

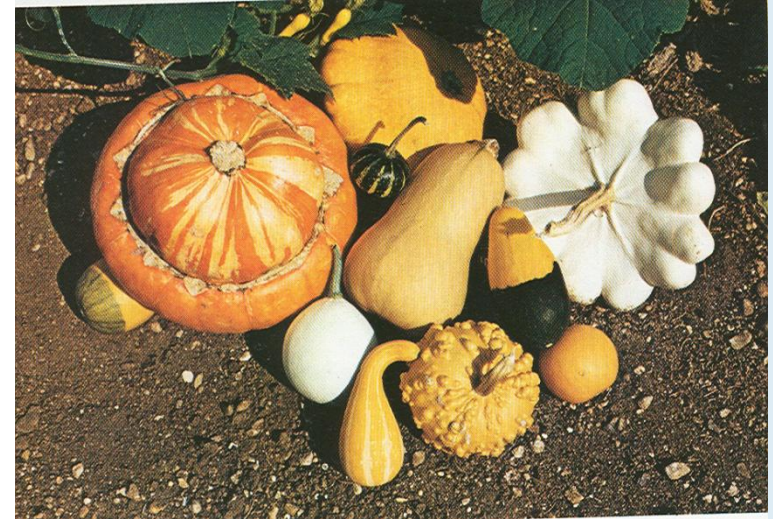
Approcci molecolari per il miglioramento genetico di tratti correlati con la qualità tecnologica del frumento

Laura Gazza

CREA- Centro di Ricerca Ingegneria e Trasformazioni agro-alimentari- Roma

laura.gazza@crea.gov.it



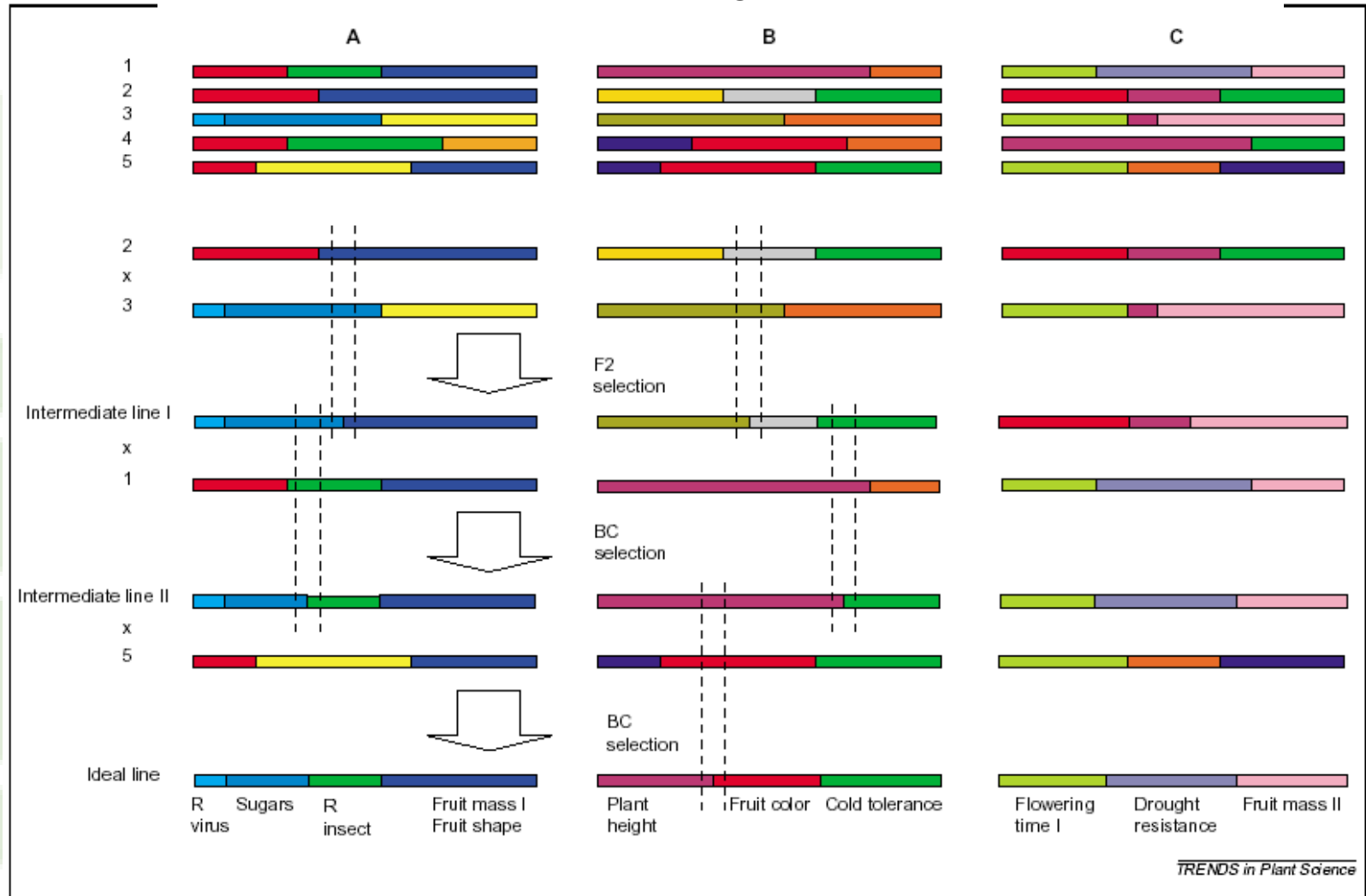


IL MIGLIORAMENTO GENETICO (Breeding) SFRUTTA LA VARIABILITA' GENETICA NATURALE O INDOTTA

IN ASSENZA DI VARIABILITA' NON SI PUÒ FARE MIGLIORAMENTO

OBIETTIVO del BREEDING

Subsequent selfings (F2) and BackCross (BC) selections lead to the desired superior elite line genotype (Breeding by design)



Da: Peleman e van der Voort, Trends Plant Sci 2003

BIOTECNOLOGIE per il miglioramento genetico in agricoltura

SELEZIONE (breeding) MARKER ASSISTITA (MAS o MAB)

INGEGNERIA CROMOSOMICA

MUTAGENESI TILLING

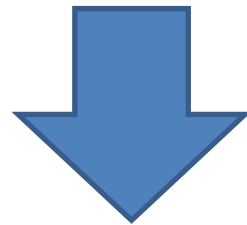
TRANSGENESI

GENOME EDITING

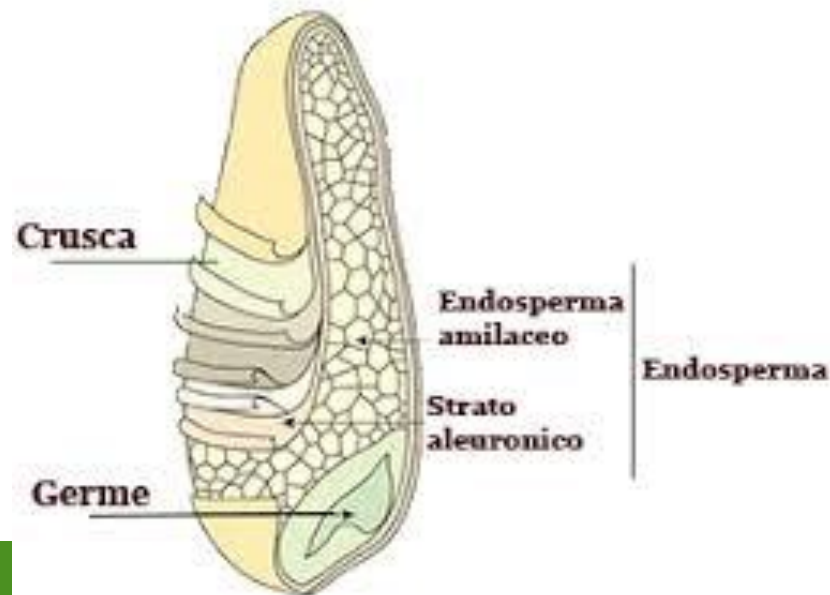




Miglioramento Genetico di un carattere importante per la qualità tecnologica dei cereali



La Tessitura della Cariosside



La tessitura della cariosside di frumento

Triticum aestivum (AABBDD)



SOFT

10 <SKCS< 40



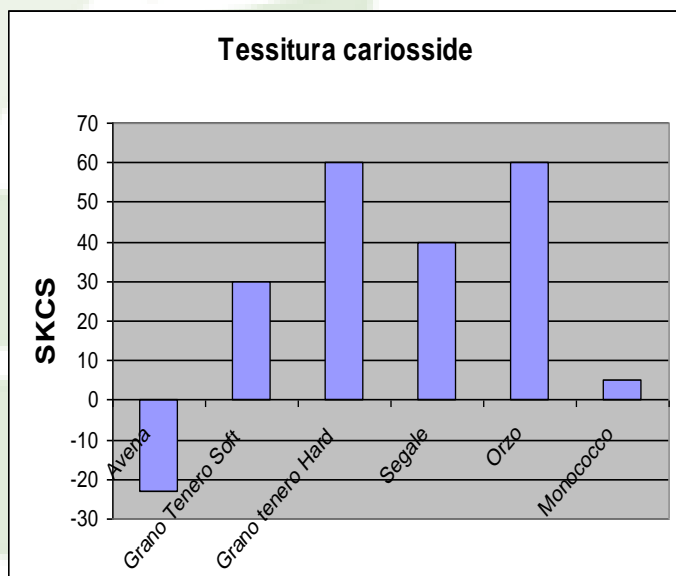
HARD

50 <SKCS< 90

Triticum durum (AABB)

EXTRA HARD

90 <SKCS< 120



482Abianco ; valore medio SKCS 29.58

-20

50

120

Single Kernel Characterization System
(Perten 4100)



0702/CS/CA

La durezza della cariosside determina



Destinazione d'uso



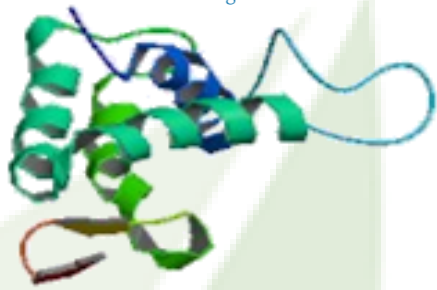
: -minore resa in farina

-maggior consumo energetico alla macinazione

-maggior danneggiamento dell'amido

-maggior assorbimento di acqua nell'impasto

Basi biochimiche: La soffici ta della cariosside   legata alla presenza delle Puroindoline (Pins)



puroindolina A

60% d' identit  di sequenza



puroindolina B

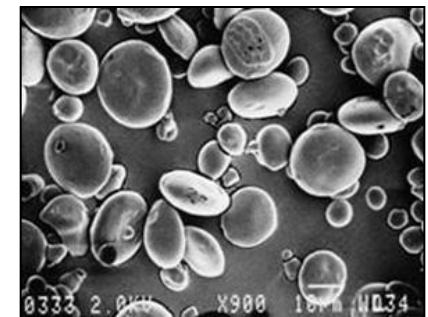
Vengono espresse solo nell'endosperma

Si trovano associate ai granuli d'amido

peso molecolare delle proteine mature 13 kDa

ricche di **triptofano** e cisteina

punto isoelettrico:
10,5 pin-A
10,7 pin-B.



La presenza di un dominio idrofobico ricco in triptofano (puros = grano; indoline= anello indolico del W), è alla base di alcune proprietà biochimiche delle pins:

Consiglio per la ricerca in agricoltura
e l'analisi dell'economia agraria

Alta affinità per i lipidi polari

Elevata capacità emulsionante

Attività antimicrobica sia in vitro che in vivo

Effetto delle proprietà emulsionante delle puroindoline sull'attitudine panificatoria



determinano effetti positivi sulla alveolatura della mollica e sul volume del pane

diminuiscono la tenacità dell'impasto



Caratterizzazione fenotipica per analizzare la variabilità del carattere

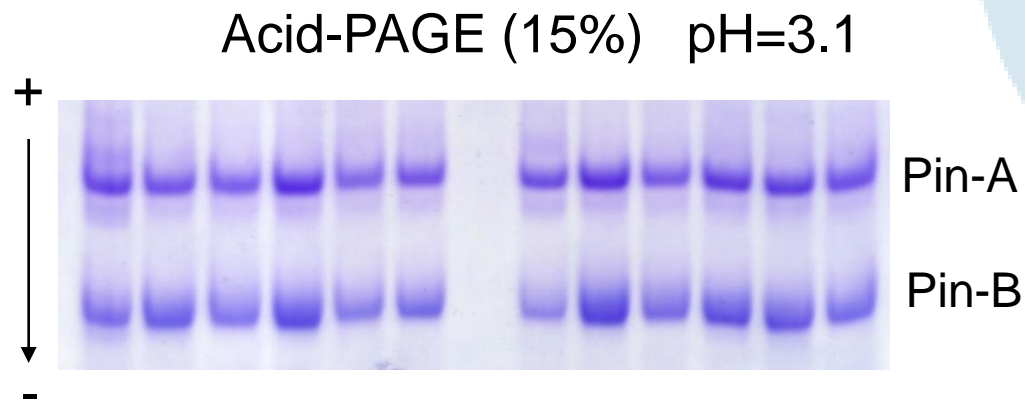


Consiglio per la ricerca in agricoltura
e l'analisi dell'economia agraria

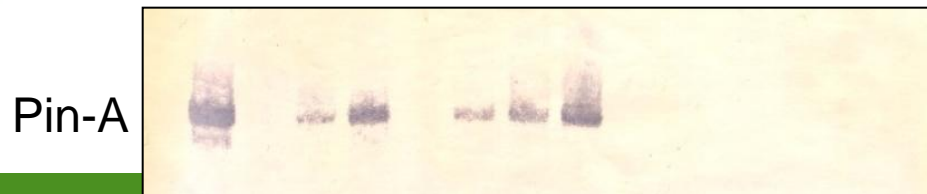
**Pin-A e Pin-B hanno lo stesso peso molecolare
e punto isoelettrico molto simile**

Si estraggono a partire da granuli di amido isolati

Sono estratte con una soluzione salino/alcolica

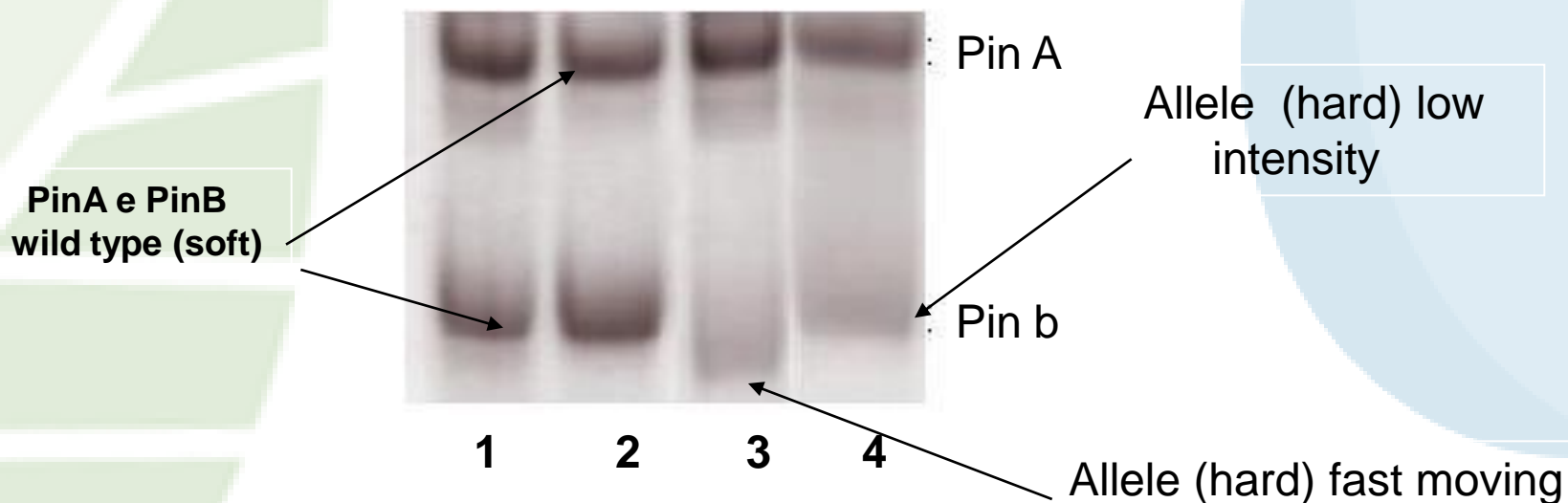


Immunoblotting con anticorpo contro peptide sintetico



Caratterizzazione fenotipica: varianti di mobilità elettroforetica

A-PAGE delle puroindoline in varietà di grano tenero



1. cv. Bolero
2. cv. C.Spring
3. cv. Soissons
4. cv. Mieti

PUROINDOLINA A M K A L F L I G L L A L V A S T A F A Q
PUROINDOLINA B M K T L F L L A L L A L V A S T T F A Q

Y S E V V G S [↓] Y D V A G G G G A Q Q C P
 Y S E V G G W Y N E V G G G G G S Q Q C P

V E T K L N S C R N Y L L D R C S T M K
 Q E R P K L S S C K D Y V M E R C F T M K

D F P V T W R W W K W W K G G C Q E L L
 D F P V T W P T K W W K G G C E H E V R

G E C C S R L G Q M P P Q C R C N I I Q
 E K C C K Q L S Q I A P Q C R C D S I R

G S I Q G D L G G I F G F Q R D R A S K
 R V I Q G R L G G F L G I W R G E V F K

V I Q E A K N L P P R C N Q G P P C N I
 Q L Q R A Q S L P S K C N M G A D C K F

P G T I G Y Y W
 P ↑ S ↑ G Y Y W

Ci sono dieci residui di Cisteina, conservati esattamente nelle stesse posizioni che troviamo in tutte le proteine appartenenti alla famiglia 2S

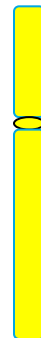
Il carattere durezza della cariosside è un carattere genetico semplice (major gene).

Il locus *Ha* controlla questo carattere

fenotipo “granella soffice” (*Ha*)
dominante

fenotipo “granella dura” (*ha*)
recessivo

LOCALIZZAZIONE



parte
terminale
del braccio
corto del
cromosoma
5D

**è quindi assente
nel frumento duro
(genoma AABB).**

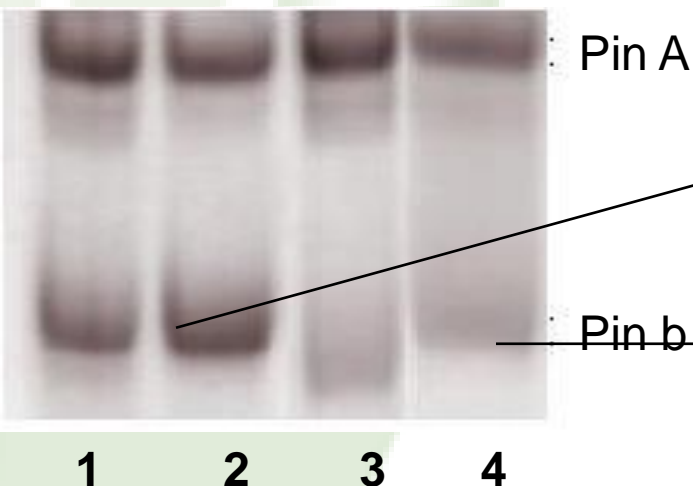
I geni per le puroindoline sono denominati ***Pina-D1*** e ***Pinb-D1***.

Pina-D1 e Pinb-D1 sono in stretto linkage nel locus *Ha*

La variabilità nella tessitura della cariosside è associata alla presenza/assenza o a un polimorfismo di sequenza della puroindolina a e b

Polimorfismi della puroindolina b

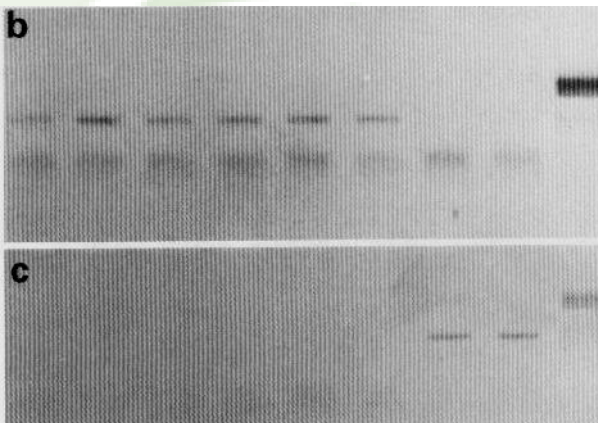
A-PAGE



POSITION	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
<i>Pinb-D1a</i>	AAA	TGG	TGG	AAG	GGC	GGC	TGT	GAG	CAT	GAG
	K	W	W	K	G	G	C	E	H	E
<i>Pinb-D1b</i>	AAA	TGG	TGG	AAG	<u>AGC</u>	GGC	TGT	GAG	CAT	GAG
	K	W	W	K	<u>S</u>	G	C	E	H	E
<i>Pinb-D1d</i>	AAA	TGG	<u>AGG</u>	AAG	GGC	GGC	TGT	GAG	CAT	GAG
	K	W	<u>R</u>	K	G	G	C	E	H	E

Con la costruzione di primers reverse specifici per il nucleotide "serina/glicina", siamo in grado con una semplice PCR di capire la classe allelica a cui appartiene una varietà.

1 2 3 4 5 6 7 8



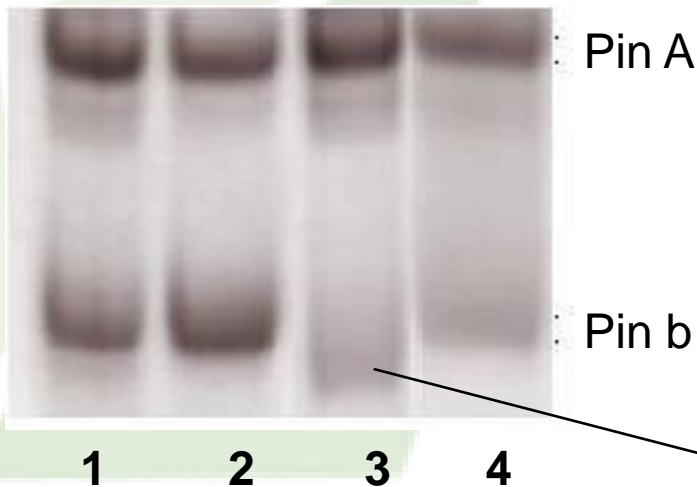
→ PCR con primers specifici per la Pinb/Gly (*pinb-D1a*)

→ PCR con primers specifici per la Pinb/Ser (*pinb-D1b*)

1. Cv. Bolero
2. Cv. C.Spring
3. Cv. Artico
4. Cv. Bramante
5. Cv. Carisma
6. Cv. Leone
7. Cv. Mieti
8. Cv. Sagittario



Corona et al. (2001). J.Cereal Science 34:243-250;



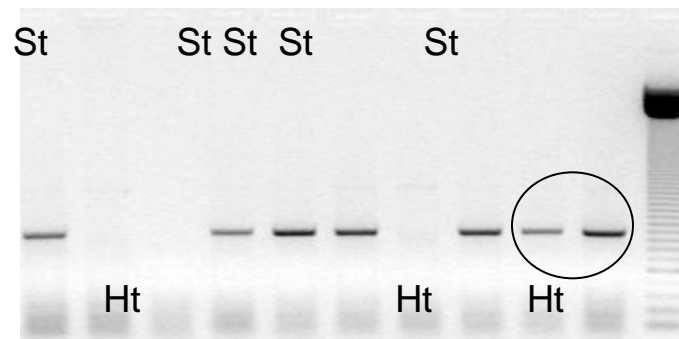
POSITION	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
<i>Pinb-D1a</i>	AAA	TGG	TGG	AAG	GGC	GGC	TGT	GAG	CAT	GAG
	K	W	W	K	G	G	C	E	H	E
<i>Pinb-D1b</i>	AAA	TGG	TGG	AAG	<u>AGC</u>	GGC	TGT	GAG	CAT	GAG
	K	W	W	K	<u>S</u>	G	C	E	H	E
<i>Pinb-D1d</i>	AAA	TGG	<u>AGG</u>	AAG	GGC	GGC	TGT	GAG	CAT	GAG
	K	W	<u>R</u>	K	G	G	C	E	H	E

Corona, Gazza, Zanier and Pogna "A tryptophan-to-arginine change in the tryptophan-rich domain of puroindoline b in five French bread wheat cultivars. *J. Genetics & Breeding* (2001). 55: 187-189.

PCR con primers specifici per la regione codificante della Pin-A

St= Soft Texture

Ht= Hard Texture



? CVs Glenman e Fortuna sono a tessitura hard (Ht) ma rispondevano in PCR sia con i primers specifici per la Pin-A sia per quelli della Pin-B tipo wild-type.....

Fortuna & Glenman
Pina-Dla

ATGAAGGCCCTCTTCCTCATAGGACTGCTTGCTCTGGTAGCGAGCACCGCCTTTGCGCAA 60
ATGAAGGCCCTCTTCCTCATAGGACTGCTTGCTCTGGTAGCGAGCACCGCCTTTGCGCAA 60

Fortuna & Glenman
Pina-Dla

TATAGCGAAGTTGTTGGCAGTTACGATGTTGCTGGCGGGGGTGGTGCTCAACAATGCCCT 120
TATAGCGAAGTTGTTGGCAGTTACGATGTTGCTGGCGGGGGTGGTGCTCAACAATGCCCT 120

Fortuna & Glenman
Pina-Dla

GTAGAGACAAAGCTAAATTCATGCAGGAATTACCTGCTAGATCGATGCTCAACGATGAAG 180
GTAGAGACAAAGCTAAATTCATGCAGGAATTACCTGCTAGATCGATGCTCAACGATGAAG 180

Fortuna & Glenman
Pina-Dla

GATTTCCCGGTCACCTGGCGTTGGTGGAAATGGTGGAAAGGGAGGTTGTCAAGAGCTCCTT 240
GATTTCCCGGTCACCTGGCGTTGGTGGAAATGGTGGAAAGGGAGGTTGTCAAGAGCTCCTT 240

Fortuna & Glenman
Pina-Dla

GGGGAGTGTTCAGTCGGCTCGGC-AAATGCCACCGCAATGCCGCTGCAACATCATCCAG 299
GGGGAGTGTTCAGTCGGCTCGGCCAAATGCCACCGCAATGCCGCTGCAACATCATCCAG 300

Fortuna & Glenman
Pina-Dla

GGGTCAATCCAAGGCGATCTCGGTGGCATCTTCGGATTTAGCGTGATCGGGCAAGCAAA 359
GGGTCAATCCAAGGCGATCTCGGTGGCATCTTCGGATTTAGCGTGATCGGGCAAGCAAA 360

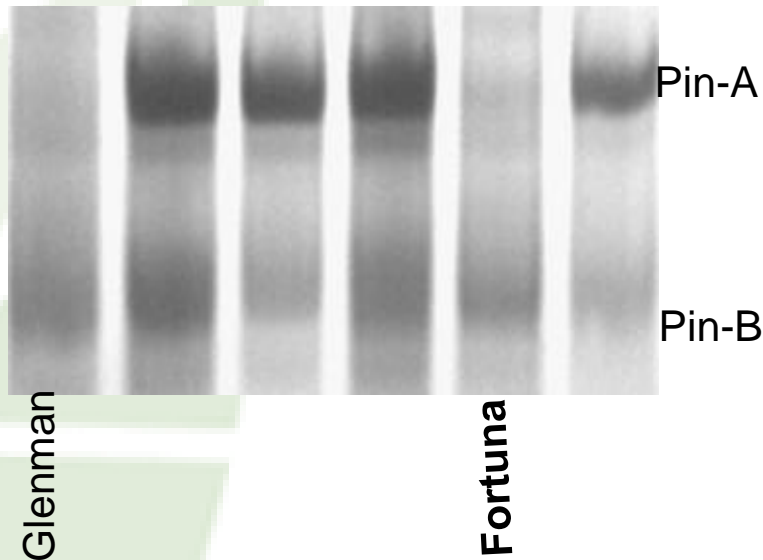
Fortuna & Glenman
Pina-Dla

GTGATACAAGAAGCCAAGAACCTGCCGCCAGGTGCAACCAGGGCCCTCCCTGCAACATC 419
GTGATAACAAGAAGCCAAGAACCTGCCGCCAGGTGCAACCAGGGCCCTCCCTGCAACATC 420

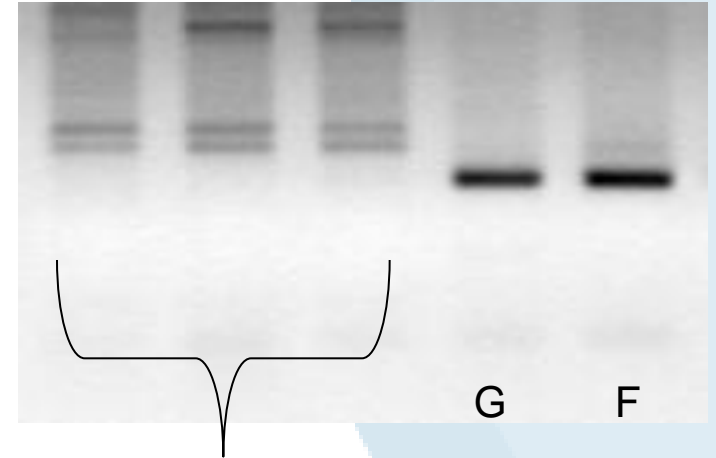
Fortuna & Glenman
Pina-Dla

CCCGGCACTATTGGCTATTACTGGTGA 446
CCCGGCACTATTGGCTATTACTGGTGA 447

A-PAGE



PCR con primers specifici per
Pina-D1c



Cv di grano tenero nulli
A a tessitura hard

L.Gazza, F.Nocente, PK.W. Ng and N.E. Pogna. "Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivars lacking puroindoline a". *Theor Appl Genet.*(2005). 110:470-478.



Riassumendo: Composizioni alleliche riscontrate a carico delle puroindoline nei frumenti teneri

SOFT

pina-D1a = Puroindolina a presente
pinb-D1a = Puroindolina b GLY46

HARD

1. pina-D1a = Puroindolina a presente
pinb-D1b = Puroindolina b SER46 (Giroux e Morris, *TAG*, 1996)
2. pina-D1a = Puroindolina a presente
pinb-D1d = Puroindolina b ARG44 (Corona et al., *JG&B*, 2001)
3. pina-D1b = Puroindolina a assente (Giroux e Morris, *PNAS*, 1998)
pinb-D1a = Puroindolina b GLY46
4. Pina-D1c = Puroindolina a assente per codone stop (Gazza et al., *TAG*, 2005)
Pinb-D1b = Puroindolina b GLY46
- 5,6,7 pina-D1a = Puroindolina a presente
pinb-D1e,f,g diversi codoni di stop

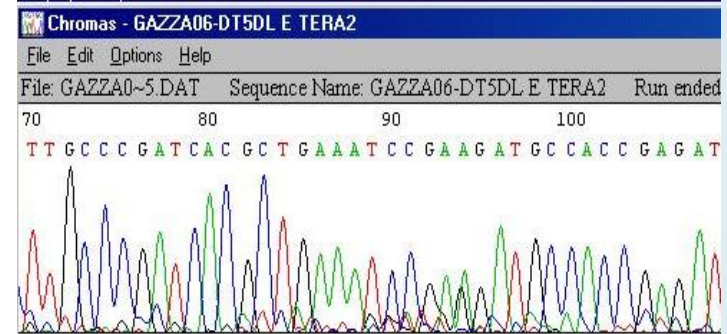


Table I SKCS values of bread wheat cultivars with different allele compositions at puroindoline-encoding loci *Pina-D1* and *Pinb-D1*

SKCS value									
<i>Pina-D1a</i> <i>Pinb-D1a</i>		<i>Pina-D1a</i> <i>Pinb-D1b</i>		<i>Pina-D1a</i> <i>b1</i>		<i>Pina-D1b</i> <i>Pinb-D1a</i>		<i>Pina-D1b</i> <i>b2</i>	
Cultivar		Cultivar		Cultivar		Cultivar		Cultivar	
Aurelio	37	Bezostaja	n.d.	Bellevue	66	Amidon	86	Eridano	87
Bilancia	28	Brasilia	83	Courtot	67	Barra	86	Kalyansona	n.d.
Bolero	28	Cerere	82	Fortuna	80	Ciano	61	Super X	92
Centauro	21	Colfiorito	75	Galaxie	77	Dorico	85		
Ch. Spring	33	Cologna 21	65	Soissons	53	Fortuna (U.S.A.)	74	<i>Mean value</i>	89
Lampo	27	David	58			Glenman	69		
Leone	10	Democrat	66	<i>Mean value</i>	69	Golia	84		
Leopardo	12	Etruria	n.d.			Guadalupe	75		
Libero	35	Francia	71			Inia 66	n.d.		
Livio	n.d.	Gemini	65			Jecora	n.d.		
Mentana	7	Genio	74			Idice	75		
Mosè	n.d.	Gladio	78			Manital	75		
Neviano	40	Marberg	71			Mendos	n.d.		
Oscar	40	Mieti	65			Padus	87		
Serena	31	Newana	61			Prinqual	n.d.		
		Pandas	64			Sibilia	71		
<i>Mean value</i>	27	Pascal	71			<i>Mean value</i>	77		
		Sagittario	62						
		Salgemma	77						
		Saliente	70						
		Salmone	75						
		Serio	67						
		Veda	68						
		Zena	65						
		<i>Mean value</i>	69						

Altri fattori contribuiscono alla variazione della tessitura della cariosside

QTL identificati su
diversi cromosomi

fattori ambientali

condizioni colturali e pratiche
agronomiche



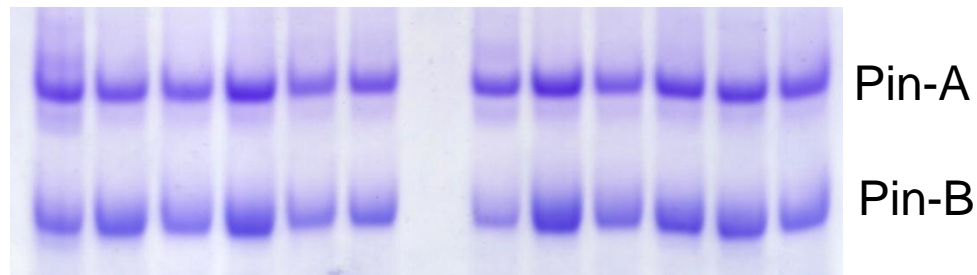
Determinazione dei fattori ambientali che influenzano la tessitura della cariosside di frumento tenero

e l'analisi dell'economia agraria

13 varietà di frumento tenero con la stessa composizione allelica ai loci puroindolnici, sono state allevate nelle stesse condizioni in 6 località diverse.

Sono state estratte le puroindoline dalla stessa quantità di granuli d'amido e frazionate in A-PAGE.

A-PAGE puroindoline di varietà soft:composizione allelica wild type



I gel di A-PAGE sono stati esaminati al densitometro, per valutare la quantità di puroindoline

Trait	Texture class	Protein content	Kernel weight	Pin-A level§	Pin-B level§	Pin-A/Pin-B ratio
SKCS value	<i>STC</i>	0.36*	- 0.47**	- 0.30	- 0.22	- 0.13
	<i>HTC</i>	0.10	- 0.64**	- 0.25	- 0.09	- 0.17
Protein content	<i>STC</i>		- 0.04	0.18	0.34*	- 0.29
	<i>HTC</i>		- 0.01	-0.10	- 0.01	- 0.01
Kernel weight	<i>STC</i>			0.09	0.26	- 0.24
	<i>HTC</i>			0.49*	0.37*	- 0.04
Pin-A level	<i>STC</i>				0.73**	0.24
	<i>HTC</i>				0.68**	0.13
Pin-B level	<i>STC</i>					- 0.45**
	<i>HTC</i>					- 0.53**

Il principale fattore ambientale in grado di influenzare la durezza della cariosside è risultato essere il peso del chicco.

“Genetic and environmental factors affecting grain texture in common wheat”
Gazza, Taddei, Corbellini, Cacciatori and Pogna. Journal Cereal Science (2008). 47:52-58.

L'utilizzo di due NILs che differiscono per la tessitura della cariosside ci ha permesso di valutare l'effetto delle puroindoline sulle proprietà viscoelastiche e sull'attitudine panificatoria all'interno dello stesso background genetico.

Farinograph parameters	ENE 1947 Soft	ENE 1949 Hard	ENE comm
Peak time (min)	1.3	1.8	1.7
Stability (min)	1.5	3.4	1.6
Fall (UB)	90	106	88
Water abs (%)	52.8	61.7	54.9

Alveogr param.	ENE 1947 Soft	ENE 1949 Hard	ENE comm
G	20.8	16.8	19.5
P	77	125	75
L	87	57	77
P/L	0.89	2.19	0.97
W	217	255	182



Bread quality	Ene 1947 soft	Ene 1949 hard	Ene comm
Volume (mL)	705	710	615
Height (cm)	100	100	92

Introduzione dei geni delle puroindoline di *T.aestivum* in *T.turgidum* ssp *durum* mediante ricombinazione allosindetica (ingegneria cromosomica)



Obiettivi:

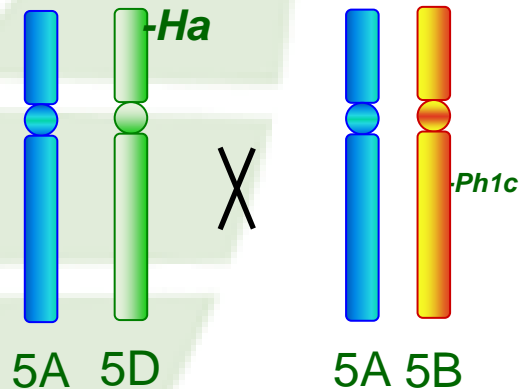
Valutare l'effetto delle puroindoline :

- ✓ Sulla qualità pastificatoria del grano duro, considerando il possibile minore grado di danneggiamento dei granuli d'amido delle semole e di conseguenza la minore quantità d'acqua necessaria per gli impasti.
- ✓ Aumentare la resa in macinazione delle semole
- ✓ Ridurre la granulometria delle semole per la produzione del pane

Ingegneria cromosomica : Ricombinazione allosindetica (Breeding classico)

Lo scambio di materiale genetico (ricombinazione o crossing over) nei genotipi poliploidi può avvenire soltanto tra i cromosomi appartenenti allo stesso genoma (per es. 5B 5B, cromosomi **omologhi**). Questo perchè è presente il locus *ph 1* che previene l'appaiamento dei cromosomi **omeologhi** (per)es. 5B 5D o 5A

LND 5D (5B) Cappelli M (*ph1c*)

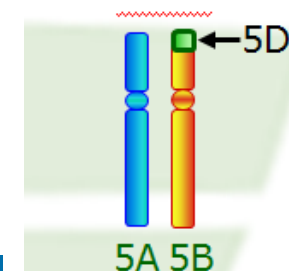


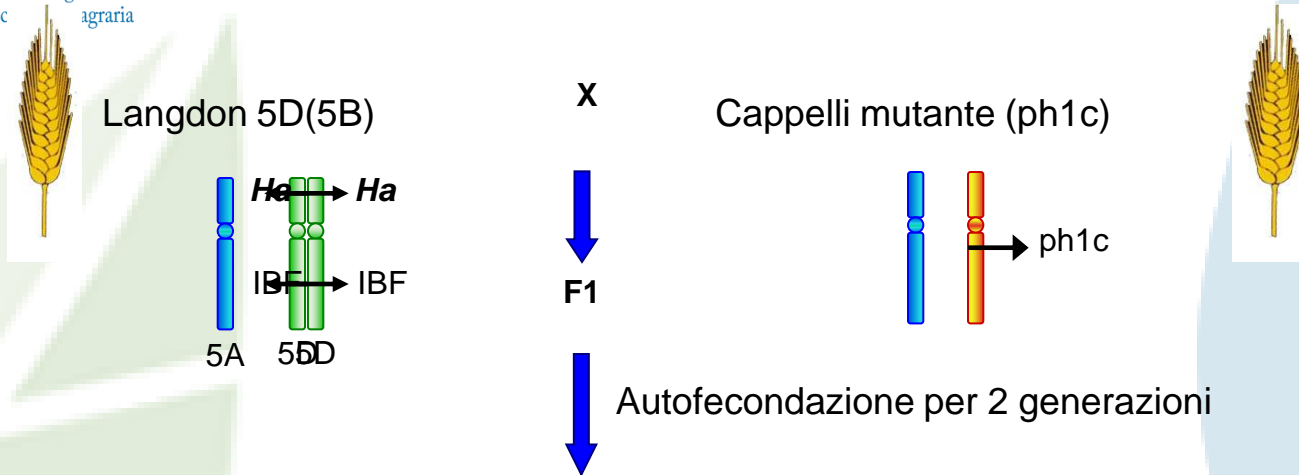
✓ The 5D(5B) substitution line of durum wheat cv. Langdon carrying wild type alleles *Pina-D1a* and *Pinb-D1a* (soft-textured) in *Ha* locus

✓ Cappelli M (Mutant), a deletion line lacking the *Ph1* locus (allele *ph1c*), which prevents pairing of homoeologous chromosomes at meiosis

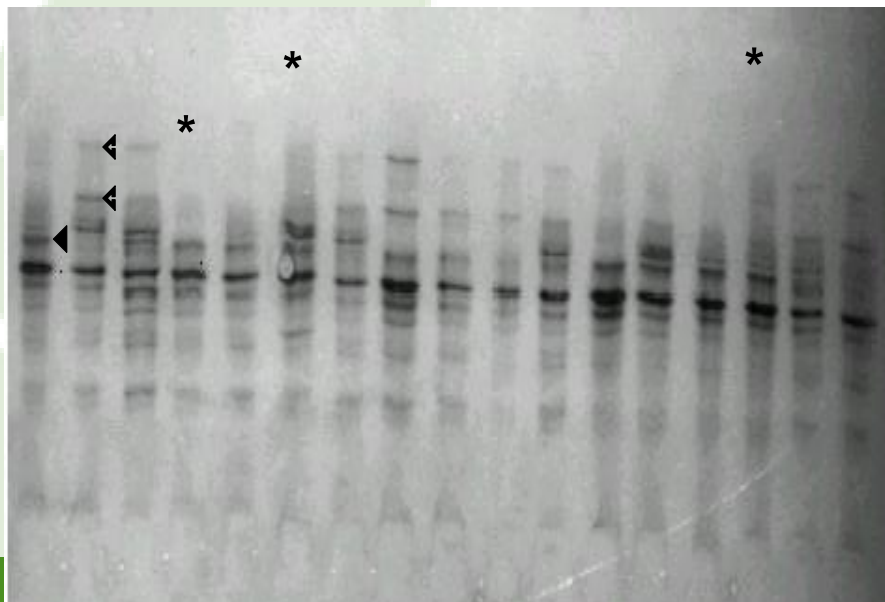
Genotipo ideale:

Frumento tetraploide con il cromosoma 5D tranne un piccolo pezzettino contenente il 5D con il locus *ha* codificante per le puroindoline. Quindi un frumento duro tetraploide a tessitura soft



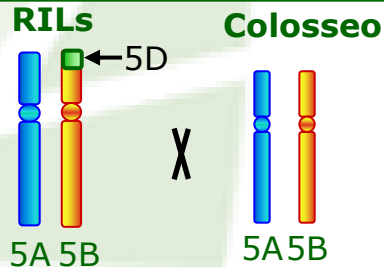


Selezione della progenie per la presenza dei geni puroindolincici e l'assenza dell' IBF del 5DL (Iodine Binding Factor)



IEF (pH range 4-6) of Iodine Binding Factors on F2 half seeds. Samples indicated by stars, lacking the bands encoded by 5DL (open arrows) were selected. Closed arrowhead indicates band encoded by chromosome 5BL.

Ingegneria cromosomica : Ricombinazione allosindetica (Breeding classico)



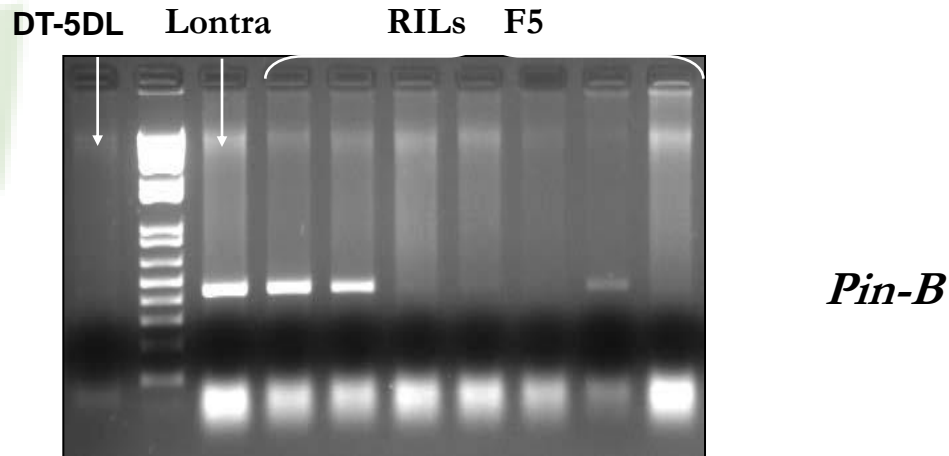
✓ Eleven **F6** recombinant inbred lines (RILs) with soft kernels devoid of chromosome 5D obtained from the cross mentioned above were crossed as the male parent with durum wheat cv. Colosseo.

F9 Soft Durum Lines (SDL1, SDL2 and SDL3) homozygous for *Pina-D1a* and *Pinb-D1a*



F9 Hard Durum Lines (HDL1, HDL2 and HDL3) lacking the *Pina-D1* and *Pinb-D1* loci.

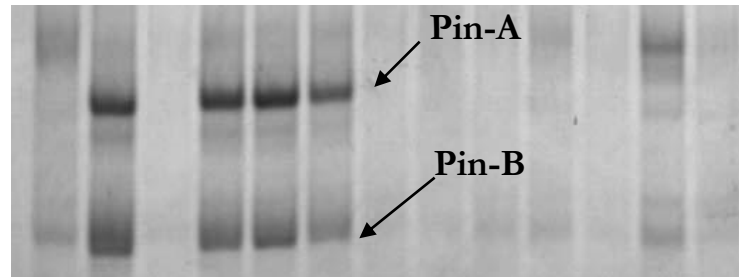
Amplificazione PCR con primers specifici per il geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1* su plantule F5 derivate dall'incrocio RILs x Colosseo.



Su 81 campioni analizzati 49 sono risultati positivi per la presenza di entrambi i geni per le puroindoline

Caratterizzazione fenotipica GDS :

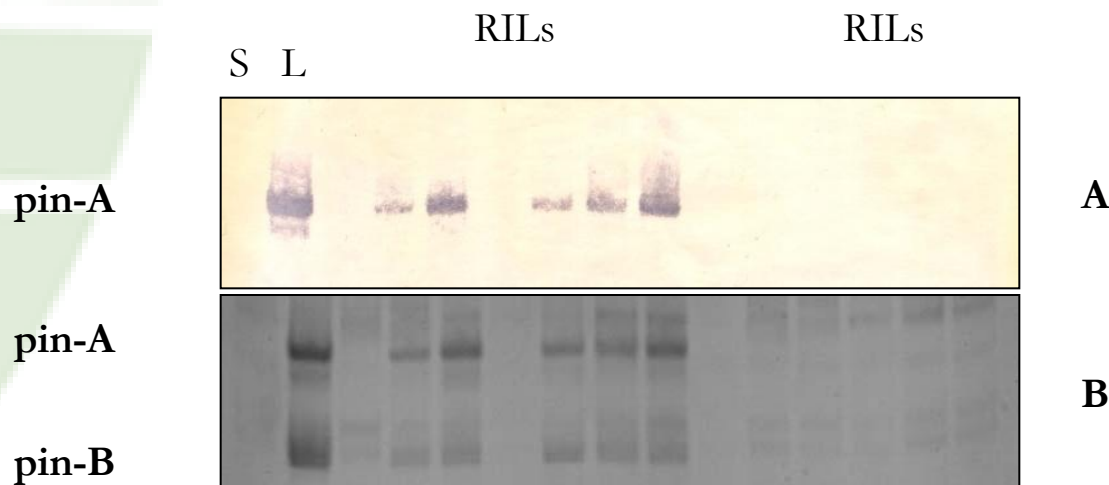
Separazione delle puroindoline tramite elettroforesi A-PAGE di proteine legate ai granuli di amido in cariossidi F5 derivate dall'incrocio RIL x Colosseo



Colosseo Lontra

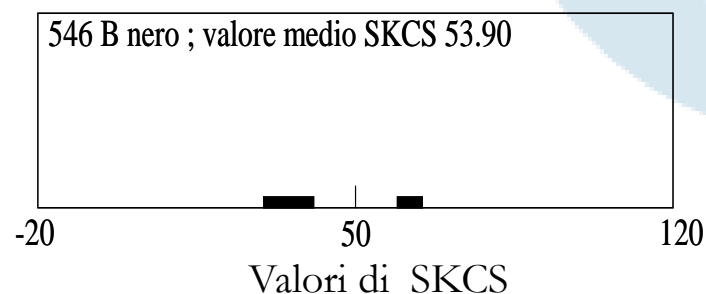
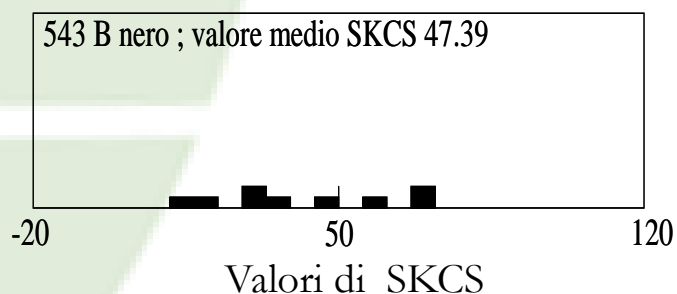
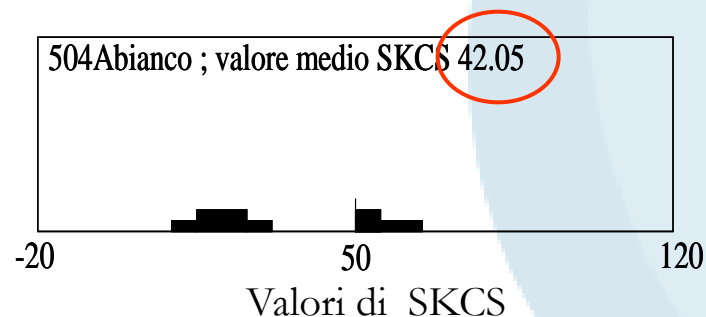
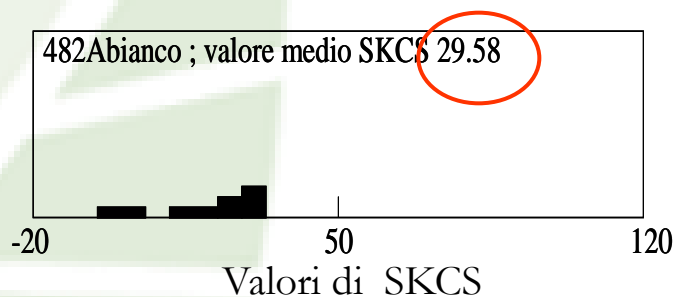
Soltanto in 19 progenie F5 è stata riscontrata la presenza di una coppia di bande con mobilità ed intensità corrispondenti alla Pin-A e alla Pin-B.

- (A) Immunoreazione dell'anticorpo anti-Pin-A specifico per la puroindolina A su proteine estratte dalle progenie F5 dell'incrocio RIL x Colosseo e trasferite su membrana di nitrocellulosa dopo
- (B) Separazione mediante elettroforesi A-PAGE.



S= Simeto (T.durum)
L = Lontra(T.aestivum)

Distribuzione dei valori di SKCS delle linee di grano duro ricombinanti

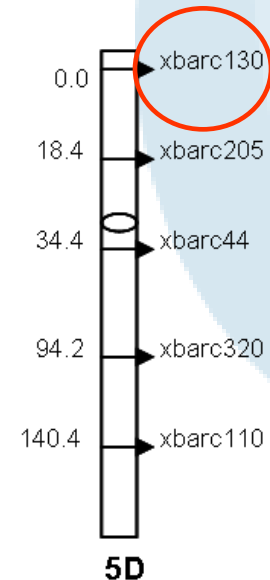
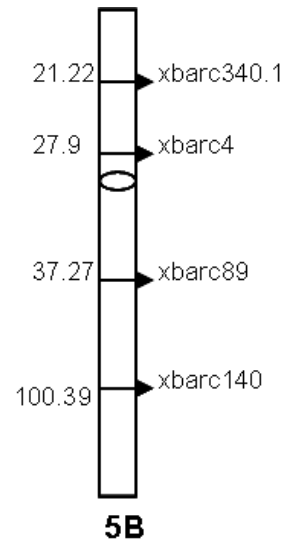


Analisi PCR con marcatori molecolari SSR anchored per vedere quanto è piccolo il pezzetto di cromosoma introdotto

$(ATT)_n$

$(CT)_n$

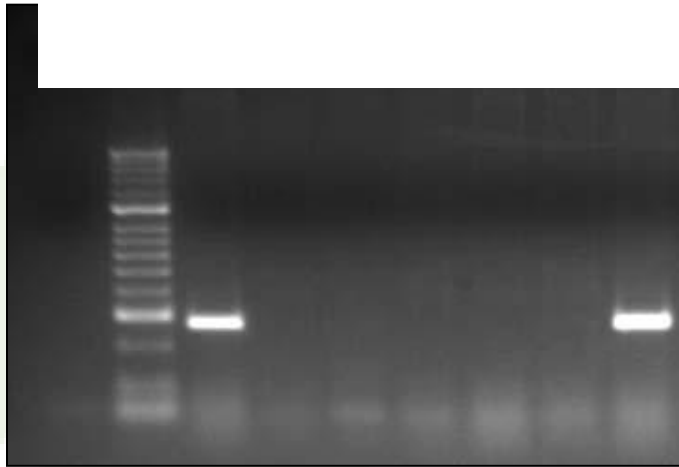
$(TCA)_n$



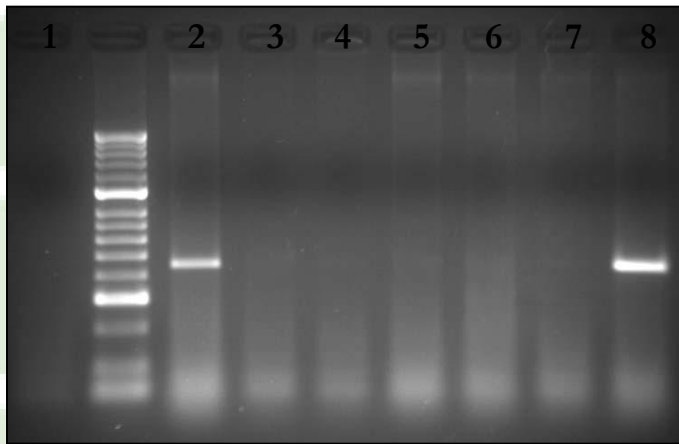
Primers specifici per la caratterizzazione molecolare dei cromosomi 5A, 5B e 5D



PCR con primers per il microsatellite xbarc130 e per la Pin-A.



→ Xbarc
130



→ Pin-A

Lane 1: no DNA

Lane 2: Langdon 5D(5B)

Lane 3: Colosseo

Lane 4: Cappelli mutante

Lane 5: 543

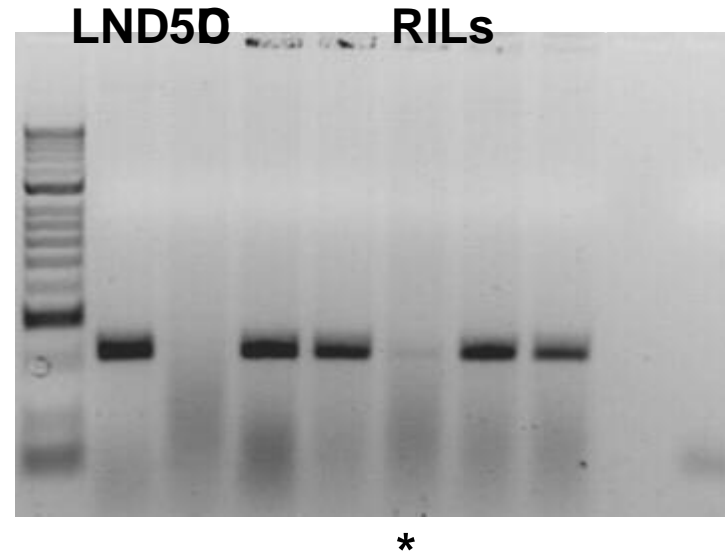
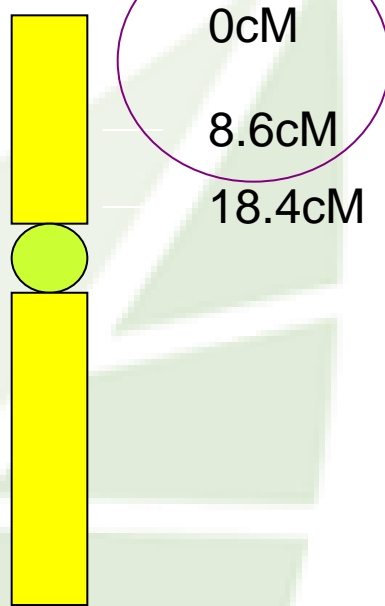
Lane 6: 546

Lane 7: 504

Lane 8: 482

Il marcatore x-barc 130 è strettamente correlato al locus *Ha*

PCR con marcatore molecolare x-gmw190 sul 5DS a 8.6cM, su Rils F6



•4 linee di grano duro ricombinanti F6 che possiedono il locus *ha* (0 cM), hanno anche il marcatore a 8.6 cM del braccio corto del cromosoma 5DS ma non quello a 18.4 cM (xbarc205).

SELEZIONE (Breeding) assistito da marcatori, MAS o MAB) della linea ideale

* La linea ricombinante 504-1 non ha il marcatore a 8.6 cM ma solo quello associato con il locus *ha* (0 cM). **Quindi sembra essere quella che ha introgresso la porzione più corta del cromosoma 5DS di grano tenero.**

GENETICA APPLICATA:

**Queste linee possono essere commercializzate
perché provengono dal cosiddetto breeding
classico**

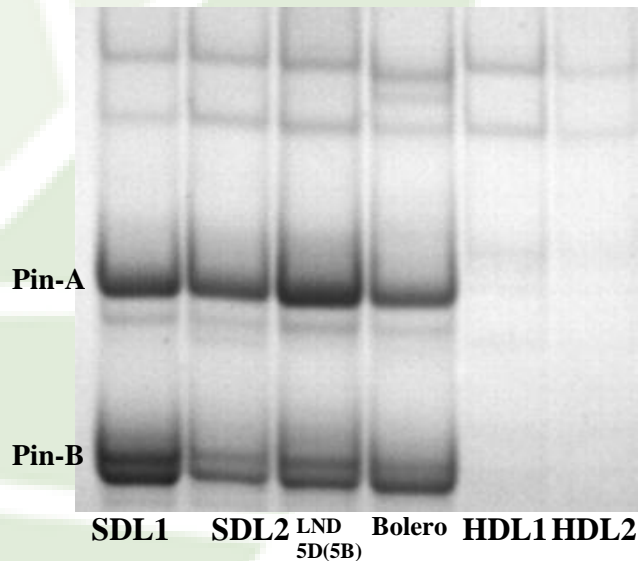


DEVONO ESSERE QUINDI GRANI di QUALITA'

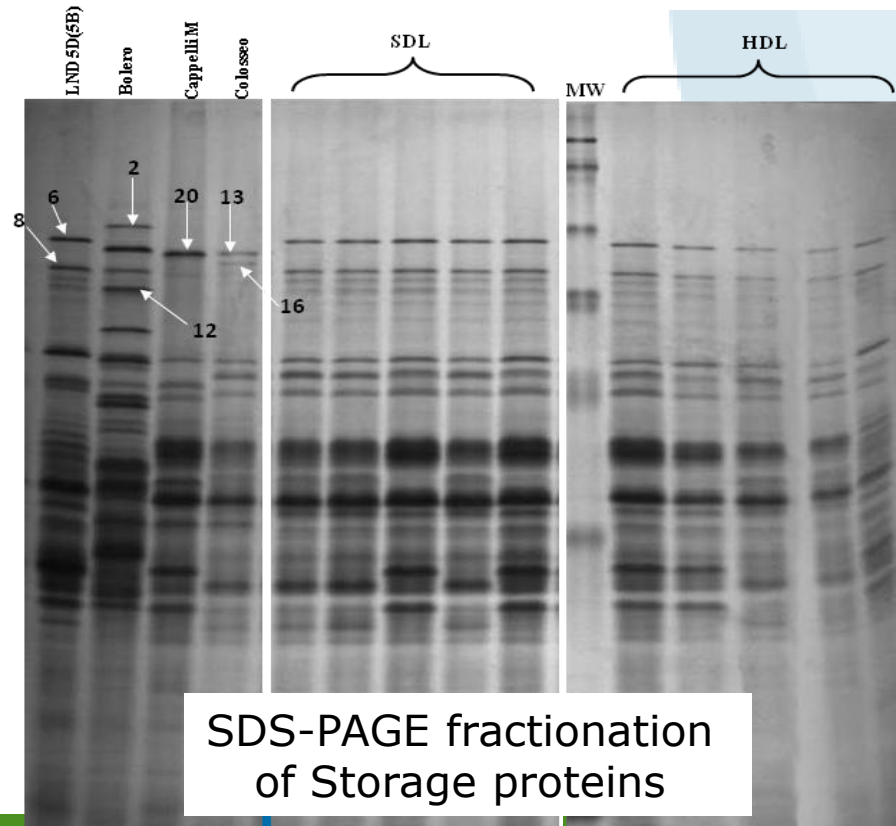
Co e l SDL1, SDL2, SDL3; HDL1, HDL2 and HDL3 characterized for:

1. Storage and puroindoline proteins composition
2. Genetic characteristics
3. Milling properties
4. Rheological characteristics
5. Pastamaking and breadmaking quality

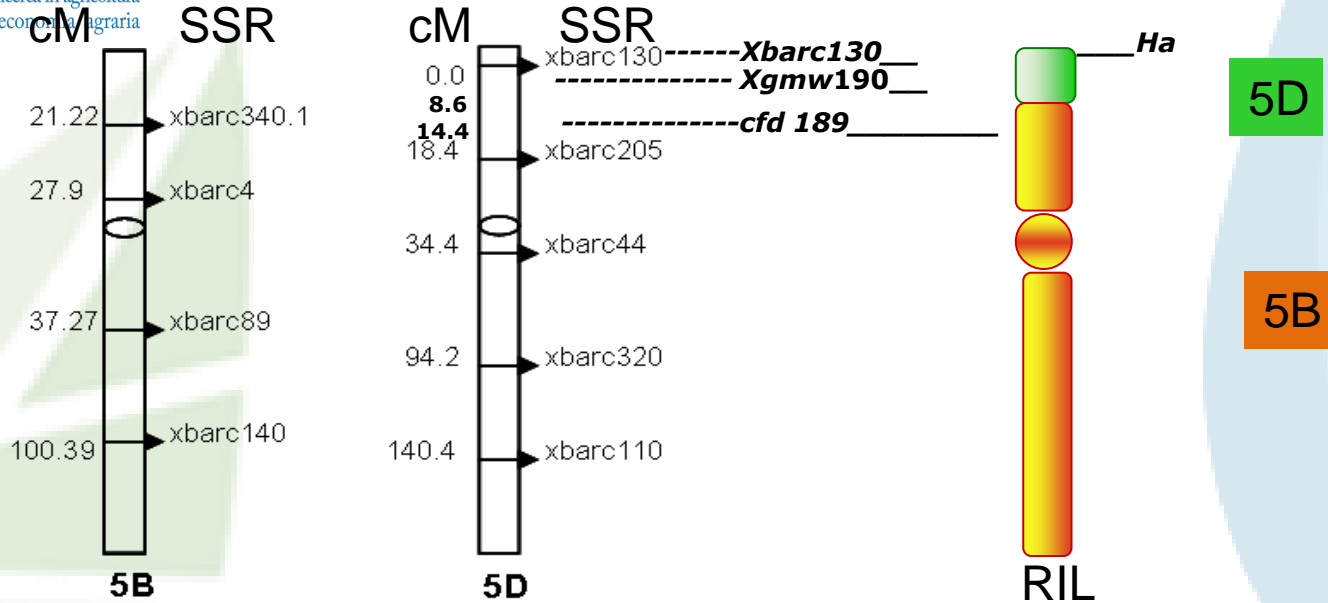
1.



A-PAGE fractionation of Puroindolines



SDS-PAGE fractionation of Storage proteins



All the soft-textured durum wheat lines (SDL) resulted to possess ONLY microsatellites *Xbarc 130* and *Xbarc 190*

SDL contain a small 5DS fragment, less than 14.4 cM in size, likely translocated to homeologous chromosome 5BS

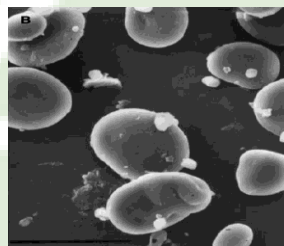
Hard textured durum wheat lines (HDL) failed to give amplification fragment with each SSR characterizing chromosome 5D

Measurements	1st year		2nd year		t-test	
	<u>SDL</u>	<u>HDL</u>	<u>SDL</u>	<u>HDL</u>	Value	df
Yield (t/ha)	5.7±0.6	5.8±0.5	4.6±0.8	4.4±0.7	0.3 ns	34
Plant height (cm)	120±2.0	122±1.6	12±2.1	124±1.8	0.3 ns	34
Heading time (days)	28±3.6	29±3.1	27± 3.1	30±3.4	1.6 ns	34
Hectolitre wt (Kg)	80.0±0.1	80.1±0.2	73.9±0.3	74.8±0.2	0.5 ns	34
1000-kernel wt (g)	44.8±1.8	44.1±1.5	40.5±0.9	41.7±2.4	0.2 ns	10
SKCS index	19.9±6.0	76.8±1.2	23.6±3.2	72.6± 2.3	23.4**	10
Seed protein (%)	15.6 ±0.1	15.4±0.2	16.2±0.1	15.9±0.5	1.2 ns	10
<i>Milling (common wheat)</i>						
Flour yield (%)	68.1±1.4	54.4±0.6	68.0±0.3	55.2±0.1	30.5**	10

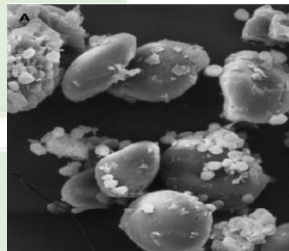
Soft Durum wheat Lines showed SKCS values (19.9-23.6) significantly lower than those (72.6-76.8) of their hard textured counterparts lacking Puroindolines proteins.

SDLs exhibited higher flour extraction rates compared with HDLs

Measurements	1st year		2nd year		t-test	
	SDL	HDL	SDL	HDL	Value	df
<i>Alveograph</i>						
W (J x 10 ⁻⁴) (strenght)	221±19.1	291±12.4	172±33.2	261±30.0	4.3**	10
P (mm) (elasticity)	64±0.6	97±13.3	83 ±1.1	121±10.3	4.3**	10
L (mm) (extensibility)	104±9.3	90±12.7	66±2.1	61±4.6	0.8 ns	10
P/L	0.6±0.1	1.1±0.3	1.2±0.1	2.0±0.3	2.3*	10
<i>Farinograph</i>						
Water absorption (%)	53.6±0.1	66.7±0.2	58.0±0.6	70.5±0.4	10.6**	10



soft



hard

The hard kernel texture of HDLs had significant impact on farinograph water absorption (23% higher than that of SDLs granulars). This is likely due to the high starch damage of the milling products from HDL compared with soft kernels.

Alveograph P and W values were significantly higher in HDLs compared with SDSLs . SDL doughs are less tenacious.

Variation in water absorption and rheological properties associated with the contrasting kernel textures of the durum wheat lines did not significantly affect firmness, stickiness and bulkiness of spaghetti.

The global quality scores of pasta for SDLs and HDLs were comparable with those of good quality Italian durum wheat cultivars.

Flour and semolina, but not spaghetti, from SDLs showed a substantial reduction in yellowness and brownness

Line	W (J x 10 ⁻⁴)	P (mm)	L (mm)	P/L	Volume (ml)	Weight (g)
SDL ^a	262	109	64	1.7	589	146
HDL ^b	258	215	27	8.0	533	153
<i>t</i> -value ^c	0.3ns	130**	31**	30**	6.8*	4.2ns



Loaf volume exhibited a 10% increase associate with kernel softening



Breeding for commercial **SoftDurumLines** :cross with cv Simeto

Experimental fields CREA
Montelibretti Rome



Plant height both in SDLs and in HDLs was high (>120cm) and resulted in partial lodging at harvesting.

SDL1 was crossed with durum wheat cv Simeto

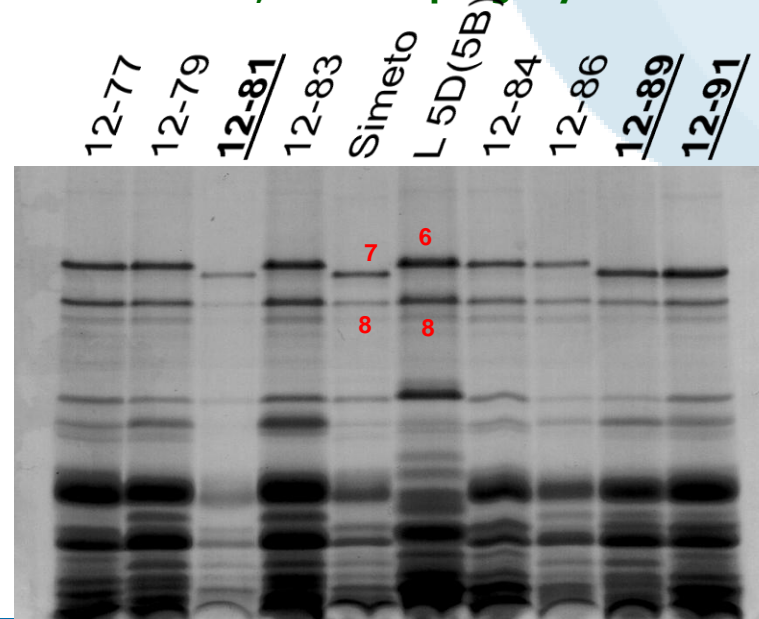
F₂ Segregation of allele *Pina-D1a* by PCR
(105 positive plants vs 27 negative)

F₃ Segregation of kernel texture by SKCS

(32 soft progeny with SKCS < 30; 73 medium hard progeny with SKCS = 49 to 72; 27 hard progeny with SKCS > 82)

F₆

Line	Plant height (cm)	SKCS index	Seed weight (mg)
12.77	96.1±11.2	14.5±13.4	61.7±8.4
12.79	78.7±7.6	0.1±15.5	57.8±8.9
12.81	86.0±6.3	10.7±15.2	51.2±12.2
12.83	78.9±5.1	-2.1±14.4	58.8±11.2
12.84	102.7±6.1	6.6±12.3	56.0±9.1
12.86	73.9±5.3	-10.1±12.9	62.1±9.45
12.89	95.5±7.7	3.3±13.0	47.9±12.2
12.91	68.5±4.5	6.5±14.5	55.4±12.3





Development of commercial variety of soft textured durum wheat (GDS)

Colosseo
 Simeto
 Seme 1
 Seme 2
 Seme 3
 Seme 4
 Seme 5
 Seme 6
 Mix
 Cres



DETTAGLIO DOMANDA ISCRIZIONE

Registro:	AGRARIE
Tipo Registro:	Convenzionale
Specie Botanica:	FRUMENTO DURO - Triticum durum Desf.
Denominazione Proposta:	Malakos (Definitiva) - Di fantasia
Riferimento del Costitutore:	GDS 260.68

Costitutore:	1263-ISEA S.R.L., 1427-CRA - CONSIGLIO PER LA RICERCA E LA SPERIMENTAZIONE IN AGRICOLTURA
--------------	---

Responsabile del Mantenimento in Purezza:	1263-ISEA S.R.L.
Azienda ove si effettua il Mantenimento in Purezza:	AZ39/1-CERMIS-CENTRO RICERCHE E SPERIMENTAZIONE PER IL MIGLIORAMENTO VEGETALE "N. STRAMPELLI"
Metodo di Selezione Conservatrice:	selezione genealogica su file spiga e successivamente su parcelle individuali da esse derivate per ottenere la produzione di seme di nucleo

CARATTERISTICHE VARIETA'

Origine:	a) Incrocio (indicare varietà parentali)	Linea di sostituzione LANGDON 5D(5B) x SCCF6F9
Modalità di propagazione:	Seme	



Development of commercial variety of soft textured durum wheat (GDS)



Linea 264.78

osseo
neto
ne 1
ne 2
ne 3
ne 4
ne 5
ne 6
so

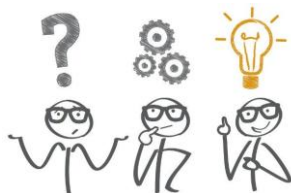
DETTAGLIO DOMANDA ISCRIZIONE

Registro:	AGRARIE
Tipo Registro:	Convenzionale
Specie Botanica:	FRUMENTO DURO - Triticum durum Desf.
Denominazione Proposta:	Suave (Definitiva) - Di fantasia
Riferimento del Costituente:	GDS 264.78
Costituente:	1263-ISEA S.R.L., 1427-CRA - CONSIGLIO PER LA RICERCA E LA SPERIMENTAZIONE IN AGRICOLTURA
Responsabile del Mantenimento in Purezza:	1263-ISEA S.R.L.
Azienda ove si effettua il Mantenimento in Purezza:	AZ39/1-CERMIS-CENTRO RICERCHE E SPERIMENTAZIONE PER IL MIGLIORAMENTO VEGETALE "N. STRAMPELLI"
Metodo di Selezione Conservatrice:	selezione genealogica su file spiga e successivamente su parcelle individuali da esse derivate per ottenere la produzione di seme di nucleo

- **Soft-textured durum wheat lines showed SKCS values significantly lower than those of their hard-textured counterparts.**
- **SDLs exhibited higher flour extraction rates compared with HDLs**
- **Spaghetti cooking quality was unaffected by kernel hardness**
- **Loaf volume exhibited a 10% increase associated with kernel softening**



• Breeding dual purpose durum wheat varieties



- ❑ How have we to consider the GDS? Durotest® S A simple membrane test for the rapid detection of non-durum wheat adulteration of durum wheat (semolina). The kit uses a monoclonal antibody which is specific for the puroindoline A. (Introduce SDS-PAGE of storage proteins to identify tetraploid wheats?)



- ❑ Durum wheat bread produced with re-milled semolina has a typical yellow colour. GDS produce a finer particle size flour, which presents the usual white colour of common wheat. This aspect could not be well accepted by the consumers. (Crosses with "super yellow" durum wheat lines?)



Outstanding issues

Breeding for yellow index (2017-2018)

Line code	N° Pots	N° Plant	Yellow index	YIELD (t/Ha)	Protein Content (%)	TWK (g)
ISEA-10	5	10	30	5,85	14,84	43,82
ISEA-494	5	10	29,51	5,99	15,59	54,21
SUAVE (GDS)	15	30	16	5,93	14,91	55,89



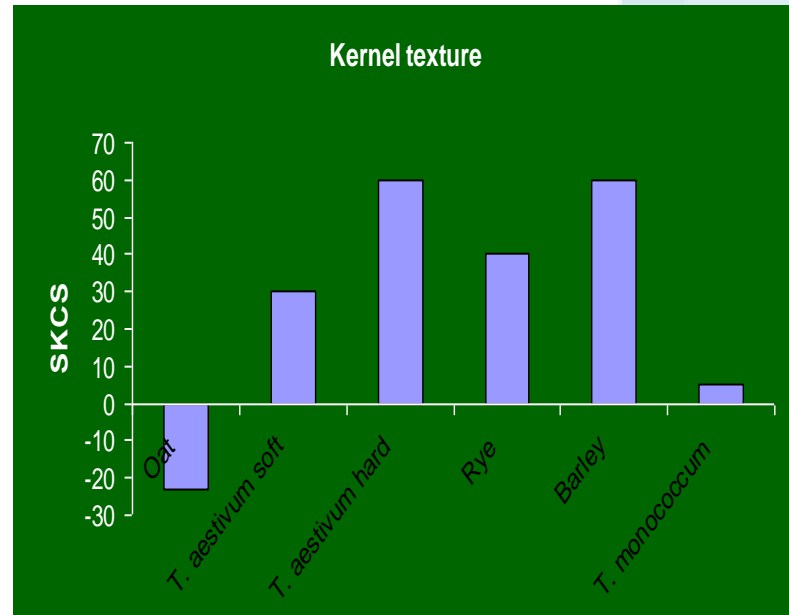


Le puroindoline negli altri cereali

<i>T.monococcum</i>	AA	+	<i>T.dicoccoides</i>	AABB	-
<i>T.urartu</i>	AA	+	<i>T.dicoccum</i>	AABB	-
<i>T.boeoticum</i>	AA	+	<i>T.durum</i>	AABB	-
<i>T.speltoides</i>	SS	+	<i>T.timopheevii</i>	AAGG	-
<i>T.tauschii</i>	DD	+	<i>Ae.ventricosa</i>	DDNN	+*
<i>T.comosum</i>	MM	+	<i>Zea mays</i>		-
<i>T.dichasians</i>	CC	+	<i>Sorghum vulgare</i>		-
<i>T.umbellatum</i>	UU	+	<i>Oryza sativa</i>		-
<i>Secale cereale</i>	RR	+			
<i>H.vulgare</i>	HH	+			
<i>Avena sativa</i>	AACCDD	+			

Geni omologhi a quelli delle puroindoline di frumento tenero, sono presenti nelle specie di cereali diploidi ed esaploidi, ma non in quelle tetraploidi.

SKCS (Single Kernel Characterization System)



Oats cultivars are characterized by an extremely soft texture, showing mean SKCS values inferior to -20;

Negative SKCS values are very rare amongst other cultivated cereals;

The extreme softness of oat endosperm is a negative agronomic (reduced kernel vitality) and technological (reduced flakes yield) aspect, chiefly in nude varieties.

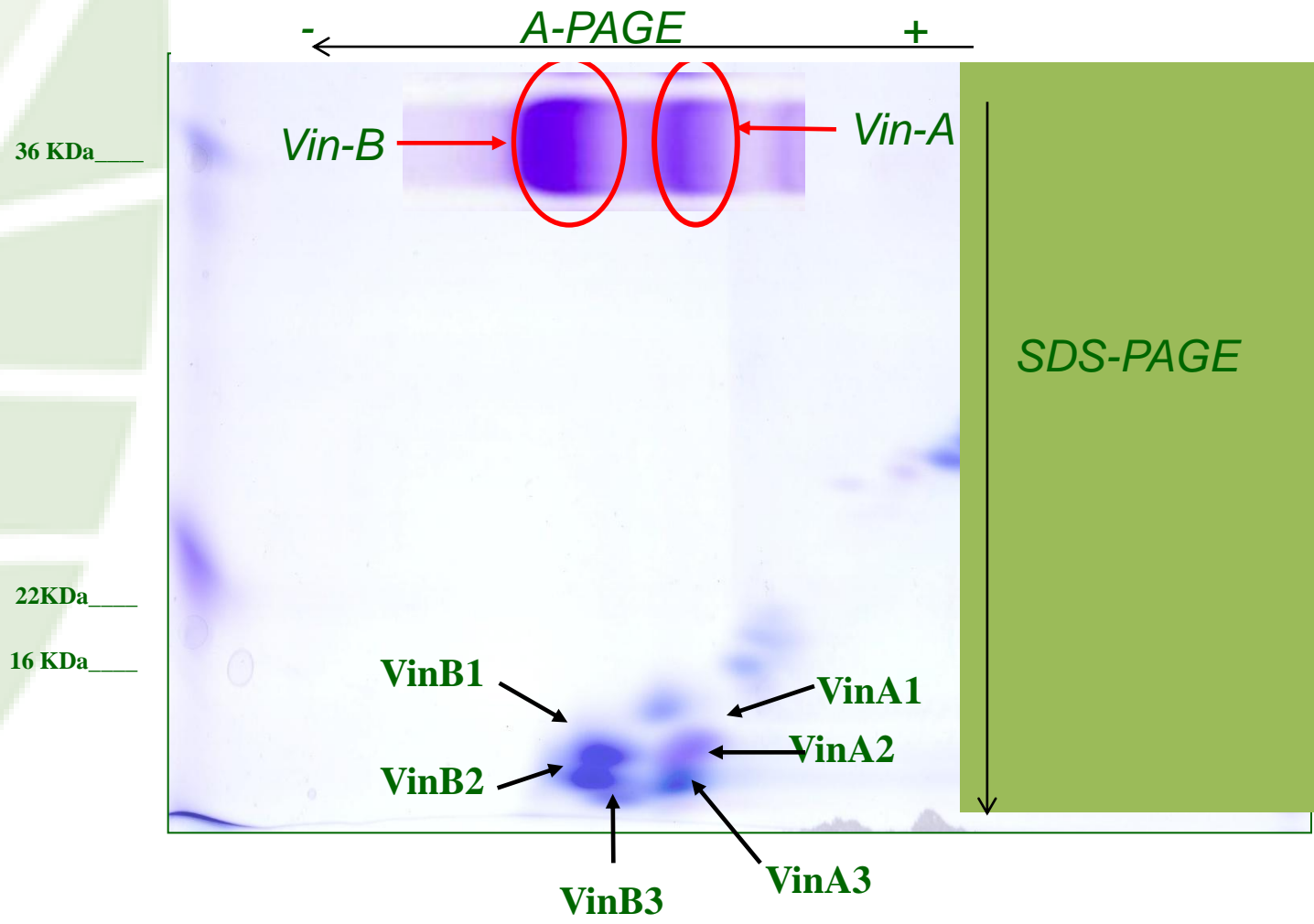
Aim of the PhD project

Find the biochemical and molecular basis of the extreme softness of oat kernel

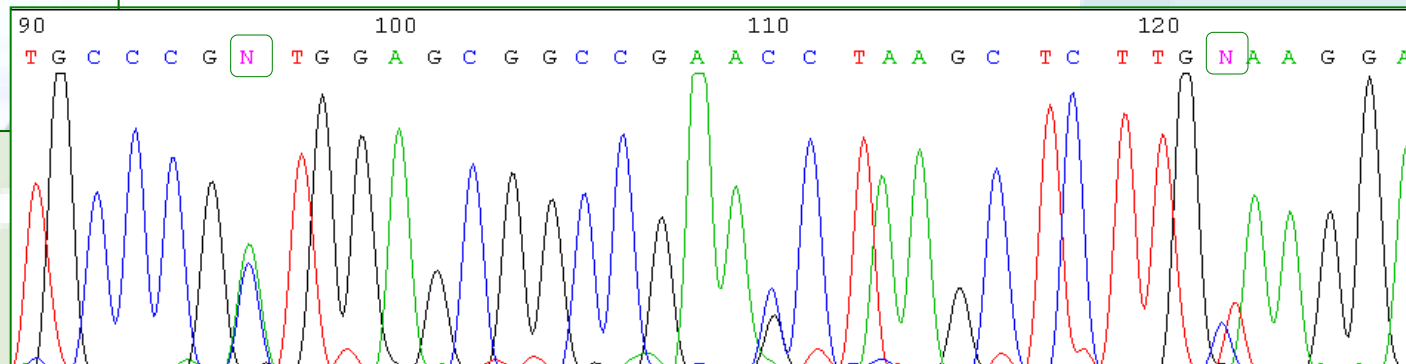


Modulate the trait for industrial and agronomic purposes

2D fractionation of vromindolines

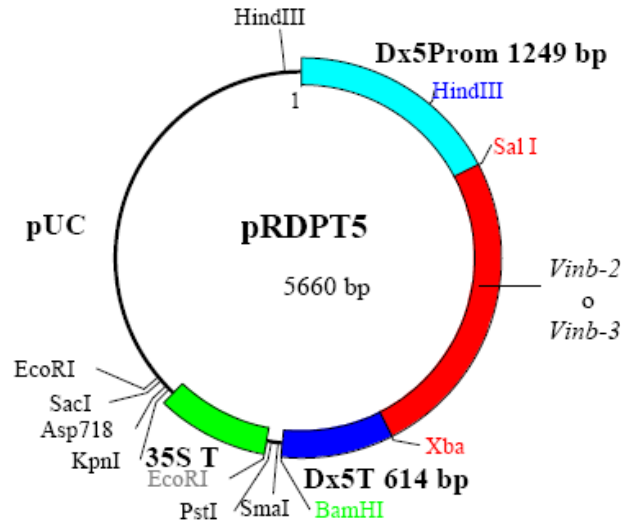


Vromindoline genes



Proteins	Vin-B1	Vin-B2	Vin-B3
Genes	<i>Vinb-X1a</i> <i>Vinb-Y1a</i>	<i>Vinb-X2a</i> <i>Vinb-Y2a</i> <i>Vinb-Z2a</i>	<i>Vinb-X3a</i> <i>Vinb-Y3a</i>

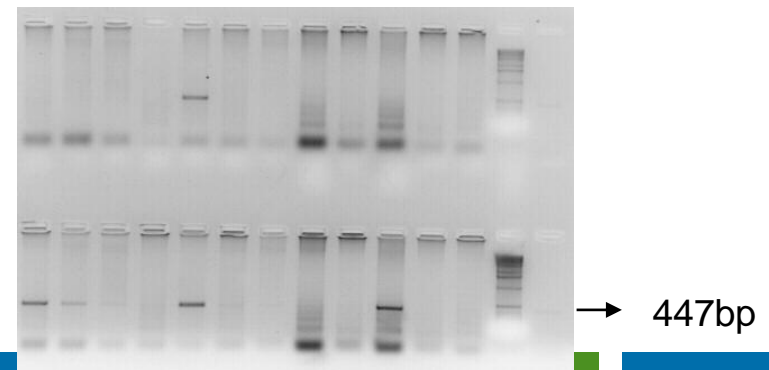
**Durum wheat plants transformed with *Vinb-2*
 and *Vinb-3* oat genes**



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

T₀ generation

- 108 transformed selected plants
- 45 only *vinb-3* gene
- 24 both *vinb-2* and *vinb-3* genes
- 2 only *vinb-2* gene



Durum wheat plants transformed with *Vinb-2* and *Vinb-3* oat genes



T₁ generation

PCR analysis, immunoreactions and SKCS test

Plants	No. seeds	Seed weight mg	T1 generation		Immunoreactions				Mean	SKCS	
			<i>Vinb-2</i>	<i>Vinb-3</i>	Starch-Bond		Total			SD	min-max
					<i>Vinb-2</i>	<i>Vinb-3</i>	<i>Vinb-2</i>	<i>Vinb-3</i>			
G0	134	35.0	-	-	-	-	ND	ND	100,4	9,2	98-111
G1	43	37.2	+	+	+	-	+	-	85,8	17,6	55-114
G2	39	28.2	+	+	+	-	+	-	82,2	9,7	69-101
G3	29	41.4	-	+	-	-	-	-	99,1	5,0	89-104
G4	64	37.5	+	+	+	+	ND	ND	80,8	27,7	20-111

PCR

WB

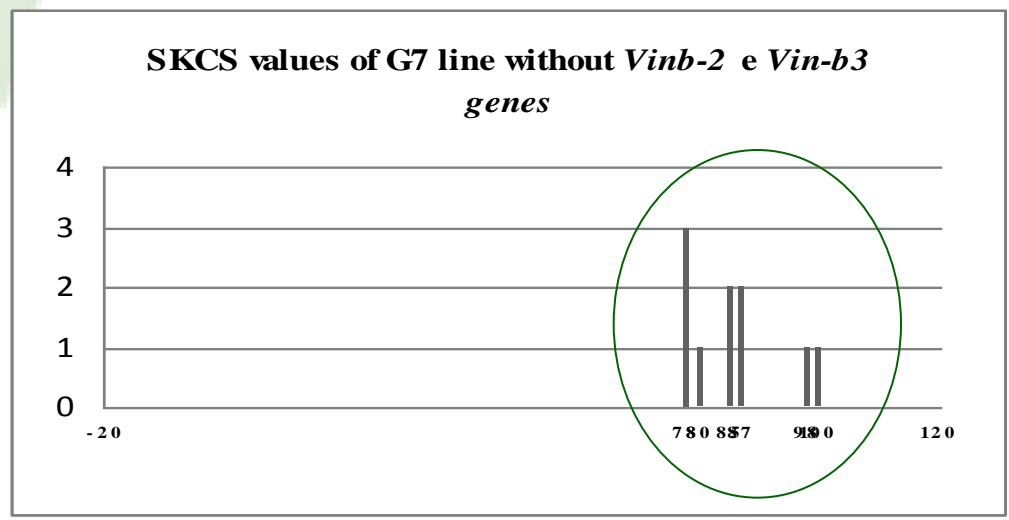
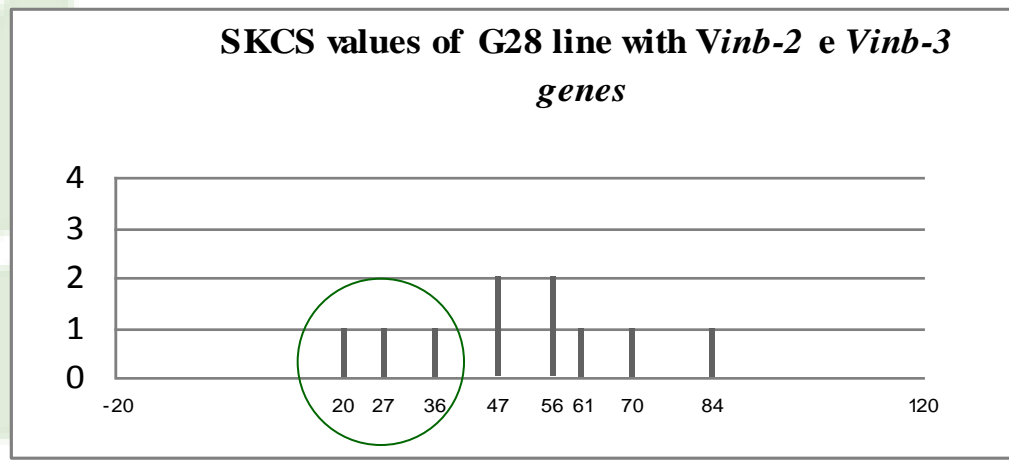
SKCS

Sample	nseed	weight	<i>Vinb-2</i>	<i>Vinb-3</i>	<i>Vinb-2</i>	<i>Vinb-3</i>	Mean	SD	Range
G5	121	41.3	+	+	+	+	83,8	26,0	9-108

G6	55	29.0	+	+	+	-	+	-	97,9	13,5	68-110
G9	46	39.1	-	-	-	-	ND	ND	97,2	9,1	90-110
G10	42	19.0	+	+	+	-	+	-	103,3	10,7	86-107
G11	46	41.3	+	-	+	-	ND	ND	84,9	9,0	73-102
G12	8	20.0	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G13	19	10.0	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

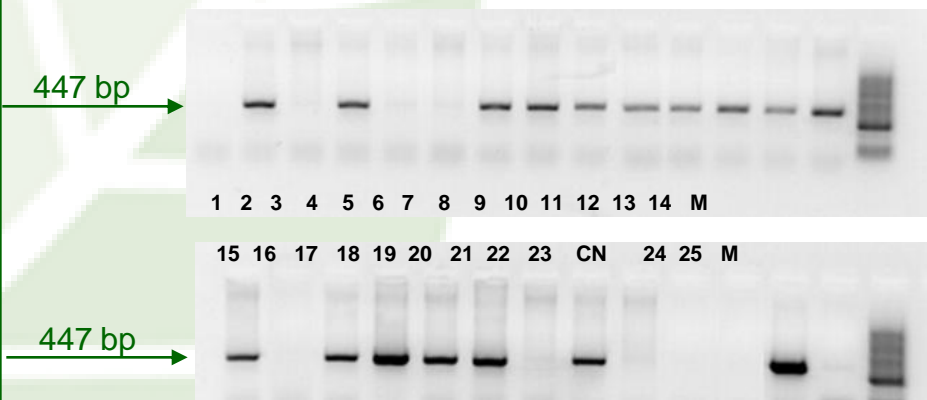
SD = Standard Deviation; ND = Not Determined.

SKCS analysis on 10 single seeds T₁ transformed plants



Vin-b2 and *Vin-b3* genes segregation in T1 transformed plants

PCR amplification of 25 T₁ kernels (G5 line) with *Vin-b3* specific primers



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

***Vin-b2* and *Vin-b3* genes cosegregate in 3:1 ratio**



Mol Genet Genomics (2015) 290:39–54
DOI 10.1007/s00438-014-0894-5

ORIGINAL PAPER

Biochemical and molecular characterization of *Avena* indolines and their role in kernel texture

Laura Gazza · Federica Taddei · Salvatore Conti · Gloria Gazzelloni · Vera Muccilli · Michela Janni · Renato D'Ovidio · Michela Alfieri · Rita Redaelli · Norberto E. Pogna

Received: 6 March 2014 / Accepted: 31 July 2014 / Published online: 15 August 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

- ❖ Durum wheat T1 plants with both vromidoline *Vinb-2* and *Vinb-3* oat genes showed soft kernel with very low SKCS values. **This suggest a role for vromindolines in determining kernel texture**



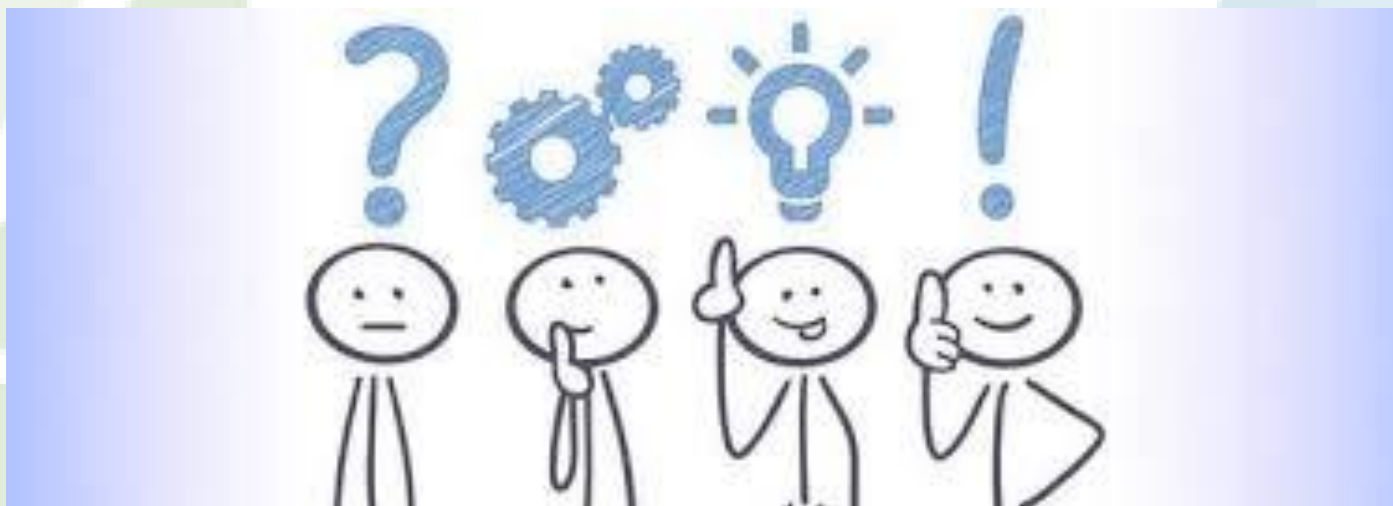
Differenze/Analogie	Miglioramento Genetico	Mutagenesi fisico/chimica	Genome Editing
Tempistica	Lunga/molto lunga	Breve	Breve
Precisione	Parzialmente definita	Casuale	Predefinita
Costi	Elevati (tempi e spazi)	Limitati	Decisamente limitati
Conoscenza pregressa	Esperienza pratica e/o assistita da marcatori	Creazione variabilità ex-novo	Indispensabile
Caratteristiche varietali	Completamente rimescolate (elevata biodiversità)	Prevalentemente conservate, novità casuale	Completamente conservate con una caratteristica in + o -
Valore aggiunto	Esplorazione del potenziale genetico	Creazione nuove caratteristiche e maggiore biodiversità	Esaltazione della tipicità e ottimizzazione
Resistenze genetiche	Lungo decorso a discapito della qualità	Del tutto casuale ed improbabile che avvenga	Perfettamente finalizzato anche per resistenze multiple
Organismo Geneticamente Modificato	No	No	Non normato (possibilmente no per similarità con mutagenesi chimico/fisica: all. IB della 2001/18/EC)

Sentenza della Corte di Giustizia Europea del 25 Luglio 2018: **li equipara agli OGM**



- ❖ Migliorare per un Carattere importante dal punto di vista economico, tecnologico, nutrizionale, etc.
- ❖ Migliorare per un carattere ad elevata ereditabilità, cioè scarsamente influenzato dall'ambiente; quindi determinato da un major gene o da pochi geni
- ❖ Esplorare la variabilità naturale; altrimenti pensare a programmi di mutagenesi
- ❖ Il carattere deve essere facile ed economico da fenotipizzare

DOMANDE?????



laura.gazza@crea.gov.it