnologiche. Allo scopo di isolare individui contenenti un evento di ricombinazione tra il cromosoma 5B e il

cromosoma 5D, 48 piante F₂ sono state sottoposte a focalizzazione isoelettrica (IEF) per determinare la loro composizione in IBF (Iodine Binding Factor) così come descritto da Liu e Gale (1989). L'osservazione che un componente principale (banda 4) dello spettro IBF della varietà Langdon (Figura 5, corsia A, freccia) manca nella linea di sostituzione cromosomica Langdon 5D(5B) (Figura 5, corsia B) suggerisce che questo componente è sotto il controllo genetico del locus *Ibf-B1* nel cromosoma 5BL (Liu e Gale, 1989). D'altra parte, le bande IBF 1+2 nella linea di sostituzione Langdon 5D(5B) (Figura 5, corsia B, frecce) sono state assegnate al locus *Ibf-D1* sul cromosoma 5DL in quanto mancano nella varietà Langdon (corsia A). Nelle progenie analizzate sono state identificate tre classi fenotipiche caratterizzate dalla presenza di (i) solo banda 4 ; (ii) solo bande 1+2 e (iii) bande 1+2 e 4. In particolare, la classe fenotipica (i) è stata riscontrata in solo 3 piante (Figura 5, corsie 2, 3 e 10).

La progenie F₃ di queste piante è stata analizzata mediante amplificazione PCR del DNA di giovani foglie (Figura 6), osservando la presenza dei loci *Pina-D1* and *Pinb-D1* in 25 piante su 74, a dimostrazione di una avvenuta ricombinazione tra i cromosomi 5B and 5D.

L'amplificazione PCR è stata condotta anche su 12 piante F₂ contenenti *Ibf-B1* e *Ibf-D1* (Figura 5, corsie 6, 7 e 9). Tra le 348 piante F₃ analizzate, 127 presentavano sia *Pina-D1* che *Pinb-D1*. Queste piante sono state autofecondate e sulla progenie F₄ sono state identificate 48 piante prive delle bande IBF 1+2 codificate da *Ibf-D1* nel cromosoma 5DL ma dotate della banda 4 codificata da *Ibf-B1* nel cromosoma 5BL, come atteso in caso di ricombinazione tra i cromosomi omeologhi 5B e 5D.

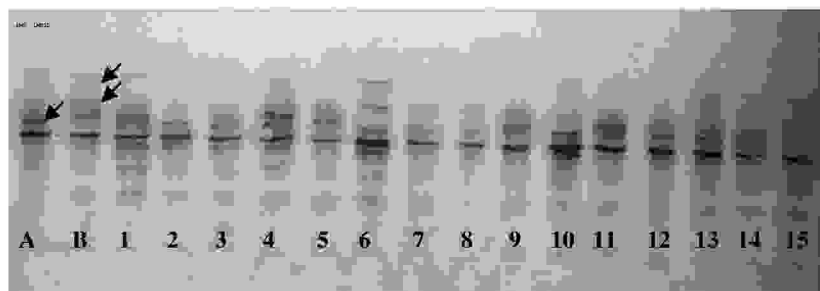


Figure 5. Frazionamento IEF di semi F₂ ottenuti dall'incrocio Langdon 5D(5B) x Cappelli *ph1c*. lew frecce indicano le bande IBF codificate dal locus *Ibf-B1* (corsia A) e *Ibf-D1* (corsia B). A: cv. Langdon; B: linea di sostituzione Langdon 5D(5B); 1-15: semi F₂



Figure 6. Amplificazione PCR di DNA di piante F₃ prive del locus *Ibf-D1*, usando primer specifici per le puroindoline pin A e pin B. Le piante contenenti pin A e pin B (corsie 1-4 e 7-10) sono state moltiplicate per autofecondazione

Le 48 piante ricombinanti sono state analizzate per la durezza del seme utilizzando il metodo SKCS 4100. Quattordici di queste piante hanno dato un valore medio di SKCS di 33, tipico di frumenti a tessitura soffice e pertanto sono state considerate omozigoti per la presenza dei loci *Pina-D1* e *Pinb-D1*. Queste piante sono state allevate per due generazioni producendo 14 linee pure ricombinanti (LPR) sulle quali sono state condotte analisi biochimiche e tecnologiche.

I bassi valori di SKCS riscontrati nelle 14 linee pure ricombinanti suggeriscono che le puroindoline sono in grado di modificare la durezza del seme anche in genotipi tetraploidi (Tabella 3). D'altra parte, le linee ricombinanti non hanno evidenziato differenze significative in termini di contenuto proteico, indice del glutine, contenuto in glutine e contenuto di proteine insolubili rispetto alle varietà commerciali di grano duro utilizzate come controllo (Tabella 3).

Genotipo	SKCS	Contenuto proteico (%) (A)	Contenuto glutine (%)	Volume di sedimentazione (ml) (B)	Volume specifico (B/A)	Indice di glutine	Contenuto in proteine insolubili (%)
LPR	35	17,3	12,9	32	1,8	57	14,9
Ciccio	98	20,1	14,5	39	1,9	56	16,9
Colosseo	92	18,0	12,8	39	2,2	54	14,9
Creso	85	14,9	9,3	37	2,5	55	12,8
Grazia	94	13,9	9,7	34	2,4	66	11,8
Simeto	92	19,7	14,4	41	2,1	57	16,3

Tabella 3. Caratteristiche qualitative di 14 linee pure ricombinanti (LPR) di grano duro contenenti pinA e pinB a confronto con 5 varietà commerciali di grano duro.

Tuttavia è stato osservato una leggera diminuzione del volume di sedimentazione in SDS e nel volume specifico di sedimentazione (volume di sedimentazione/contenuto proteico). Se tiene conto delle mediocri caratteristiche qualitative delle linee parentali Langdon 5D(5B) e Cappelli *ph1c*, i risultati ottenuti indicano che l'introduzione delle puroindoline nelle 14 linee di grano duro analizzate non ha avuto un effetto deleterio sul contenuto proteico e sulla qualità del glutine, mentre ha cambiato nettamente la tessitura delle cariossidi.

Le linee ricombinanti sono state incrociate con le varietà commerciali Colosseo, Simeto e Primadur allo scopo di sviluppare genotipi a tessitura soffice con caratteristiche qualitative superiori dal punto di vista tecnologico e nutrizionale, mai riscontrate nei frumenti tetraploidi.

4. Conclusioni

La sperimentazione condotta nell'ambito del presente progetto ha dimostrato che è possibile migliorare la qualità panificatoria del grano duro intervenendo sulla composizione proteica ed introducendo specifiche proteine normalmente assenti in questa specie. Inoltre è stata dimostrato che è possibile modulare la tessitura della cariosside di grano duro attraverso la manipolazione dei geni che controllano la sintesi delle puroindoline. Per le loro particolari proprietà chimiche queste piccole proteine potrebbero avere un effetto positivo sulla qualità panificatoria e nutrizionale del grano duro.

Bibliografia

- Branlard G. e Dardevet M. (1985), *Diversity of grain protein and bred wheat quality, II Correlation between high molecular weight subunits of glutenin and flour quality characteristics*, J. Cereal Sci. 3 :345-354.
- Damidaux R., Autran J. C., Grignac P. e Feillet P. (1978), *Mise en evidence de relations applicable en selection entre l'electrophoregramme des gliadines et les proprietes viscoelastique du gluten de Tr, Durum Desf. C.R. Acad. Sci. Paris Serie D : 701-704.*
- Dubreil, L., Gaborit B., Bouchet B., Gallant D. J., Broekaert L., Quillien L. e Marion D. (1998), *Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of Triticum aestivum seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties.* Plant Sci. 138:121-135.
- Gautier M. F., Aleman M.E., Guirao D., Marion D. e Joudrier P. (1994), *Triticum aestivum puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins : cDNA sequence analysis and developmental gene expression*, Plant Mol. Biol. 25:43-57.
- Giorgi B. (1978), *A homoeologous pairing mutant isolated in Triticum durum cv. Cappelli.* Mutation Breeding Newsletter 11: 4-5.
- Greenwell P. e Schofield J. D. (1986), *A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat*, Cereal Chemistry 63: 379-380.
- Gupta R. B., Bekes F. e Wringley C. W. (1991), *Prediction of phisical dough properties from glutenin subunit composition in bread wheats: correlation studies*, Cereal Chem. 68 :328-333.
- Halford N. G., Field J. M., Blair H., Urvin P., Moore K., Robert L., Thompson R., Flavell R. B., Tatham A. e Shewry P. R., (1992), *Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bred wheat (T, aestivum L.) indicates quantitative effects on grain quality.* Theor. Appl. Genet. 83 : 373-378.
- Heubner F. R. e Wall J. S. (1976), *Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality*, Cereal Chem. (53) :62-67.
- Kosmolak F. G., Dexter J.E., Matsuo R. R., Leisle D. e Marchylo B.A. (1980), *A relationship between durum whet quality and gliadin electrophoregrams*, Canadian Journal Pl. Sci. 60 : 427-432.
- Liu C. J. e Gale M. D. (1989), *Ibf-1 (Iodine binding factor), a highly variable marker system in the Triticeae.* Theor. Appl. Genet. 77:233-240.
- Liu C. Y. e Shepherd K. W. (1995), *Inheritance of B subunits of glutenin and w- and g-gliadins in tetraploid wheats*, Theor. Appl. Genet. 90 : 1149 - 1157.

- Payne P. I., Corfield K. G. e Blackman J.A. (1979), *Identification of high-molecular weight subunit of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree*. Theor. Appl. Genet. 55: 153-159.
- Payne P. I., Jackson E. A. e Holt L. (1984), *The association between gamma-gliadin 45 and gluten strenght in durum wheat varieties: a direct causal effect or the result of genetic linkage?*, J. Cereal Sci. 2 :73-81,
- Payne P. I. (1987), *Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality*, Ann. Rev. Plant Physiol. 38:141-53.
- Pogna N. E., Autran J.C., Mellini F., Lafiandra D. e Feillet P. (1990), *Chromosome 1B-encoded gliadin and glutenin subunits in durum wheat genetics and relationship to gluten strenght*, J. Cereal Sci. 11 :15-34.
- Redaelli R., Morel M., H. Autran J. C. e Pogna N. E. (1995), *Genetic analysis of low Mr glutenin subunits fractionated by two-dimensional electrophoresis A-PAGE x SDS-PAGE*. J Cereal Sci 21 : 5-13
- Tranquilli G., Lijavetzky D., Muzzi G. e Dubcovsky J. (1999), *Genetic and physical characterisation of grain texture-related loci in diploid wheat*. Mol. Gen. Genet. 262:846-850.
- Wasik R. J. e Bushuk W. (1975), *Relationship between molecular weight distribution of endosperm proteins and spaghetti-making quality of wheats*, Cereal Chem. 51 : 322-328