

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA



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

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE VEGETALI XXV

**RUOLO DELLA CONCIMAZIONE AZOTATA SULL'ACCUMULO
DELLE PROTEINE DELLA CARIOSSIDE IN RELAZIONE AD
ASPETTI TECNOLOGICI E ALLA PRESENZA DI ALLERGENI IN
FRUMENTI DURI DI NUOVA E ANTICA COSTITUZIONE**

AGR/07

RELATORE:

Prof.ssa Stefania Masci

DOTTORANDO:

Dr. Lina Maria Rivera Ortiz

COORDINATORE:

Prof.ssa Stefania Masci

INDICE

INTRODUZIONE	5
1. IL FRUMENTO COME COLTURA MONDIALE	5
1.1 EVOLUZIONE E DOMESTICAZIONE DEL FRUMENTO	6
1.1.1 Frumenti diploidi	8
1.1.2 Frumenti Poliploidi	8
1.2 IL FRUMENTO IN ITALIA	11
1.2.1 Strampelli e le varietà elette	12
1.2.2 Costituzione delle varietà di frumento di nuova costituzione.....	13
1.3 RIVOLUZIONE VERDE	14
1.4 CENNI SULLA STRUTTURA E COMPOSIZIONE DELLA CARIOSSIDE.....	15
1.4.1 Aspetti qualitativi del frumento	16
1.4.1.1 La durezza della cariosside	16
1.4.1.2 Forza dell'impasto e del glutine	18
1.4.1.2.1 Le glutenine.....	20
1.4.1.2.2 Le Gliadine.....	22
1.4.1.3 Contenuto Proteico	24
1.4.2 Aspetti nutrizionali	24
1.4.2.1 Le proteine	25
1.4.2.1.1 Proteine solubili	25
1.4.2.2 I lipidi	28
1.4.2.3 Vitamine, minerali e composti chimici	29
1.4.2.4 L'amido.....	30
1.5 RUOLO DELLA CONCIMAZIONE AZOTATA.....	30
1.6 LE ALLERGIE AL FRUMENTO: SINTOMI E DIAGNOSI.....	31
1.6.1 Manifestazioni cliniche	33
1.6.1.1 Sintomi Gastrointestinali.....	33
1.6.1.2 Disturbi della pelle.....	34
1.6.1.3 OAS (Sindrome allergica orale).....	34
1.6.1.4 Disturbi respiratori	35
1.6.1.5 Anafilassi	35
1.7 ALLERGIA AL FRUMENTO	36
1.7.1 Reazioni d'ipersensibili al frumento	36
1.7.1.1 L'asma del panificatore	36
1.7.1.2 Allergie alimentari al frumento	37
1.7.1.3 La Celiachia	38
1.8 ALLERGENI DEL FRUMENTO.....	38
1.8.1 Le proteine di riserva	39
1.8.1 Le proteine solubili	39
1.8.2.1 Alcuni allergeni del frumento delle proteine solubili	40
1.9 L'ANALISI PROTEOMICA	42
1.9.1 Proteomica funzionale.....	42
1.9.2 Proteomica differenziale	43
2. SCOPO DEL LAVORO	46
3. MATERIALI E METODI	47

3.1	MATERIALE VEGETALE	47
3.2	SIERI UMANI.....	47
3.3	CONCIMAZIONE AZOTATA	48
3.4	DISEGNO SPERIMENTALE IN CAMPO	48
3.5	ANALISI DEL CONTENUTO PROTEICO.....	50
3.5.1	Metodo CHN	50
3.5.2	Metodo NIR (Spettroscopia nel vicino infrarosso).....	51
3.5.3	Analisi statistiche del contenuto proteico	51
3.6	ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DELLA CARIOSSIDE DI FRUMENTO	52
3.6.1	Estrazione delle subunità' gluteniniche	52
3.6.2	Estrazione delle proteine metaboliche.....	52
3.6.3	Estrazione delle proteine cm- <i>like</i>	53
3.7	ANALISI DELLE PROTEINE	53
3.7.1	Saggio 2D Quanti Kit	53
3.7.2	Saggio DC- <i>protein</i>	54
3.8	TEST DI SEDIMENTAZIONE	54
3.8.1	Analisi statistica per il test di sedimentazione.....	55
3.9	ELETTROFORESI.....	55
3.9.1	SDS-PAGE per le subunità gluteniniche	55
3.9.1.1	Analisi densitometrica	56
3.9.1.2	Analisi Statistiche nelle subunità gluteniniche	56
3.10	ANALISI BIDIMENSIONALE (2DE).....	56
3.10.1	Proteine metaboliche	57
3.10.2	Proteine CM- <i>like</i>	59
3.10.3	Spettrometria di massa e identificazione delle proteine	60
3.11	TEST ELISA	61
3.11.1	Analisi Statistiche dei Test ELISA	62
4	RISULTATI E DISCUSSIONI	63
4.1	ANALISI DEL CONTENUTO PROTEICO MEDIANTE CHN	63
4.2	ANALISI DEL CONTENUTO PROTEICO MEDIANTE NIR.....	66
4.3	TEST DI SEDIMENTAZIONE CON SDS (SDS-ST).....	70
4.4	ANALISI ELETTROFORETICA DELLE SUB UNITÀ GLUTENINICHE	72
4.5	TEST ELISA	82
4.6	Analisi proteomica comparativa delle proteine solubili	86
4.6.1	Frazione metabolica	86
4.6.2	Frazione CM- <i>like</i>	95
5	CONCLUSIONI	102
6	RINGRAZIAMENTI.....	105
7	BIBLIOGRAFIA	106

INTRODUZIONE

1. IL FRUMENTO COME COLTURA MONDIALE

Il frumento fa parte delle tre più importanti colture di cereali a livello mondiale, ed è coltivato in un'ampia area e in una vasta gamma di condizioni climatiche.

Più di 600 milioni di tonnellate sono prodotte annualmente su 300 milioni di ettari (Mha) (<http://faostat.fao.org/>) (figura 1). Infatti, esso fornisce circa un quinto delle calorie e delle proteine nella nutrizione umana. Ciò fondamentalmente per la sua alta versatilità, tanto che questo cereale fa ormai parte integrante della cultura e anche delle religioni di diverse società.

Inoltre il ruolo fondamentale di questo cereale può essere attribuito non solo alla adattabilità a diverse condizioni climatiche e/o a diversi suoli, ma anche al suo facile trasporto e immagazzinamento per lunghi periodi di tempo, e per la facilità di consumo da parte degli esseri umani con un minimo trattamento: i semi possono essere ridotti in farina (fumento tenero) o semola (fumento duro), che costituiscono gli ingredienti base per la preparazione di pane lievitato e pane non lievitato (azzimo), torte, biscotti, pasta, *noodles*, ecc.

Gli sfarinati a base di frumento derivano principalmente dall'endosperma che quindi contribuisce alla dieta umana come fonte di carboidrati, proteine, minerali essenziali, vitamine, sostanze fitochimiche benefiche e fibre alimentari. Se il frumento viene bilanciato con altri alimenti ricchi in lisina e metionina (che sono invece limitate nelle farine di frumento) esso è un alimento proporzionato al fabbisogno proteico.

La cariosside (anche impropriamente, ma comunemente, definita "seme") di frumento è composta principalmente da amido (circa 80%) e proteine, che sono i maggiori responsabili della qualità dei prodotti che derivano da essa.

Il contenuto proteico della cariosside di frumento può variare dal 10 al 20% del peso secco e la maggior parte delle proteine viene accumulata nell'endosperma come proteine di riserva, le quali rappresentano una fonte di carbonio e azoto per l'embrione durante il processo di germinazione (Shewry *et al.*, 1995). Inoltre le proteine della cariosside determinano le proprietà visco-elastiche degli impasti, in particolare, le proteine di riserva che costituiscono il glutine (Schofield 1994).

Le proteine di riserva del frumento sono state ampiamente caratterizzate con lo scopo di capire il loro contributo alle proprietà fisico-chimiche delle farine e degli impasti, e quindi migliorare la qualità dei prodotti a base di frumento, sebbene molti aspetti rimangano ancora poco chiari, a causa della particolare struttura e organizzazione delle proteine del glutine nell'endosperma.

D'altra parte le proteine del glutine sono anche responsabili della *malattia celiaca*, una delle intolleranze alimentari più comuni e pericolose, nonché di altre patologie piuttosto comuni, quali la "sensibilità al glutine", mentre le altre proteine del grano (albumine e globuline) possono provocare allergie di tipo alimentare e respiratorio in soggetti sensibili.

World wheat market						
	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12 estimate	2012/13 forecast	
					Previous (07 Mar 2013)	Current (11 Apr 2013)
	(. million tonnes)					
Production¹	683.9	685.7	655.4	700.6	661.8	661.0
Supply²	813.9	843.8	841.9	880.7	839.7	839.9
Utilization	646.4	656.2	660.2	695.8	683.3	684.3
Trade³	140.6	130.7	125.8	147.3	139.5	140.0
Ending Stocks⁴	158.1	186.4	180.1	178.9	162.5	162.0
	(. percent)					
World stock-to-use ratio	24.1	28.2	25.9	26.1	23.4	23.4
Major exporters' stock-to-disappearance ratio⁵	17.9	21.6	20.2	18.0	13.7	14.0

Fig. 1: Mercato mondiale del frumento (dati <http://www.fao.org/worldfoodsituation/wfs-home/csdb/en/>). La tabella riporta la produzione e l'utilizzo del frumento nel mondo in diversi anni (2008-2012).

1.1 EVOLUZIONE E DOMESTICAZIONE DEL FRUMENTO

Il primo frumento coltivato risale a 10,000 – 8,000 A.C. (Figura2). Il frumento appartiene al genere *Triticum*, tribù *Triticeae*, famiglia *Graminaceae*. Attualmente le specie di frumento coltivato più importanti sono il frumento tenero (*Triticum aestivum*) e il frumento duro (*T. turgidum* subsp. *durum*) che rappresentano il 95% e il 5 % rispettivamente nella coltivazione totale del frumento. Il frumento tenero viene utilizzato per la produzione di pane e prodotti da forno, è esaploide con genoma

AABBDD. Il frumento duro, è utilizzato prevalentemente per la produzione di pasta, è tetraploide e presenta il genoma AABB.

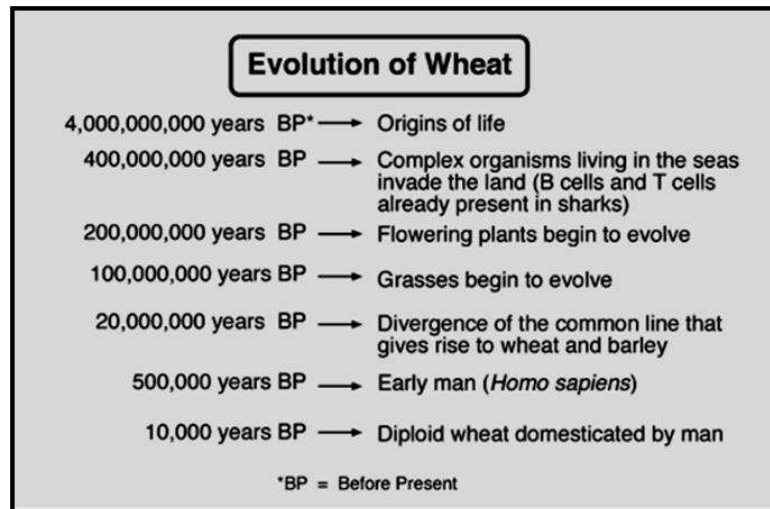


Fig2: Eventi relativi all'evoluzione del frumento

I cambiamenti genetici responsabili dei tratti che differenziano le piante domestiche dai progenitori selvatici sono noti come “sindrome da domesticazione”. In frumento l’evento più importante della sindrome è stato la perdita della caratteristica di “dispersione dei semi” dovuta alla fragilità del rachide; ciò impedisce al vento di disperdere le cariossidi facilitandone la raccolta. I geni responsabili per tale caratteristica (*Br-brittlerachis*) sono stati localizzati sul cromosoma 3 del frumento. Un altro tratto importante per la domesticazione del frumento è stato la perdita delle glume “aderenti 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” (Figura 3). 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 (Figura 4) riconosce l'esistenza di due specie diploidi, *T. monococcum* e *T. urartu*, due specie tetraploidi, *T. turgidum* e *T. timophevi* e due specie esaploidi, *T. aestivum* e *T. zhukovskyi*.

1.1.1 Frumenti diploidi

I frumenti diploidi hanno avuto probabilmente un'origine monofiletica. *T. monococcum*, con la sua sottospecie selvatica ssp. *beoticum* coltivata ssp. *monococcum* (einkorn), e *T. urartu* producono ibridi sterili e per questa ragione sono state identificate come due specie biologicamente distinte (Johnson and 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*. Inoltre attualmente la piccola quantità di *T. monococcum* che viene coltivato è utilizzata principalmente per l'alimentazione animale.

1.1.2 Frumenti Poliploidi

I frumenti poliploidi rappresentano un tipico esempio di evoluzione attraverso l'alloploidia. Si distinguono due gruppi di frumenti poliploidi designati come *turgidum-aestivum* e *timophevi*. Al primo gruppo appartengono i frumenti tetraploidi con genoma AABB (*T. turgidum*) e l'esaploide *T. aestivum* con genoma AABBDD. *T. turgidum* comprende la sottospecie selvatica ssp. *dicoccoides* e diverse forme coltivate, tra cui il frumento duro.

Al secondo gruppo appartengono il tetraploide *T. timophevi* con genoma AAGG e l'esaploide *T. zhukovskyi* con genoma $A^u A^u A^m A^m GG$. Il *T. timophevi* comprende la specie selvatica ssp. *araraticum* e il coltivato ssp. *timophevi*. L'alloploidia ha consentito la confluenza in un unico genotipo 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 and Dvorak, 2007).

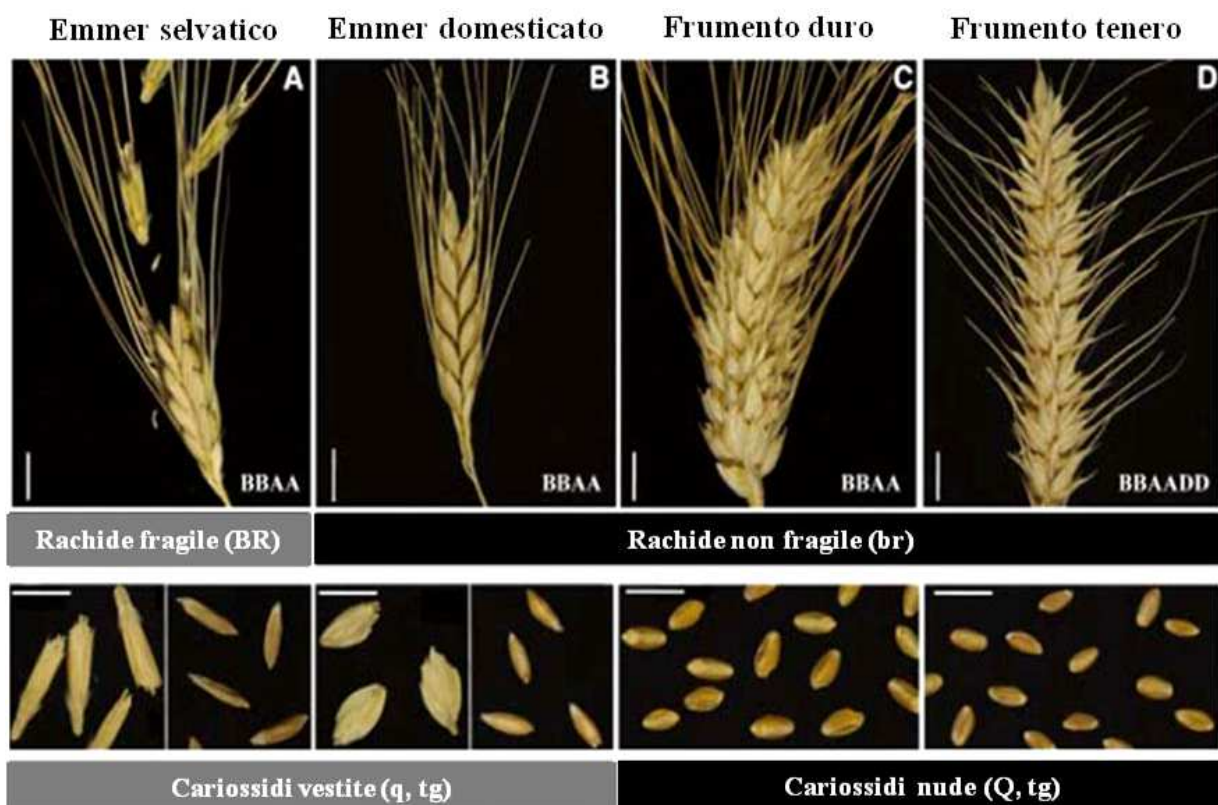


Fig. 3: Spighe di frumento caratterizzate da (A) rachide fragile, (da B a D) rachide non fragile, (A e B) cariossidi vestite e (C e D) cariossidi nude. (A) emmer selvatico (*T. turgidum*ssp. *dicoccoides*), (B) emmer domesticato (*T. turgidum*ssp. *dicoccon*), (C) frumento duro (*T. turgidum*ssp. *durum*), e (D) frumento tenero (*T. aestivum*). Simboli: Br, *brittle rachis*; Tg, *tenacious glumes*; e Q, *square head*. (modificata da Dubcovsky and Dvorak, 2007).

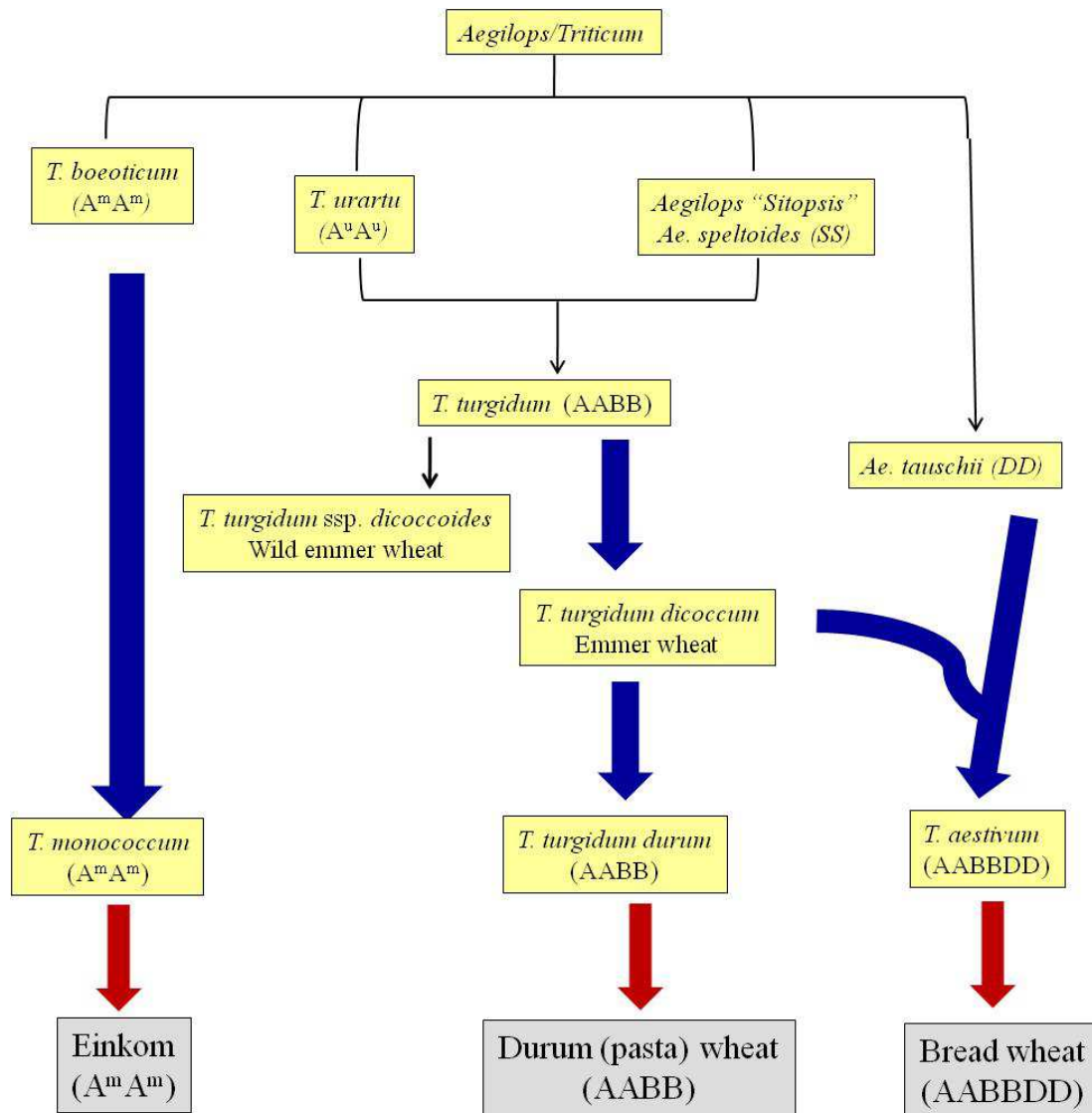


Fig4: Riassunto della filogenesi dei frumenti coltivati (da Feuillet *et al.*, 2007).

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 and 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 and Feldman, 1962).

Alcuni 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 con genoma AABBDD si sono originati circa 10.000 anni fa, con un evento di ibridazione spontanea tra la specie coltivata *T. dicoccum* (AABB) e la specie diploide selvatica *Ae. tauschii* (sinonimi *Ae. squarrosa*, *T. tauschii*) ssp. *strangulata* (McFadden and Sears, 1946; Kihara, 1944; Mille, 1987). La presenza, in frumento tenero, di più alleli per ciascun locus ha portato ad ipotizzare che il frumento tenero si sia originato da eventi indipendenti multipli di ibridazione tra il frumento tetraploide e diverse fonti di *Ae. tauschii* (Talbert and Blake, 2000).

Il frumento tenero è per la maggior parte coltivato ampiamente in tutto il mondo, mentre il grano duro si adatta di più al clima mediterraneo secco. Inoltre, quest'ultimo può anche essere usato per fare il pane ed è usato per fare prodotti alimentari regionali, come couscous in Nord Africa e bulgur in Medio Oriente.

Piccole quantità di altre specie di frumento (einkorn, emmer, spelt) sono ancora coltivate in alcune regioni tra cui l'Italia, la Spagna, la Turchia, i Balcani e il subcontinente indiano. In Italia, sono conosciuti come "farro", mentre *T. spelta* continua ad essere coltivata in Europa, in particolare nelle zone alpine.

1.2 IL FRUMENTO IN ITALIA

Le popolazioni di frumento coltivate prima che il miglioramento genetico divenisse scienza applicata, erano rappresentate dalle cosiddette varietà locali (*landraces*), popolazioni naturali introdotte in coltivazione e, in quanto tali, caratterizzate da un ottimo adattamento all'ambiente in cui venivano coltivate.

La sostituzione delle *landraces* con varietà basate sulla singola linea pura, l'unico tipo oggi utilizzato per il frumento, fu dovuta alle nuove esigenze di un ambiente agricolo e di un mercato in rapida evoluzione. La maggiore uniformità genetica (un unico genotipo altamente omozigote) delle varietà basate sulla singola linea pura rispetto alle vecchie *landraces*, comportava infatti una maggiore uniformità, vantaggiosa per la meccanizzazione sempre più spinta.

La maggiore uniformità contribuisce inoltre ad aumentare il valore del prodotto, sia da parte del consumatore che da parte dell'industria di trasformazione.

Oggi le varietà locali sono ancora utilizzate in agricolture di sussistenza che non prevedano grandi impieghi di mezzi tecnici e che abbiano come obiettivo quello di ottenere produzioni piuttosto stabili, anche se non particolarmente elevate.

In Italia la nascita del fenomeno varietale si colloca negli anni '20 per il frumento (Lorenzetti, 2000). All'inizio del XX secolo erano presenti in Italia un gran numero di popolazioni locali di frumenti tetraploidi, prevalentemente coltivate nel Centro, nel Sud e nelle Isole, e destinate soprattutto alla produzione di pani tipici locali o di minestre. Il *Triticum turgidum* subsp. *durum*, usato anche per la produzione di paste tipiche, era diffuso nelle aree aride e semiaride, mentre in aree ristrette, collinose o montagnose, venivano coltivati anche il *T. turgidum* subsp. *turgidum* ed il *T. turgidum* subsp. *dicoccum* (farro, emmer), spesso insieme al diploide *T. monococcum* (einkorn) e all'esaploide *T. aestivum* subsp. *spelta*, per pane e minestre. Fu solo nella prima metà del XX secolo che l'utilizzazione di base delle due specie, duro e tenero, si differenziò più nettamente: duro per la pastificazione, tenero per la panificazione (Bozzini *et al.*, 1998).

1.2.1 Strampelli e le varietà elette

Nazareno Strampelli mise in atto un programma di grande valore, introducendo elementi innovativi per l'epoca, come l'ibridazione intra- ed interspecifica e la selezione fenotipica.

Per realizzare le nuove specie, Strampelli partì dallo sviluppo di grani a rapida maturazione ed alto rendimento, per evitare la siccità estiva, portando a maturazione prima d'agosto. Inoltre si impegnò anche nella creazione di specie resistenti a patogeni e a taglia bassa, in grado di resistere meglio alla siccità o all'allettamento.

Le cultivar prodotte da Strampelli furono largamente esportate a partire dal 1924 fino allo scoppio della Seconda guerra mondiale.

Inoltre, grazie ai grani di Strampelli, la "battaglia del grano" ottenne di ridurre il fabbisogno nazionale di oltre due milioni di tonnellate di grano all'anno, senza aumentare la superficie coltivata. Durante i primi anni della seconda guerra mondiale quasi il 90% della superficie frumentaria italiana era coltivata a sementi sviluppate da Strampelli.

Strampelli realizzò decine di varietà di frumento, che egli denominò "*Sementi Elette*" alcune delle quali ancora coltivate fino agli anni Ottanta del XX secolo e perfino

nel XXI secolo, che consentirono – in Italia e nei Paesi che le impiegarono – notevoli aumenti delle rese. Le varietà di frumento create da Strampelli ed esportate in Messico furono una delle basi degli studi di miglioramento genetico che condussero alla "Rivoluzione verde" degli anni sessanta.

Una o forse la più nota, tra le varietà elette fu “Senatore Cappelli” in onore del Senatore abruzzese Raffaele Cappelli, promotore nei primi del novecento della riforma agraria.

La cultivar Senatore Cappelli, rilasciata nel 1915 e ancora coltivata dopo quasi 100 anni, fu senz’altro la costituzione più importante di questo periodo, in cui arrivò a coprire fino al 60% della superficie italiana a frumento duro, per estendersi in seguito anche in altri paesi del Mediterraneo (Turchia e Spagna). L’origine di Cappelli viene fatta risalire alla popolazione nord-africana Jean Retifah che, secondo [De Cillis \(1927\)](#), non era in realtà diversa dalla varietà di origine tunisina Bidi importata dal Prof. Tucci in Sicilia. La cultivar Senatore Cappelli era caratterizzata da un’ampia adattabilità, un maggior numero di cariossidi per spiga (33-42) e per spighetta (1,8-2,2) ([Porceddu, 1987](#)) rispetto alle precedenti popolazioni locali, ma soprattutto da un’ottima qualità della semola. I principali difetti erano per contro rappresentati da una notevole suscettibilità all’allettamento ed alle ruggini. Tipica rappresentante della sezione *mediterranea*, era alta e con epoca di maturazione mediamente tardiva. In questo periodo il successo del Senatore Cappelli fece sì che la superficie destinata a questa cultivar divenisse superiore a quella occupata complessivamente da tutte le altre e che fosse in seguito ampiamente utilizzata per il miglioramento genetico, tanto che più dell’80% delle cultivar italiane registrate entro il 1987 avevano Senatore Cappelli nel loro *pedegree* ([Boggini et al., 1987](#)).

1.2.2 Costituzione delle varietà di frumento di nuova costituzione

A partire dagli anni '60 erano attivi nel miglioramento genetico del frumento duro in Italia diversi costitutori che svilupparono le nuove varietà che sostituirono definitivamente Senatore Cappelli.

Negli anni '60-'70, contemporaneamente alla produzione di fertilizzanti di sintesi che non potevano essere sfruttati appieno dalle varietà alte sulle quali causavano allettamento, vennero individuati un gruppo di geni (Rht, **reduced height**) chiamati genericamente “*dwarfing genes*” (geni nanizzanti) in grado di ridurre l’altezza del culmo,

permettendo lo sviluppo di varietà resistenti all'allettamento, anche attraverso l'applicazione delle tecniche di mutagenesi.

Da questi filoni di ricerca, vennero sviluppate quelle varietà che segnarono un grande passo in avanti nel panorama varietale italiano del frumento duro.

Tali varietà, grazie alla resistenza all'allettamento ed al maggior produttività associata alla statura ridotta, e grazie alla resistenza alla ruggine nera ed all'oidio, consentirono il raggiungimento di livelli produttivi decisamente superiori a quelli precedenti.

Le costituzioni più pregevoli di questo periodo sono riportate nella figura 5, nella quale troviamo Svevo e Claudio, due delle cultivar di nuova costituzione, che sono state prese in considerazione nel presente lavoro.

Cultivar	Anno di iscrizione	Genealogia	Costitutore
<i>Flavio</i>	1992	Latino x Cappelli	Federconsorzi Roma
<i>Gianni</i>	1992	Incroci di genotipi turchi e varietà italiane	Mosconi Giovanni Ancona
<i>Radio</i>	1992	Creso x Isa	Proseme Foggia
<i>Parsifal</i>	1992	INRA 92-1 x D81028	Venturoli Sementi Bologna
<i>Italo</i>	1993	Incroci di genotipi turchi e varietà italiane	Mosconi Giovanni Ancona
<i>Colosseo</i>	1995	Mutante Mexa x Creso	Eurogen- Proseme
<i>Giemme</i>	1995	Duilio x Grazia	Maliani Genetica Recanati
<i>Iride</i>	1996	Altar84 x Ares sib	Società Produttori Sementi SPA (BO)/ENEA
<i>Svevo</i>	1996	Sel. Cimmyt x Zenit sib	Società Produttori Sementi SPA (BO)
<i>Rusticano</i>	1996	Linea CIMMYT F2 – Ceyt 16° n.09	Società Produttori Sementi SPA (BO)/ENEA
<i>Ciccio</i>	1996	(Appulo x Valnova) x (Valforte x Patrizio)	Eurogen (Proseme)
<i>Claudio</i>	1998	(Sel. Cimmyt x Durango) x (IS1938 x Grazia)	Sinagro ISEA Falconara Marittima

Fig. 5: Varietà notevoli costituite negli anni '70-'80 in Italia.

1.3 RIVOLUZIONE VERDE

All'inizio degli anni '60 l'agronomo Norman E. Borlaug condusse ricerche in continuazione ideale con quelle di Strampelli, dato che Borlaug non conosceva queste ultime. Egli giunse a risultati analoghi per i quali fu insignito del Premio Nobel. Tuttavia, alla base del lavoro di Borlaug vi sono i risultati ottenuti da Strampelli: infatti la varietà "Mentana" era stata esportata in Messico, considerata la migliore tra 30-40 altre varietà sperimentali importate, e questa fu una delle varietà da cui Borlaug partì per realizzare i suoi esperimenti.

Al lavoro di Nazareno Strampelli viene finalmente riconosciuto, sin dall'ultima decade del XX secolo, il merito di aver realizzato la "Prima rivoluzione verde" e posto le basi per la seconda. Anche la diffusione del gene del nanismo del grano *Rht8* è oramai universalmente attribuita agli incroci realizzati da Strampelli col grano giapponese "Akagomugi". Infatti, già negli anni '70 alcuni studiosi consideravano il lavoro di *breeding* di Strampelli come eccezionale.

A partire dagli anni '90 gli studi di Strampelli sono stati riconosciuti anche all'estero come base della "Rivoluzione verde". Il genetista inglese Anthony John Worland nel 1999 in un articolo specialistico pubblicato su *Journal of Genetics and Breeding* ha scritto:

«Il significato del lavoro di Borlaug e dei suoi colleghi al CIMMYT nel miglioramento della produzione del frumento sono stati universalmente riconosciuti e considerati come "la" rivoluzione verde nel miglioramento varietale del frumento. Molta meno pubblicità è stata data al lavoro pionieristico dei miglioratori del frumento operanti in Italia fra il 1910 e il 1950 che hanno prodotto progressi nel miglioramento varietale tali da poter essere considerati la "prima" rivoluzione verde. Il lavoro di miglioramento genetico di Strampelli, Orlandi, Todaro e Venturoli, è stato sì di particolare importanza nel miglioramento delle varietà italiane, ma in un secondo momento è stato certamente il presupposto per tutto il breeding mondiale del frumento»

Il termine *rivoluzione verde* è stato coniato per un approccio innovativo ai temi della produzione agricola che, attraverso l'accoppiamento di varietà vegetali geneticamente selezionate a sufficienti dosi di fertilizzanti, acqua ed altri prodotti agrochimici, ha consentito un incremento significativo delle produzioni agricole in gran parte del mondo.

1.4 CENNI SULLA STRUTTURA E COMPOSIZIONE DELLA CARIOSSIDE

Quello che comunemente viene chiamato seme, in realtà è un frutto secco indeiscente denominato cariosside (Figura 6). La cariosside matura è formata da tre parti fondamentali: il germe o embrione, la crusca e l'endosperma (Evers and Millart, 2002). Nei cereali la cariosside è la sede di accumulo dei prodotti della fotosintesi ed del metabolismo dell'azoto; essa infatti contiene una limitata quantità di proteine (7-15%) e di lipidi (2-9%) ed un elevato contenuto di carboidrati (65-75%) principalmente sotto forma di amido.

L'endosperma, ricco di amido, è rivestito esternamente da uno strato di cellule aleuroniche ed al suo interno contiene l'embrione (il cosiddetto "germe di grano") che rappresenta circa il 3% della cariosside. La crusca è formata dagli strati di rivestimento della cariosside (pericarpo all'esterno e residui dei tegumenti seminali all'interno) e dallo strato di aleurone e rappresenta circa il 14% del frutto.

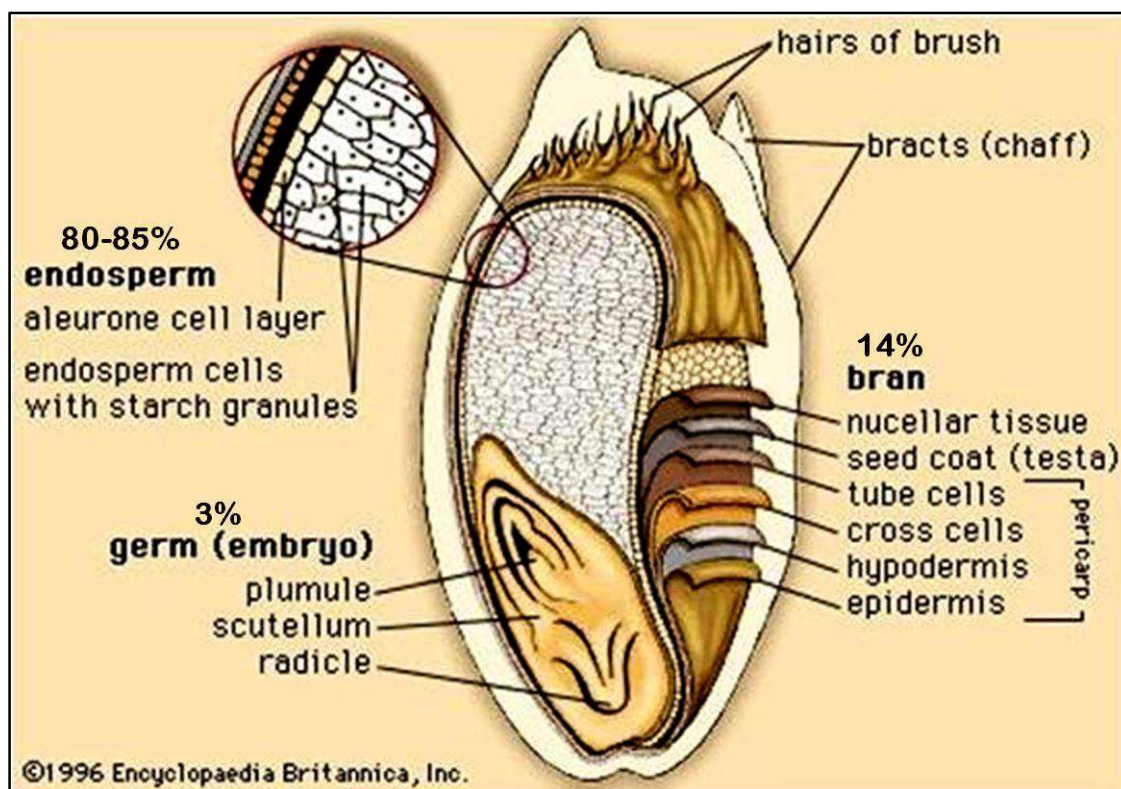


Fig. 6: Struttura e composizione della cariosside di frumento

1.4.1 Aspetti qualitativi del frumento

L'enorme varietà di prodotti derivati dal frumento e la loro diffusione in diversi paesi hanno portato come conseguenza la necessità di definire la qualità in relazione allo specifico prodotto e alle preferenze dei consumatori. Tra i criteri di giudizio alla base dei vari sistemi di classificazione della prestazione tecnologica del frumento vi sono la durezza (tessitura) della cariosside, la forza dell'impasto o del glutine e il contenuto proteico totale.

1.4.1.1 *La durezza della cariosside*

Nei cereali utilizzati nell'alimentazione come farine o semole, la durezza della cariosside, cioè la sua resistenza alla rottura durante il processo di macinazione, è un

carattere di grande importanza tecnologica poiché influenza le dimensioni delle particelle di farina (granulometria), lo stato fisico dei granuli di amido e l'assorbimento idrico da parte dei granuli stessi durante il “condizionamento” (fase di idratazione che precede la molitura) e lo sviluppo dell'impasto (Pomeranz and Williams, 1990; Morris and Rose, 1996). La durezza influenza inoltre la durata e il consumo energetico della macinazione, la resa in farina e gli usi tecnologici di quest'ultima.

I diversi tipi di frumento (Pomeranz and Williams, 1990; Jolly *et al*, 1996) possono essere classificati in base al grado di durezza della granella. Infatti, in base a questa caratteristica della cariosside, il frumento è suddiviso in tre classi qualitative principali: *soft*, *hard* e *extra-hard*. Al frumento tenero appartengono sia varietà a cariosside *soft* che *hard*, mentre le varietà di frumento duro producono solo cariossidi *extra-hard*.

Gli studi condotti su varietà di frumento caratterizzati da cariossidi *soft* o *hard* hanno evidenziato una differente forza di legame tra i granuli di amido presenti nell'endosperma e la matrice proteica che circonda i granuli stessi (Pomeranz and Williams, 1990, Darlington, 2001). Le cariossidi a tessitura *hard* sono infatti caratterizzate da una maggior forza di legame tra la matrice proteica e i granuli d'amido, mentre c'è una minore adesione tra proteine e amido nelle varietà a tessitura soffice (Barlow, 1973; Simmonds *et al*, 1973). Nei frumenti *soft* la minore forza di legame tra amido e proteine permette una buona separazione tra queste due macromolecole e minori danneggiamenti dell'amido durante la molitura in quanto la “linea di frattura” scorre all'interfaccia tra granulo d'amido e matrice circostante (Symes 1965, 1969), mentre nel caso di varietà a cariosside *hard* o *extra-hard* la linea di frattura attraversa i granuli di amido.

Dal punto di vista tecnologico, le varietà di frumento a granella *soft* sono caratterizzate da una cariosside più friabile che richiede meno energia, meno tempo e meno acqua per la macinazione. Esse hanno una maggior resa in farina rispetto alle varietà *hard*, con una granulometria molto piccola e ridotto danneggiamento dei granuli d'amido. Le farine di queste varietà sono preferenzialmente usate per la preparazione di biscotti e torte. Le varietà a granella *hard* assorbono una quantità maggiore d'acqua durante la fase di formazione dell'impasto e sono usate preferenzialmente per produrre pane e prodotti da forno lievitati.

Infine le varietà della specie tetraploide *T. turgidum*ssp. *durum* sono caratterizzate da cariossidi *extra-hard* che producono un macinato grossolano denominato semola, usato

principalmente per produrre pasta oppure, dopo un'ulteriore macinazione, pani tipici dell'Italia meridionale (Cutler and Brinson, 1935; Tipples *et al.*, 1994; Morris and Rose, 1996; Devaux *et al.*, 1998).

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 and 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), essendo il genoma D presente solo nel frumento tenero.

Sono state identificati due polipeptidi appartenenti alla classe delle purindoline, detti PinA e PinB, coinvolte nel controllo della durezza della cariosside codificate dai geni *pinA* e *pinB*. 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 and Morris, 1997, 1998).

1.4.1.2 Forza dell'impasto e del glutine

Nei processi di panificazione, le caratteristiche tecnologiche delle farine rivestono una notevole importanza perché sono loro che determinano l'utilizzo in specifici prodotti. Quindi la qualità dell'impasto e del prodotto finito dipendono da esse. Gli indici che definiscono le qualità di una farina sono molti ed un'opportuna valutazione d'insieme può fornire un'informazione completa.

In particolare l'impasto è caratterizzato dalla forza; questa è definita come la capacità della farina di assorbire acqua durante l'impasto e allo stesso tempo durante la lievitazione mantenere l'anidride carbonica. Si dice che una farina è forte quando produce un impasto di consistenza morbida dovuta alla sua alta capacità di assorbire l'acqua. L'impasto prodotto dalla farina forte, ha la caratteristica di essere elastico, non appiccicoso e asciutto, oltre che a bloccare l'anidride carbonica e la capacità di sopportare lunghe fermentazioni.

Caratteristiche come la quantità d'acqua necessaria nell'impasto, il tempo d'impasto, caratteristiche dell'impasto stesso, la cottura, tempi e parametri di lievitazione, volume del prodotto finito e la mollica, sono definiti dalla forza della farina. La quantità e

la qualità del glutine definiscono la forza della farina, e un alto contenuto di glutine nella farina porta ad un elevato valore di forza .

Giacomo Beccari è stato il primo a descrivere e definire "il glutine", che è una massa proteica coesa ottenuta dopo aver lisciviato l'impasto con l'acqua (Beccari, 1745). Da allora studi più sistematici sono stati effettuati, in particolare da Osborne (1859-1929), che ha definito le "albumine", come la frazione proteica solubile in acqua, le "globuline" solubili in soluzioni saline, le "gliadine" solubili in soluzioni alcoliche e le "glutenine", solubili in alcali o acidi diluiti. Il glutine, pertanto, è costituito dalle gliadine e dalle glutenine, insolubili in soluzioni acquose.

La qualità e la quantità delle proteine costituenti il glutine sono i maggiori fattori che influenzano le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento ed in particolare le proprietà visco-elastiche degli impasti da esse ottenute, quali l'estensibilità, l'elasticità e la loro forza (Shewry and Tatham, 1997).

Gliadine e glutenine (figura 7) si organizzano in un reticolo complesso stabilizzato da legami covalenti (legami disolfuro) e da legami di natura secondaria (legami ad idrogeno e di natura idrofobica) (Belton, 1999; Shewry *et al.*, 2001) e costituiscono circa l'80% delle proteine totali (Seilmeier, 1991). In particolare, mentre le glutenine sono proteine polimeriche le cui singole unità componenti sono unite fra di loro da legami disolfuro inter-molecolari e conferiscono agli impasti le caratteristiche di forza ed elasticità, le gliadine sono proteine monomeriche che prendono parte alla formazione del glutine mediante legami idrogeno inter-catena, grazie ai numerosi residui di glutammina presenti, e mediante legami di natura idrofobica fra le catene non polari degli amminoacidi. Le gliadine sono i componenti più importanti nel determinare le caratteristiche di estensibilità dei relativi impasti (Khatkar *et al.*, 2002).

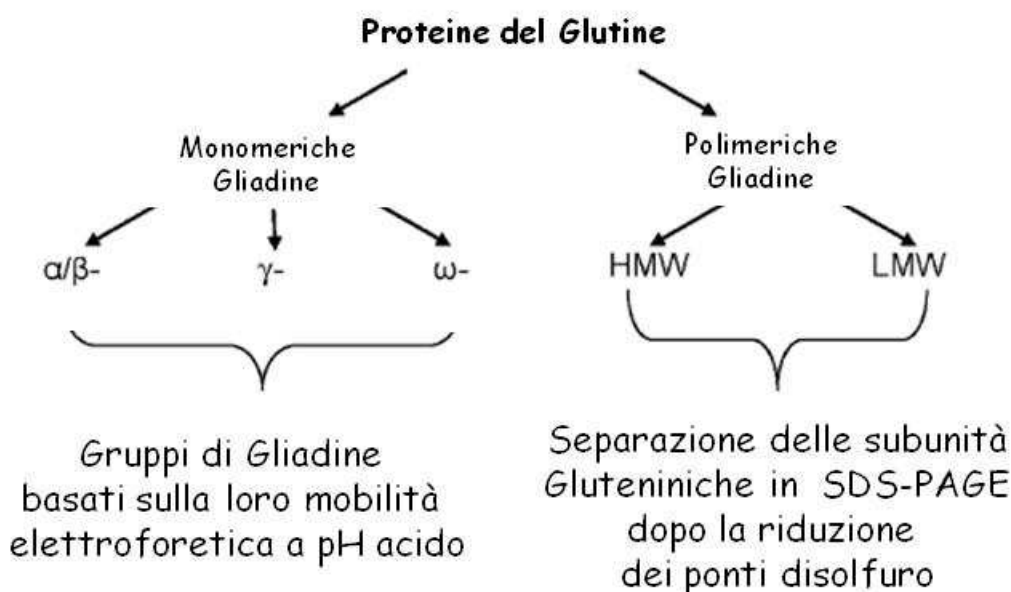


Fig. 7: Classificazione delle proteine del glutine

La qualità tecnologica è dovuta a una combinazione di specifiche proprietà viscoelastiche che trovano origine nella specifica composizione qualitativa e quantitativa del glutine.

In particolare nel settore della panificazione, un pane di buona qualità è prodotto con impasti forti ed estensibili che sono in grado di espandersi in seguito ai processi di fermentazione, di trattenere la CO₂ prodotta e di non collassare a processo di cottura ultimato. Le buone qualità pastificatorie si hanno invece quando il prodotto finito è di un forte colore giallo ambrato, è resistente alla cottura, rimanendo “al dente” mantenendo la sua forma, e quando l’acqua di cottura rimane priva di amido.

1.4.1.2.1 Le glutenine

Il peso molecolare dei polimeri gluteninici può raggiungere milioni di dalton. Essi sono i più grandi polimeri proteici presenti in natura (Wrigley, 1996).

I polimeri gluteninici sono composti da miscele eterogenee di polipeptidi, stabilizzati da ponti disolfuro, i quali vengono classificati in quattro gruppi (denominati A, B, C, D) in base alla loro mobilità elettroforetica in SDS-PAGE (2D-PAGE), dopo riduzione (figura 8).

Il gruppo A (con un peso molecolare compreso tra 80,000 a 120,000 Da) corrisponde alle HMW-GS (subunità gluteniniche ad alto peso molecolare o *High Molecular Weight- Glutenin Subunits* (Payne and Corfield, 1979). I gruppi B-D comprendono invece le subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW-GS, *Low Molecular Weight Glutenin Subunits*). In particolare, il gruppo B (42,000-51,000 Da) comprende principalmente quei polipeptidi con sequenza propria delle LMW-GS, il gruppo C (30,000-40,000 Da) comprende soprattutto γ - e α/β - gliadine modificate nel numero di cisteine (Payne and Corfield 1979; Payne *et al.*, 1985; Thompson *et al* 1994); infine, il gruppo D, con pI altamente acido, corrisponde alle ω -gliadine modificate (Jackson *et al.*, 1983; Masci *et al.*, 1993). Infatti, se le gliadine, che hanno normalmente nessuno (come nelle ω -gliadine) o un numero pari di residui di cisteina (6 per le α/β - e 8 per le γ -gliadine) e solo ponti disolfuro intramolecolari, subiscono una mutazione che porta all'acquisizione o alla perdita di uno di tali residui, i polipeptidi corrispondenti hanno la possibilità di formare ponti disolfuro intermolecolari e, pertanto, vengono classificati, dal punto di vista funzionale, come subunità gluteniniche (D'Ovidio and Masci, 2004).

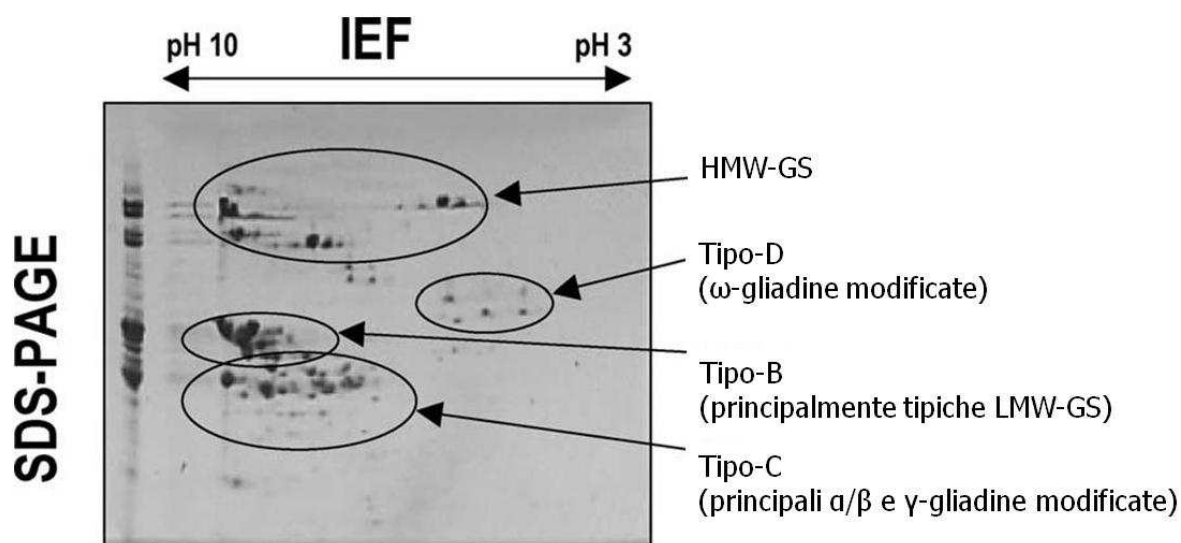


Fig. 8: Elettroforesi bidimensionale (IEF X SDS-PAGE) delle subunità gluteniniche della cultivar di frumento tenero Chinese Spring

HMW-GS:

La variazione allelica delle HMW-GS è fondamentale nell'influencare la qualità panificatoria, come evidenziato da Payne e collaboratori con una serie di studi partire dalla fine del 1970 (Payne *et al.*, 1979). In particolare, Payne (1987) ha assegnato un punteggio a ciascuna delle subunità o coppie di subunità presenti nelle singole varietà di

frumento tenero Europee, che tiene conto delle specifiche caratteristiche panificatorie degli impasti ottenuti dai genotipi che le posseggono. Sommando i singoli punteggi relativi alle singole subunità espresse in una data varietà, è possibile calcolare il punteggio totale che è una stima delle caratteristiche panificatorie e, più in generale qualitative, della varietà in oggetto di studio.

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-GS sono considerate il maggior determinante dell'elasticità del glutine.

LMW-GS:

Le LMW rappresentano circa un terzo delle proteine della cariosside di frumento e il 60% delle glutenine totali (Bietz and Wall 1973). La classificazione di questo gruppo di glutenine a basso peso molecolare, riflette non solo la loro diversa mobilità elettroforetica ma anche le differenti caratteristiche biochimiche e strutturali dei polipeptidi (D'Ovidio e Masci, 2004). Inoltre, nonostante la loro abbondanza, le LMW-GS hanno ricevuto molta meno considerazione nella ricerca rispetto alle HMW-GS. Questo è in gran parte dovuto alla difficoltà di individuarle in gel SDS-PAGE, poiché le LMW-GS in generale si sovrappongono con le gliadine. Ciò nonostante, il miglioramento nella risoluzione, soprattutto attraverso l'uso di gel bidimensionali (Skylas *et al.*, 2000; Vense *et al.*, 2005; Vensel *et al.*, 2011), ha permesso di ottenere nuove conoscenze circa le caratteristiche genetiche, strutturali e funzionali di queste subunità.

Le LMW-GS sono i fattori determinanti della qualità delle semole di frumento duro, utilizzate principalmente nei processi di pastificazione. In frumento duro, sono state identificate due principali 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.

1.4.1.2.2 Le Gliadine

Le gliadine sono proteine monomeriche in quanto naturalmente prive di residui cisteinici o in quanto tutte le cisteine presenti formano legami disolfuro intramolecolari.

Inoltre esse sono considerate il fattore principale che causa la malattia “celiachia” (Ellis *et al.*, 2003; Dewar *et al.*, 2004; Londei *et al.*, 2005), la più comune intolleranza umana al glutine.

I tre gruppi α/β , γ e ω -gliadine (Woychik *et al.*, 1961) sono distinti in base alla loro mobilità elettroforetica su gel di poliacrilammide a pH acido (APAGE) (figura 9) e sulla base della composizione amminoacidica, che è comunque identica per le α - e le β -, che, per questo motivo, vengono spesso indicate come gruppo α/β (Kasarda *et al.*, 1983).

Il loro peso molecolare varia da 30,000 a 75,000 Da. In un singolo seme di frumento, tramite elettroforesi monodimensionali, possono essere identificate da 20-25 componenti (Bushuk and Zillman 1978; Autran *et al.*, 1979; Wrigley *et al.*, 1982), mentre le analisi bidimensionali (2D-PAGE) di un unico seme di frumento permettono una maggiore risoluzione con la separazione di circa 50 gliadine (Wrigley, 1970; Payne *et al.*, 1982; Lafiandra and Kasarda 1985; Pogna *et al.*, 1990). Esse sono maggiormente responsabili dell'estensibilità degli impasti.

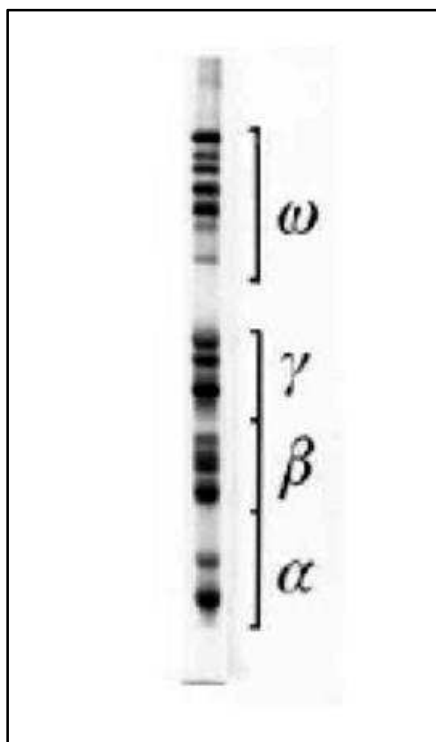


Fig. 9: Gel di poliacrilammide a pH acido (A-PAGE) di gliadine di frumento.

1.4.1.3 Contenuto Proteico

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..

È universalmente accettato che il fattore principale che causa variabilità nella qualità tecnologica di una singola varietà di grano sia 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 possono presentare differenze significative nella composizione proteica e, in particolare, nei rapporti tra le frazioni proteiche che costituiscono il glutine ([Wasik and Bushuk 1975](#); [Heubner and Wall 1976](#)). Ciò si traduce nel fatto che il contenuto proteico è uno dei parametri da tenere in considerazione per gli aspetti qualitativi, ma anche la composizione dei singoli polipeptidi, nonché la loro organizzazione all'interno del glutine, sono importanti.

1.4.2 Aspetti nutrizionali

Il frumento, essendo ampiamente consumato ed essendo costituito per oltre il 70% di amido, rappresenta la maggiore 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.

Accanto a questi aspetti positivi, vi è il fatto che il frumento fa parte dei sei alimenti maggiormente allergenici, ovvero quelli che, nell'insieme rappresentano la causa di circa il 90% di tutte le reazioni allergiche. Tuttavia l'incidenza della vera allergia alimentare (IgE-mediata) è abbastanza infrequente negli adulti, sebbene possa interessare fino all'1% dei bambini ([Poole et al., 2006](#)). Tra le allergie, si riconoscono quelle di tipo alimentare e respiratorio. Vi sono poi diverse intolleranze al frumento, tra cui la celiachia è la più nota, sebbene la sensibilità al glutine non di tipo celiaco (NCGS) sembri essere la patologia più frequente legato al consumo di prodotti a base di frumento ([Sapone et al., 2012](#)).

1.4.2.1 Le proteine

L'apporto proteico derivato dai cereali, sia nell'alimentazione umana che animale, è circa tre volte superiore a quello derivato dai legumi (Shewry and Halford 2002). Questo apporto è caratterizzato 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.

In figura 10, viene schematizzata la composizione proteica nella cariosside di frumento. In essa troviamo la principale divisione in proteine del glutine (glutenine e gliadine) che rappresentano circa l'80% delle proteine totali, e proteine metaboliche (albumine e globuline) che rappresentano il rimanente 20% delle proteine totali (Dupont *et al.*, 2011).

Le prime, sono state già descritte nel paragrafo 1.4.1.2.1. Le proteine metaboliche, comprendenti sia albumine e globuline, che proteine CM, ovvero solubili in cloroformio e metanolo sono particolarmente coinvolte nelle allergie respiratorie (Battais *et al.*, 2008). Maggiori dettagli sulle allergie determinate dalle proteine solubili vengono descritte nel paragrafo 1.4.2.1.1.

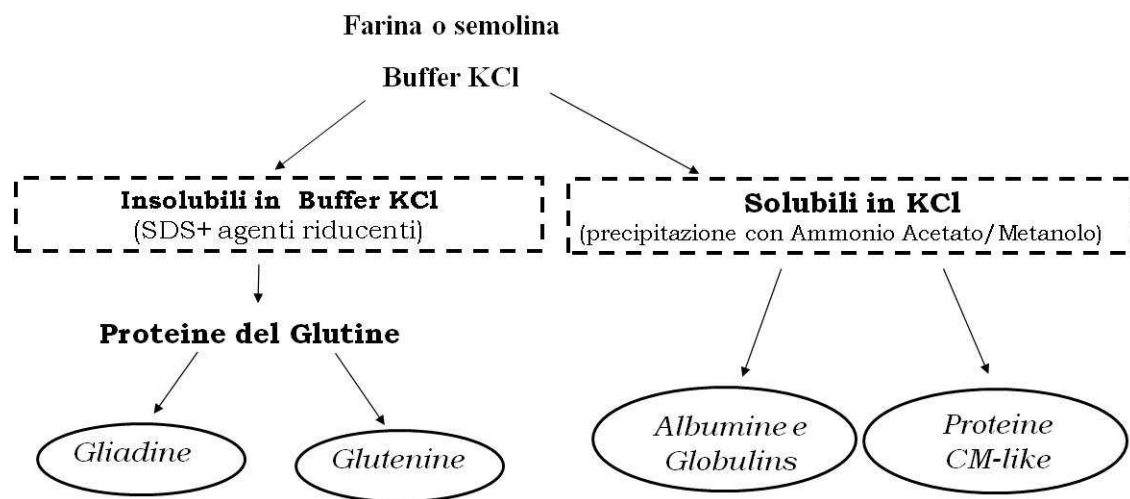


Fig. 10: Separazione delle proteine della farina di frumento, secondo la solubilità (Hurkman *et al.* 2004)

1.4.2.1.1 Proteine solubili

La maggior parte di queste proteine è localizzata negli estratti esterni della cariosside di frumento (aleurone) e nell'embrione; altre sono distribuite nell'endosperma. Le albumine sono più numerose rispetto alle globuline. La principale differenza nella composizione amminoacidica tra le proteine del glutine e le albumine e globuline, è che

queste ultime hanno un basso contenuto in triptofano, asparagina, glutammato e maggiore contenuto in lisina.

E' stato osservato ([Payne and Rhodes, 1982](#)) che le proteine solubili comprendono enzimi metabolici, idrolitici, inibitori di enzimi. Sono presenti, inoltre, le triticine, che rappresentano circa il 5% delle proteine totali del seme. e sono note come allergeni.

Un'ampia caratterizzazione delle proteine metaboliche è stata eseguita da [Vensel et al., \(2005\)](#). Usando un approccio classico basato su 2DE, sono state identificate in questa frazione 254 proteine, coinvolte in 13 differenti processi biochimici tra i quali: reazioni di interconversione ATP, metabolismo dei carboidrati, divisione cellulare, citoscheletro, metabolismo dei lipidi, metabolismo dell'azoto, sintesi e assemblaggio delle proteine, turnover proteico, segnali di trasduzione, proteine di riserva, stress/difesa, trascrizione/traduzione e trasporto (figura 11).

SwissProt no.	Proteina	SwissProt no.	Proteina
Q8S1A5	Carbamoyl phosphate synthetase	P55307	Catalase isozyme 1
Q8L5C2	4SNo-Tudor protein, (NTPase)	Q93YR3	Heat shock associated protein
Q8L5C2	4SNo-Tudor protein, (NTPase)	Q8RZW7	Selenium binding protein
Q42669	Aconitase	Q8LST6	Aldehyde dehydrogenase
Q9LZF6	Cell division cycle protein	Q9FPK6	Aldehyde dehydrogenase
P49608	Aconitase	Q8GU01	Globulin-2
O23927	Pyruvate Pi dikinase	Q9M4Z1	ADP-glucose PPase, SS
O23755	Elongation factor 2	O49218	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
Q98447	ClpC protease	Q43772	UDP-glucose PPase
Q43638	Heat shock protein, 82K, precursor	Q43772	UDP-glucose PPase
Q9LF88	Late embryogenesis abundant protein-like	Q9M4Z1	ADP glucose PPase, SS
Q8W0Q7	Methionine synthase	Q9ASP4	Dihydrolipoamide dehydrogenase
Q9XGF1	Heat shock protein 80-2	Q93YR3	Heat shock associated protein
Q9M6E6	Poly(A)-binding protein	Q8W3W6	LMW glutenin subunit group 3 type II
Q9AT32	Poly(A)-binding protein	Q8GU18	LMW glutenin subunit
Q9M6E6	Poly(A)-binding protein	Q9ASP4	Dihydrolipoamide dehydrogenase
P93616	Poly(A)-binding protein	Q8GU18	LMW glutenin subunit group 3 type II
P93616	Poly(A)-binding protein	P52894	Alanine amino transferase 2
P93616	Poly(A)-binding protein	Q8GU01	Globulin-2
Q39641	Heat shock protein 70	P52894	Alanine amino transferase 2
P93616	Poly(A)-binding protein	Q42971	Enolase
P93616	Poly(A)-binding protein	Q42971	Enolase
Q01899	Heat shock protein 70	Q9ZRR5	Tubulin α -3 chain
Q9SPK5	10-Formyltetrahydrofolate synthetase	Q9ZRB0	Tubulin β -3 chain
Q40058	DNAK-type molecular chaperone HSP70	Q42971	Enolase
Q95176	F23N19.10, putative stress-induced protein	O81237	6-Phosphogluconate dehydrogenase
P93616	Poly(A)-binding protein	Q8W3N9	26S Proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit 3
Q8L724	Stress-induced protein, sti1-like	Q8VZ47	Argininosuccinate synthase-like protein
Q9FME2	RNA-binding protein, similarity	Q9AUV6	UDP-glucose dehydrogenase
Q9FME2	RNA-binding protein, similarity	Q68837	Triticin
Q95NX2	Phosphoglucomutase	Q8W516	SGT1
Q944F5	Fructokinase	Q8W3W4	LMW glutenin subunit group 4 type II
Q65305	Acetohydroxyacid synthase	Q9FXT8	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit 4
Q9ZR86	Protein disulfide isomerase-like protein	P41378	Eukaryotic initiation factor 4A
Q94DV7	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent	Q40058	DNAK-type molecular chaperone HSP70
Q94DV7	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent	Q9FXT8	26S Proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit 4
Q8GWX8	2-Isopropylmalate synthase	P37833	Aspartate amino transferase
Q8W4M5	PPi-fructose-6-P 1-phosphotransferase	Q9SAU8	Heat shock protein 70
Q41141	PPi-fructose-6-P 1-phosphotransferase beta subunit	Q9FXT8	26S Proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit 4b (10 dpa)
Q9LWT6	Chaperonin 60 kDa beta subunit	Q9XGU8	Isocitrate dehydrogenase (NAD) (36 dpa)
P52589	Protein disulfide isomerase	Q8GU01	Globulin-2
O49485	Phosphoglycerate dehydrogenase-like protein	Q9ZRI8	Formate dehydrogenase
O82783	Importin α -2 subunit	P37833	Aspartate amino transferase
P16098	β -Amylase	P93693	Serpin WZS2
P29305	14-3-3 Protein homolog	P37833	Aspartate amino transferase
Q8LKV8	Seed globulin	Q9ST58	Serpin
Q8LKV8	Seed globulin	Q43492	Serpin homolog WZS3
P93692	Serpin homolog WZS3	P37833	Aspartate amino transferase
P04727	α / β -Gliadin clone PW8142	P26517	Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase (NAD)
Q9FUS4	Actin	P26517	Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase (NAD)
Q43723	Trypsin inhibitor CMx precursor (clones pCMx1 and pCMx3)	Q8LK23	Peroxidase 1
Q41518	Glycine-rich RNA-binding protein	Q947H4	Plasmodesmal receptor
P01084	α -Amylase inhibitor 0.53	T06212 ⁴⁹	Glucose and ribitol dehydrogenase
P01084	α -Amylase inhibitor 0.53	Q03678	Globulin Beg 1
Q49956	α -Amylase inhibitor Ima 1, monomeric	Q8L810	Globulin-like protein
Q09114	Avenin N9	P24296	Nonspecific lipid-transfer protein precursor
P35687	40S Ribosomal protein S21	Q9ST58	Serpin
Q40641	Polyubiquitin 6	P12783	Phosphoglycerate kinase
Q40058	DNAK-type molecular chaperone HSP70	P93438	S-Adenosylmethionine synthetase 2
Q944R8	UDP-glucose dehydrogenase	Q9FXT8	26S Proteasome regulatory A subunit
P40978	40S Ribosomal protein S19	P50299	S-Adenosylmethionine synthetase 1
Q93W25	Cyclophilin A-1	Q945R5	Ascorbate peroxidase
Q43223	Sucrose synthase type 2	Q945R5	Ascorbate peroxidase
Q9LF88	Late embryogenesis abundant protein-like	Q9ZR33	Reversibly glycosylated polypeptide
Q8S7U3	Embryo-specific protein	Q9LF88	Late embryogenesis abundant protein-like
Q8GU01	Globulin-2	Q8GU01	Globulin-2
Q8GU01	Globulin-2	Q8GU01	Globulin-2
Q41551	LMW glutenin (fragment)	P26517	Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase (NAD)
		Q43247	Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase (NAD)
		Q9FF52	60S Ribosomal protein L12
		P28814	Barwin

SwissProt no.	Proteina	SwissProt no.	Proteina
P93692	Serpin homolog WZS3	Q8LKV8	Seed globulin
Q40676	Aldolase	Q04832	DNA-binding protein HEXBP
P93692	Serpin homolog WZS3	Q9FRV0	Chitinase-c
Q41593	Serpin	O23963	Ascorbate peroxidase
Q9ZR33	Reversibly glycosylated polypeptide (10 dpa)	O23963	Ascorbate peroxidase
P93692	Serpin homolog WZS3 (36 dpa)	Q9FER4	20S Proteasome α -subunit
Q9ZRI8	Formate dehydrogenase	O23963	Ascorbate peroxidase
Q9ZR33	Reversibly glycosylated polypeptide	Q944C6	Small ras-related GTP-binding protein
Q9ZRI8	Formate dehydrogenase	P11955	Chitinase-a
Q40676	Aldolase	P27919	Avenin
Q8LK23	Peroxidase 1	Q9FS79	Triosephosphate isomerase
O81221	Actin	Q8LKV8	Seed globulin
Q41319	Acyl-acyl-carrier protein desaturase	Q9FS79	Triosephosphate isomerase
Q93Y71	Protein disulfide-isomerase precursor	P34937	Triosephosphate isomerase
Q40676	Aldolase	Q8LK23	Peroxidase 1
Q8LK23	Peroxidase 1	Q8LKV8	Seed globulin
Q9M4V4	Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (NAD)	Q8S4P7	Thaumatococcus-like protein TLP7
Q40069	Peroxidase BP1	Q9FER4	20S Proteasome α -subunit
P25861	Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (NAD)	P29546	Elongation factor 1- β
Q8LK23	Peroxidase 1	Q945R5	Ascorbate peroxidase
Q9ST58	Serpin	Q9LMK1	F10K1.2V7A7_100 protein, similarity
Q94CS6	Legumin-like protein	Q9AXH7	1-Cys peroxidase
Q942N5	Auxin-induced protein (10 dpa)	Q09114	Avenin N9
Q9M4V4	Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (NAD) (36 dpa)	P52572	Peroxioredoxin
Q9M4V4	Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (NAD)	Q9LSU2	20S Proteasome α -subunit B
P26517	Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (NAD)	Q96185	Superoxide dismutase [Mn]
Q94KS2	TGF- β receptor-interacting protein 1	Q9MB31	GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1
Q9XGC6	Adenosine kinase	Q93VQ6	Expressed protein
Q03678	Globulin Beg 1	P16347	α -Amylase/subtilisin inhibitor
Q9FRV1	Chitinase-a	Q84UH6	Dehydroascorbate reductase
Q94KS2	TGF- β receptor-interacting protein 1	Q93XQ6	Cyclophilin A-2
P41095	60S Acidic ribosomal protein P0	Q09114	Avenin N9
Q94CS6	Legumin-like protein	Q9LMK1	F10K1.2V7A7_100 protein, similarity
Q94CS6	Legumin-like protein	Q9MB31	GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1
Q9C774	26S Proteasome regulatory subunit S12	Q9LMK1	F10K1.2V7A7_100 protein, similarity
Q09114	Avenin N9	Q9LST9	β -1 Subunit of 20S proteasome
Q9FT00	Malate dehydrogenase (NAD)	Q9MB31	GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1
Q94JA2	Malate dehydrogenase (NAD)	Q9ZSU2	Translation initiation factor 5A
P49027	Guanine nucleotide-binding protein β subunit-like protein	Q8LRM8	Translationally controlled tumor protein
Q945R5	Ascorbate peroxidase	Q93XQ6	Protein disulfide isomerase 2 precursor
Q42988	PPi-fructose-6-P 1-phosphotransferase	Q41561	Heat shock protein 16.9C
Q9ZWJ2	Glyoxalase I	Q41518	Glycine-rich RNA-binding protein
Q40676	Aldolase	Q41518	Glycine-rich RNA-binding protein
Q07810	Tritin	Q42973	Ubiquitin-protein ligase
T06212 ^d	Glucose and ribitol dehydrogenase	P35686	40S Ribosomal protein S20 (10 dpa)
Q9C5Y9	Initiation factor 3g	Q43659	Grain softness protein 1b (36 dpa)
Q8W5L9	Purple acid phosphatase	P17314	α -Amylase/trypsin inhibitor, CM3
Q7X653	OSJNBb0118P14.5	P23345	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
Q8L5C6	Xylanase inhibitor protein I	Q43472	Glycine-rich RNA-binding protein
Q7X653	OSJNBb0118P14.5	Q02254	Nucleoside diphosphate kinase I
Q8L5C6	Xylanase inhibitor protein I	Q9XHS0	40S Ribosomal protein S12
Q8LKV8	Seed globulin	Q95QG8	Pathogenesis-related protein 4
		P01085	α -Amylase inhibitor 0.19
		Q8S3L1	Glutaredoxin

Fig. 11: Proteine dell'endosperma di frumento identificate tramite MS (Vensel *et al.*, 2005)

1.4.2.2 I lipidi

La cariosside di frumento è costituita da lipidi per una percentuale dell'1,5-2%. In generale i cereali sono poveri in lipidi.

I lipidi presenti nella cariosside di frumento sono sia di tipo polare (glicolipidi e fosfolipidi) sia non polare (soprattutto trigliceridi). Una parte di essi si lega all'amido formando gli amido-lipidi (Morrison, 1995); un'altra parte si lega alle proteine della farina durante la lavorazione dell'impasto influenzando notevolmente le caratteristiche reologiche (Goesaert *et al.*, 2005).

I lipidi polari, derivati dalla parete cellulare, possono contribuire a ridurre l'assorbimento del colesterolo ed in generale migliorare l'ambiente del tratto digestivo inferiore (Sugawara and Miyazawa, 2001).

1.4.2.3 Vitamine, minerali e composti chimici

Il frumento nella sua integralità costituisce una buona fonte di minerali essenziali quali zinco, ferro e selenio. Soprattutto nei Paesi in via di sviluppo la scarsità di alcuni minerali è causa di importanti malattie.

L'apporto di selenio nella dieta è fondamentale per le sue proprietà antiossidanti, anticancerogene e antivirali. Studi (Zhao *et al.*, 2009) mostrano un'associazione tra il decremento di ferro e zinco e l'alta produttività. 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.

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 (10-100 µg/100g) e di acido folico (30-90 µg/100g). Essendo povero in lipidi, esso tende anche 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).

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, ma una perdita nel valore nutritivo dei prodotti derivati. Tali considerazioni sono alcune delle ragioni alla base del rinnovato interesse per i cereali integrali.

1.4.2.4 L'amido

L'amido è il principale componente dell'endosperma della cariosside di frumento. Questo rappresenta la principale forma di energia durante la germinazione, quando le amilasi lo riducono fino ad arrivare all'unità di glucosio, che viene utilizzato dall'embrione durante le prime fasi di sviluppo.

L'amido rappresenta anche la maggiore fonte di energia nell'alimentazione umana e animale. Esso viene digerito nell'intestino tenue e ridotto a zuccheri semplici. L'amido di frumento è composto solo da unità di glucosio; le unità di glucosio sono unite da legami glucosidici α -1, 4 per formare catene lineari e le ramificazioni vengono formate attraverso i legami α -1,6 sulle catene lineari.

L'amido è costituito da due classi di molecole, l'amilopectina e amilosio, che differiscono tra loro per la frequenza di ramificazioni e il grado di polimerizzazione. L'amilopectina è una molecola molto grande con un grado di polimerizzazione che varia da 105-107 e presenta punti di ramificazione, in media un punto ogni 15-20 unità di glucosio, mentre l'amilosio ha un minor grado di polimerizzazione che varia da 103 a 104, contenendo da zero a pochi punti di ramificazione. Queste differenze tra amilosio e amilopectina sono importanti a livello funzionale, in quanto si riflettono nella varietà di applicazioni nelle industrie alimentari e chimiche.

1.5 RUOLO DELLA CONCIMAZIONE AZOTATA

L'azoto è uno degli elementi indispensabili alla pianta, che con maggiore frequenza si trova nel terreno in quantità insufficiente a soddisfare il fabbisogno del frumento. Con l'obiettivo di ottenere elevate rese di prodotto in una coltivazione di frumento, la concimazione azotata è di primaria importanza. La quantità di azoto da apportare alla coltura con i concimi azotati varia in funzione dei seguenti fattori: caratteristiche genetiche della varietà coltivata, quantità dell'azoto del terreno utilizzabile dalla pianta in funzione dell'intensità di mineralizzazione della sostanza organica, condizioni climatiche che influenzano non solo l'attività dei microrganismi del terreno, ma anche la perdita di azoto per dilavamento, disponibilità di acqua per la pianta specialmente durante la fase di levata e la maturazione delle cariossidi, costo di acquisto e di distribuzione del concime.

Le condizioni climatiche hanno un'influenza rilevante sulla dose di concime azotato da distribuire alla coltura. Quantità maggiori vengono utilizzate quando l'ambiente

è fertile e quando la varietà coltivata risponde ad alti livelli di concimazione azotata con rese elevate; mentre la quantità di azoto deve diminuire nelle zone semiaride ed aride, in quanto ciò comporterebbe un alto consumo idrico.

Nelle condizioni dell'Italia Settentrionale e Centro Settentrionale una dose media di azoto può variare da 120-150 kg/ha, ma si arriva anche ai 200 kg/ha. Nell'ambiente caldo arido del Mezzogiorno e delle isole non vengono superate invece i 100-120 kg/ha e spesso conviene rimanere su livelli inferiori (70-100 kg/ha). Diverse sperimentazioni hanno evidenziato l'effetto positivo del regime idrico sulla produzione, mentre per quanto riguarda il contenuto proteico l'irrigazione determina un lieve decremento.

Per evitare in ogni momento carenze nutrizionali nella pianta, è necessario distribuire appropriatamente la fertilizzazione. In terreni carenti di azoto è consigliabile distribuire una parte del concime alla semina o all'accestimento, per favorire lo stesso e l'accrescimento delle giovani piantine.

L'epoca di concimazione influenza il contenuto proteico della cariosside ([Martin M. et al., 1990](#)), per cui è importante effettuare la concimazione azotata durante la maturazione.

Nel frumento la fertilizzazione organica, non ha molto vantaggio, dato che l'azoto è disponibile in modo molto lento, e ciò provoca una tardiva maturazione ed intensi attacchi da parte di parassiti.

1.6 LE ALLERGIE AL FRUMENTO: SINTOMI E DIAGNOSI

Si stima che nei Paesi sviluppati, più del 40% della popolazione possa essere colpita dalle allergie. Mentre la “prima ondata” di malattie allergiche (asma e rinite allergiche) sono apparse circa 50 anni fa, una “seconda ondata” di allergie alimentari è emersa negli ultimi 10-15 anni ([Prescott and Allen, 2011](#)). Le allergie alimentari influenzano più del 1-2%, ma meno del 10% della popolazione. Anche se centinaia di studi epidemiologici sono stati diffusi, è ancora difficile determinare le allergie alimentari con certezza, a causa della grande variazione delle metodologie. In ogni caso, tutti questi studi mostrano chiaramente che le allergie alimentari sono una preoccupazione importante per la salute ([Sicherer, 2011](#)).

La EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology), ha proposto di classificare le reazioni avverse agli alimenti (figura 12). L'allergia alimentare è una di queste reazioni; ed è definita come una reazione ipersensitiva caratterizzata da un meccanismo IgE mediato.

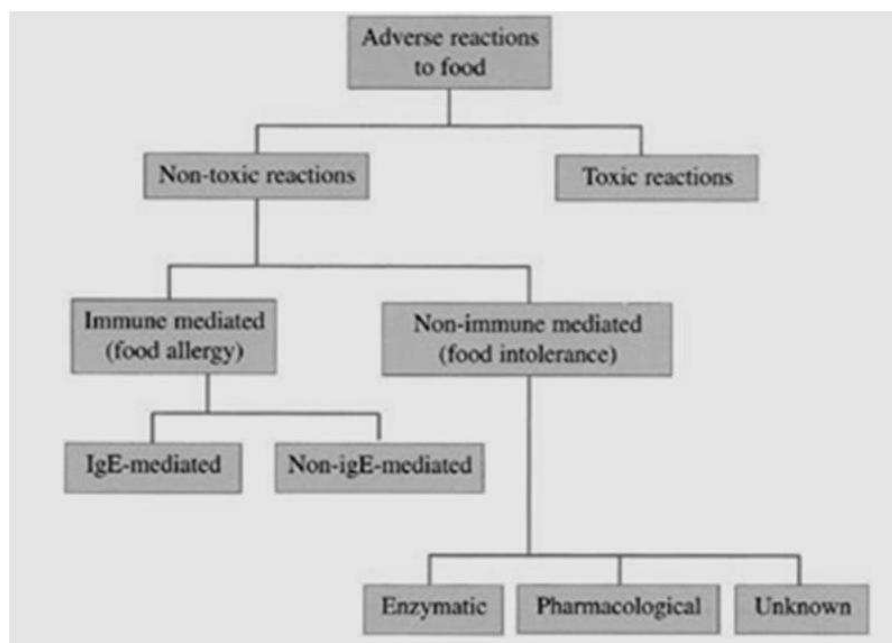


Fig. 12: Classificazione e terminologia usate in Europa per le allergie alimentari. (<http://www.globalspec.com>)

La prevalenza generale delle allergie alimentari è circa il 6-8% nei bambini durante i primi tre anni di vita (Woods *et al.*, 2001). Nella maggior parte dei casi, le allergie alimentari nei bambini coinvolgono il latte vaccino e le uova, ma fortunatamente solo nei primi 5-8 anni di vita, dato che dopo questa soglia nell'85% dei casi si osserva remissione. Negli adulti le allergie alimentari sono meno frequenti che nei bambini piccoli; in Europa circa il 2,4% degli adulti hanno un'allergia alimentare (Kanny *et al.*, 2001). Solo un numero limitato di alimenti sono responsabili per la maggior parte delle allergie alimentari e, tra questi alimenti, solo poche molecole sono capaci di provocare una risposta allergica in individui predisposti.

Gli allergeni delle piante sono più frequentemente coinvolti nelle allergie degli adulti, anche a causa di reazioni crociate con altri allergeni. Inoltre, si osserva una notevole variabilità nelle frequenze delle allergie a particolari composti: in particolare negli USA c'è un'alta prevalenza delle allergie agli arachidi mentre soia, latte vaccino e uova di gallina, sono i più frequenti allergeni alimentare in Giappone, e in Francia ci sono più allergie alla senape che negli altri Paesi. In Portogallo e in Spagna l'allergene alimentare

più frequente è il pesce; in Italia sono i frutti di mare, latte vaccino, e in Scandinavia le noci (Ferrari and Eng, 2011). In generale si osserva una frequenza dello 0,1% - 4,3% della popolazione in generale per le allergie ai frutti o alle noci, 0,1% - 1,4% per le verdure e meno del 1% al frumento e soia (Zuidmeer *et al.*, 2008).

Le allergie alimentari causano delle condizioni cliniche che coinvolgono il tratto gastrointestinale, la pelle, le vie respiratorie, o la più pericolosa di tutte le reazioni allergiche, l'anafilassi. Queste reazioni dipendono dalle caratteristiche fisico/chimiche dell'allergene responsabile per la sensibilizzazione, dose (quantità suggerita), se l'alimento viene ingerito da solo oppure combinato con altri cibi che potrebbero rallentare il suo assorbimento, con l'associazione di bevande alcoliche, aspirina oppure esercizio fisico e soprattutto, quelli che genericamente vengono definiti "fattori individuali" (Asero *et al.*, 2007). La sensibilizzazione alle allergie alimentari può avvenire tramite il tratto intestinale ed è spesso causato da proteine stabili, ma potrebbe anche essere una conseguenza di sensibilizzazione agli allergeni aeriformi (Breiteneder and Ebner, 2000). Nella diagnosi vengono identificati gli alimenti offensivi, cosa certamente essenziale, e in alcuni casi l'identificazione della proteina responsabile, a volte ancora più importante, poiché diversi alimenti che contengono allergeni omologhi che potenzialmente potrebbero generare una reazione incrociata, potrebbero dare un rischio di altre reazioni allergiche (Aserp *et al.*, 2007).

1.6.1 Manifestazioni cliniche

Le allergie alimentari causano diverse condizioni cliniche, e possono coinvolgere diversi organi come per esempio: il tratto gastrointestinale, la pelle, le vie respiratorie o provocare anafilassi (la più pericolosa di tutte le reazioni allergiche). In casi estremi i pazienti possono presentare dei sintomi cardiovascolari che comprendono l'ipertensione, shock, ritmo cardiaco irregolare, e i pazienti spesso riportano una sensazione catastrofica (Ebo and Steven 2001).

1.6.1.1 Sintomi Gastrointestinali

Il disordine gastrointestinale potrebbe presentare diversi sintomi come la nausea, dolori addominali, spasmi al colon, vomito, ritenzione gastrica, ipermotilità e diarrea (Sampson 1999). I sintomi solitamente si sviluppano entro pochi minuti fino a due ore dall'ingestione dell'alimento offensivo. Gli allergeni alimentari che causano sintomi

gastrointestinali sono generalmente resistenti al trattamento con pepsina, e sono capaci di arrivare al tratto gastrointestinale in una forma quasi non modificata oppure come frammenti (assemblati) con la sufficiente quantità di residui allergenici. L'immediata reazione di ipersensibilità gastrointestinale è raramente isolata, e molto spesso accompagnata da sintomi allergici in altri organi target (pelle, naso, polmoni e occhi) (Asero *et al.*, 2007).

1.6.1.2 Disturbi della pelle

Frequentemente, i mediatori IgE delle allergie alimentare coinvolgono la pelle con sintomi cutanei immediati come prurito, orticaria, e angioedema. Specialmente nei pazienti adulti, il più comune disordine della pelle è l'orticaria acuta, con o senza angioedema (Sampson, 2003a). Poiché componenti degli alimenti IgE-reattivi sono rapidamente assorbiti, l'orticaria può apparire in pochi minuti dall'ingestione degli alimenti offensivi e durare per qualche ora. L'orticaria da contatto è un disturbo piuttosto comune associato alla manipolazione di alimenti, e in alcuni casi, i pazienti con orticaria da contatto hanno anche allergie alimentari. Gli alimenti più comuni coinvolti nell'orticaria da contatto sono i frutti, pesce, vegetali e anche carne cruda. Le allergie alimentari possono anche apparire come infiammazioni croniche della pelle, conosciute come dermatite atopica (AD), molto comune nei bambini, ma rare negli adulti (Asero *et al.*, 2007).

1.6.1.3 OAS (Sindrome allergica orale)

La OAS è un tipo particolare di reazione mediata da IgE, particolarmente frequenti negli adulti con allergie alimentari. Gli organi coinvolti sono le labbra, mucose delle vie orali e faringe (Marie *et al.*, 2005). Tipicamente, i sintomi compaiono dopo pochi minuti con prurito nelle labbra, lingua, palato gola e/o orecchie e naso e/o il gonfiore di queste stesse aree. Solo in alcuni casi il decorso clinico è drammatico con una reazione letale di rigonfiamento della faringe o con una reazione anafilattica; di fatto nella maggior parte dei casi il decorso clinico è lieve ed è risolto nell'arco di 1 ora (Sampson, 2005). Nella maggior parte dei pazienti allergici ai pollini di betulla, dopo aver mangiato kiwi, noci, mele e carote si possono riscontrare le allergie orali, dovute alle proteine omologhe che ci sono in questi alimenti con il principale allergene del polline di betulla (Rev. Asero *et al.*, 2005). Tuttavia, la maggior parte dei pazienti con OAS può mangiare alimenti generalmente allergenici, dopo essere stati cotti o processati termicamente, perché la

maggior parte degli allergeni coinvolti nelle reazioni incrociate sono facilmente distrutti dal calore o dopo digestione pepsinica (Asero *et al.*, 2007).

1.6.1.4 Disturbi respiratori

I pazienti con allergie alimentari possono mostrare sintomi respiratori, come rinocongiuntivite e broncospasmi, dopo aver ingerito alimenti offensivi. Questi disturbi sono spesso associati a disordini gastrointestinali e della pelle, ma difficilmente sono presenti come unico sintomo (Sampson, 2003a). Rinocongiuntivite e broncospasmi a seguito di inalazioni di polveri o vapori alimentari sono reazioni comuni in pazienti con allergie alimentari, e sono stati associati specialmente al pesce, crostacei e legumi; e possono essere osservati anche con la farina di frumento o la cottura della pasta.

1.6.1.5 Anafilassi

L'anafilassi è la più drastica reazione allergica, avviene nel 17% - 37% dei pazienti allergenici che vengono ricoverati nelle unità di emergenza (Moneret-Vautrin *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2001). L'anafilassi alimentare colpisce entrambi i sessi in maniera uguale (Bock *et al.*, 2001) e può causare la morte (dovuta all'asma acuta) solitamente entro 30 minuti negli adulti giovani o adolescenti. I cibi più implicati nella malattia dell'anafilassi sono le arachidi, le noci, i frutti di mare e la frutta con buccia dura (Sampson, 2003b). L'anafilassi associata al cibo e indotta dall'esercizio fisico si verifica negli individui suscettibili quando ingeriscono il cibo che innesca la reazione entro 2-4 ore dall'esercizio fisico (Wang and Sampson 2007). Questo è un caso particolare di anafilassi perché i sintomi non avvengono in assenza di esercizio fisico o se l'alimento non è ingerito prima di fare esercizio fisico. Gli uomini sono meno influenzati rispetto alle donne e, nella maggior parte dei casi colpisce gli individui sotto i trent'anni (Sampson 2003 b). Il periodo trascorso tra l'ingestione del cibo e la reazione clinica varia dai 30 minuti alle 3 ore. Tutti i cibi possono essere coinvolti, con la prevalenza della farina di frumento (Kano *et al.*, 2000).

La diagnosi delle allergie alimentari può essere eseguita con i seguenti test in vivo : SPT (Skinprick test), APT (Atopy patch test), prove alimentari, quantificazione *in vitro* degli IgE specifici.

1.7 ALLERGIA AL FRUMENTO

Il frumento è una risorsa importante proteica per la dieta umana, ma sfortunatamente fa parte di uno dei sei allergeni alimentari più importanti (insieme al latte, uova, arachidi, soia e pesce). Le proteine del frumento, ingerite o inalate sotto forma di farina o prodotti cotti possono essere i responsabili delle reazioni avverse. Queste reazioni avverse al frumento possono avere un ampio spettro di manifestazioni cliniche a causa delle diverse vie colpite ad esempio: enteropatia del glutine di frumento (celiachia, anche se non è considerata un'allergia propriamente detta), allergie respiratorie alla farina di frumento, e allergie alimentari al frumento (Battais *et al.*, 2008). Le HWP (proteine idrolizzate del frumento) possono essere anche coinvolte nella sensibilizzazione per contatto. Questo è raro, ma può indurre reazioni allergiche severe (Laurière *et al.*, 2006).

1.7.1 Reazioni d'ipersensibili al frumento

1.7.1.1 *L'asma del panificatore*

L'asma del panificatore è una delle forme più comuni dell'asma professionale e colpisce tra il 4 -10% dei lavoratori dei forni in Europa. In Francia particolarmente è il primo tipo d'asma professionale (Ameille *et al.*, 2003) e il secondo nell'UK (McDonald *et al.*, 2000). Diversi studi hanno mostrato una forte associazione tra l'esposizione alla polvere di farina e di sensibilizzazione ad allergeni di frumento, ma non sono state trovate prove per l'esistenza di una soglia di esposizione per la sensibilizzazione e sintomi correlati al lavoro del frumento (Cullinan *et al.*, 2001; Peretz *et al.*, 2005). In figura 13 vengono riportate alcune proteine che reagiscono con le IgE da pazienti affetti dall'asma del panificatore.

Protein	$\approx M_r$	Test	Positive patients
Wheat germ agglutinin	17	RAST	5/9
Peroxidase	36	Dot blot	6/10
Thioredoxin (Tri a 25)	13 400	ELISA/immunoblot	8/17
Gliadins			
Fast ω }	45-65 000	Immunoblot/RAST	21/24
Slow ω }		Immunoblot/RAST	15/24
α }	30-45 000	Immunoblot/RAST	24/24
β }			18/24
γ }			12/24
Total		Immunoblot	2/15
Total glutenins	45-90 000	Immunoblot/RAST	23/24
		Immunoblot	7/15
α -Amylase (barley)	54 000	RAST/immunoblot	29/30
β -Amylase (barley)	64 000	RAST/immunoblot	30/30
Acyl CoA oxidase (two forms)	27 000	Immunoblot	Pooled sera
Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (five forms)	40-42 000	Immunoblot	8/10
Triosephosphate isomerase cytosolic (two forms)	26 000	Immunoblot	5/10
Serpin (two forms)	40 000	Immunoblot	4/10

Fig. 13: Proteine del frumento che hanno reagito con gli IgE di pazienti che presentano l'asma del panificatore.

1.7.1.2 Allergie alimentari al frumento

Le allergie alimentari colpiscono il 6% dei bambini piccoli e il 3-4% di adulti che soffrono di allergie alimentari (Sicherer and Sampson 2006). La prevalenza delle allergie alimentari al frumento nella popolazione generale è stata stimata per i bambini utilizzando i test di prova orali con una stima dello 0.2-0.5% (Zuidmeer *et al.*, 2008). Negli adulti, la sensibilizzazione al frumento (presenza di IgE specifici di frumento nei sieri) è stata stimata tra 0,4 e 3,6% della popolazione in generale (Zuidmeer *et al.*, 2008).

Le malattie causate dalle allergie del frumento sono le stesse di quelle di altre allergie alimentari. I bambini e gli adulti mostrano diversi sintomi: in particolare i bambini mostrano più che altro dermatite atopica (AD), a volte associato con sintomi respiratori e

problemi di ingestione, invece gli adulti mostrano shock anafilattico, angioedema, e la sindrome di irritazione dell'intestino ([Rasanen et al., 1994](#); [Sicherer et al., 2000](#)).

1.7.1.3 La Celiachia

La frazione del glutine del frumento, insieme all'orzo e segale (e probabilmente anche avena) è responsabile della celiachia ([Sollid, 2001](#); [Mowat, 2003](#)). La celiachia colpisce circa l'1% della popolazione in Europa, Sud e Nord America, Nord Africa e India ([Hishenhuber et al., 2006](#)). La celiachia (CD Coeliac disease) è una malattia con predisposizione genetica, non direttamente IgE mediata ed è più frequente nelle donne che negli uomini. Generalmente la CD appare con diarrea, vomito, debolezza generale, gonfiore dell'addome, ma molti altri sintomi possono essere presenti.

La celiachia è anche considerata una malattia autoimmune, a causa degli auto-anticorpi trovati nei pazienti contro l'enzima transglutaminasi tissutale (TG2). Sembra che TG2 aumenti l'affinità tra i peptidi gliadinici idrolizzati e la HLA (human histocompatibyleucocyteantigen) classe 2 DQ2 o molecole DQ8 su cellule antigeni presenti, mediante un processo di deaminazione selettiva di questi peptidi ([Hishenhuber et al., 2006](#)).

1.8 ALLERGENI DEL FRUMENTO

Un allergene alimentare è una proteina o un aptene chimico che è riconosciuto da cellule del sistema immunitario che elicitando specifiche reazioni mediate da IgE risultando in sintomi caratteristici ([Boyce et al., 2010](#)).

Non tutte le proteine allergeniche sono sempre riconosciute da tutti gli individui allergenici a un alimento. Se gli allergeni sono riconosciuti da più del 50% di una popolazione di individui allergici per l'alimento, allora sono chiamati "allergeni principali". Questo concetto riguarda solo la frequenza di riconoscimento da parte delle IgE, ma non riguarda la gravità delle manifestazioni cliniche conseguenti.

1.8.1 Le proteine di riserva

Diversi studi hanno mostrato che la frazione del glutine è coinvolta in diverse reazioni avverse al frumento (Battais *et al.*, 2006; Palosuo, 2003; Pastorello *et al.*, 2007, Mittag *et al.*, 2004), in particolare il legame tra IgE e le gliadine e le LMW-GS è stato riscontrato negli adulti e nei bambini con allergie alimentari al frumento (Battais *et al.*, 2003). Le α - e ω -gliadine sono state trovate come minori allergeni nell'asma del panificatore (Sandiford *et al.*, 1997), dato che in questo caso sono le proteine appartenenti alla frazione solubile (non glutine) ad essere maggiormente coinvolte.

Le ω -gliadine sono il principale allergene per il 100% degli adulti con WDEIA (wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis), e/o con anafilassi, e per il 55% di quelli con l'orticaria. Studi di Morita *et al.* (2003) riportano che ω -5 gliadine è il principale allergene in WDEIA; mentre le LMW-GS di tipo B vengono considerate importanti allergeni negli adulti e bambini con anafilassi (Pastorello *et al.*, 2007; Akagawa *et al.*, 2007), e le HMW-GS sono considerate allergeni minori.

1.8.1 Le proteine solubili

Oltre alle proteine del glutine, sono state identificate come proteine allergeniche anche quelle solubili in soluzioni saline, tra cui: fruttosio- bifosfato aldolasi, serina proteasi (Serpine), inibitori α -amilasi, LTP, Acil-coenzima A ossidasi e per ossidasi (Sánchez-Monge *et al.*, 1997; Weiss *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 2011).

I più importanti di questi allergeni solubili in soluzioni saline correlate all'asma del panificatore, sono gli inibitori delle α -amilasi. Letho *et al.* (2010) hanno mostrato anche che la proteina Taumatina è coinvolta nell'asma del panificatore. Un altro importante allergene è LTP (Lipid Transfer Proteins), che è correlato con le allergie alimentari (Pastorello *et al.*, 2007; Battais *et al.*, 2005) ma anche nell'asma del panificatore (Palaci *et al.*, 2009).

Pastorello *et al.* (2007) hanno identificato altre proteine legate agli IgE in pazienti con allergie alimentari al frumento. Alcune di queste (perossidasi, serpine, β -amilasi, tororedoxin B) sono state riportate come allergeni dell'asma del panificatore mentre altre (globuline, tritine, β -purotionine, puroindoline) non sono state identificate in altri studi. Queste diversità potrebbero essere spiegate da differenze in popolazioni o nei differenti approcci usati per identificare le proteine leganti IgE (Tatham and Shewry 2008).

1.8.2.1 Alcuni allergeni del frumento delle proteine solubili

Lipid Transfer Proteins (LTP) : le LTP vegetali hanno proprietà antimicrobiche e giocano un ruolo nei meccanismi di difesa nella pianta contro i loro patogeni. Queste proteine inizialmente sono state trovate in semi di frumento e in orzo, segale e avena (Douliez *et al.*, 2000) e sono state isolate dalla frazione solubile dove rappresentano circa 5-10% delle proteine totali solubili (Kader, 1996). La famiglia delle LTP è onnipresente nei vegetali e include proteine monomeriche che sono stabilizzate da ponti disolfuro. Due famiglie principali sono state isolate: LTPns1 e le LTPns 2 con una massa molecolare di 9 e 7KDa rispettivamente.

Anche se entrambe le famiglie sono caratterizzate da un pI di circa 9 e conservano 8 residui cisteinici coinvolti nei ponti disolfuro, mostrano una bassa similitudine (30%).

Le LTP vegetali mostrano ampie sequenze omologhe, mentre meno sequenze omologhe sono state trovate tra LTPs vegetali e LTPs mammiferi. Altri studi filogenetici rivelano che queste LTPs fanno parte della superfamiglia delle prolamine (Kreis *et al.*, 1985; Shewry *et al.*, 2002).

LTPs non specifiche sono state identificate come allergeni in una gamma di frutti, principalmente quelli della famiglia delle *Rosaceae*, in diversi vegetali e noci. In frumento le LTP non specifiche sono state descritte come importanti allergeni alimentari (Battais *et al.*, 2005; Pastorell *et al.*, 2007) anche associate con l'asma del panificatore (Palacin *et al.*, 2009).

Inibitori α -amilasi/tripsina (ATI): le perdite di raccolto in tutto il mondo sono causate da insetti parassiti che si alimentano di tessuti vegetali. Per la propria difesa, le piante hanno evoluto diversi meccanismi per la protezione, attraverso la produzione di composti e proteine di difesa, tra cui gli ATI (Franco *et al.*, 2002). La famiglia delle α -amilasi comprende enzimi che idrolizzano i legami α -D-(1,4) glucano e giocano un importante ruolo nel metabolismo dei carboidrati di tanti organismi che usano le α -amilasi soprattutto per digerire l'amido come fonte alimentare (MacGregor *et al.*, 2001). Gli inibitori di α -amilasi che possono anche avere attività di inibitori di proteasi, vengono utilizzati dalle piante come enzimi di difesa anche durante la germinazione dei semi, dato che possono bloccare gli enzimi intestinali degli insetti (Breiteneder and Radauer 2004). Questa famiglia di enzimi è presente nel frumento, orzo, riso e mais (García-Olmedo *et al.*, 1992).

Questi inibitori esistono come monomeri, dimeri o tetrameri, composti da subunità di circa 120-160 residui amminoacidici, contenenti 4 ponti disolfuro (James *et al.*, 1997). I polipeptidi sono codificati da una famiglia multi genica presente su più cromosomi, in particolare sui cromosomi 3, 4, 6 e 7 dei genomi B e D (Carbonero and García-Olmedo 1999; Islam *et al.*, 2003).

La famiglia degli ATI è considerata la principale causa dell'asma del panificatore. Diversi membri di questa famiglia sono capaci di sensibilizzare i pazienti atopici suscettibili attraverso l'inalazione ma anche l'ingestione. Gli allergeni all'interno della famiglia degli inibitori nei cereali comprendono tante subunità (WDAI-2, WTAI-CM, WTAI-CM2, WTAI-CM3, WTAI-CM16), gli allergeni omologhi dell'orzo CMb*, Hor v 15 (Hor v 1/BMAI-1), e le proteine dimeriche d'orzo, Sec c 1 della farina di segale, gli inibitori α -amilasi dimerici del riso RDAI-1 e RDAI-3 (Breiteneder and Radauer 2004). Le subunità degli inibitori tetramerici di frumento CM16* sono state descritte come una forma glicosilata.

Beta-amilasi: le β -amilasi sono state trovate nella maggior parte delle colture di cereali e si presentano in due forme diverse, le quali si differenziano nelle loro espressioni: una forma è specifica per l'endosperma, mentre l'altra ha un modello di espressione tessuto-ubiquitario (Ziegler, 1999).

Gli enzimi β -amilasi sono solubili in acqua (classificati come albumine) con alto peso molecolare (~60KDa) in condizioni ridotte; questi sono codificati dai loci *β -Amy-1* sui cromosomi 4DL, 4AL e 5AL. Queste proteine sono rapidamente degradate durante la germinazione del seme come proteine di riserva del frumento.

Utilizzando analisi RAST, Sandiford *et al.*, (1994) hanno rivelato l'allergenicità della β -amilasi da orzo nell'asma del panificatore. indicata anche da Larrè *et al.* (2011), attraverso un approccio allergenomico

1.9 L'ANALISI PROTEOMICA

L'analisi proteomica si propone la descrizione dei complessi proteici, dinamici ed interattivi, piuttosto che la caratterizzazione di proteine selezionate negli studi classici di tipo chimico o biochimico, figura 14.

Gli studi proteomici sono focalizzati su due principali aree: la *proteomica funzionale* volta a stabilire le interazioni che le proteine stabiliscono nel proprio intorno cellulare; la *proteomica di espressione* per la definizione qualitativa e quantitativa dell'aumento e/o diminuzione dei livelli di espressione proteica.

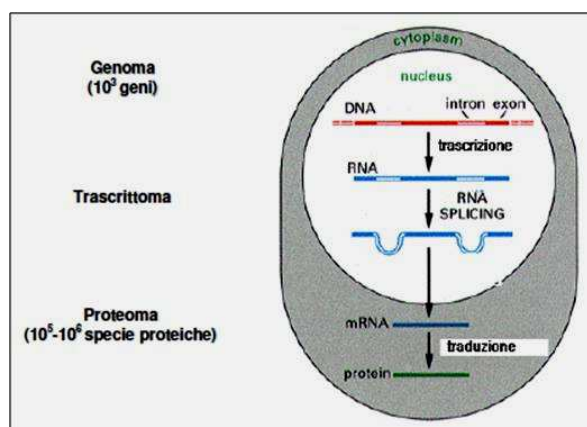


Fig. 14: Maggiore ordine di complessità del proteoma rispetto al genoma

1.9.1 Proteomica funzionale

L'obiettivo è principalmente la definizione della funzione biologica di proteine il cui ruolo è ancora sconosciuto e le interazioni proteina - proteina in vivo, per spiegare a livello molecolare i meccanismi cellulari (Godovac-Zimmermann J. *et al.*, 2003).

Definire la funzione di una proteina, significa associare una posizione all'interno di una cascata di eventi cellulari. Inoltre, come è ben noto, molte delle funzioni cellulari non sono svolte dalle proteine come entità individuali, ma in combinazione con altre componenti proteiche che, stabilendo delle interazioni rapide e specifiche intervengono e condizionano la realtà funzionale di una data proteina. L'interazione di questi processi realizza delle vere e proprie reti molecolari, dotate di nodi e diramazioni che, in definitiva, creano circuiti in cui scorre la trasmissione delle informazioni.

In figura 15, viene schematizzata una delle strategie utilizzate per comprendere le interazioni tra proteine.

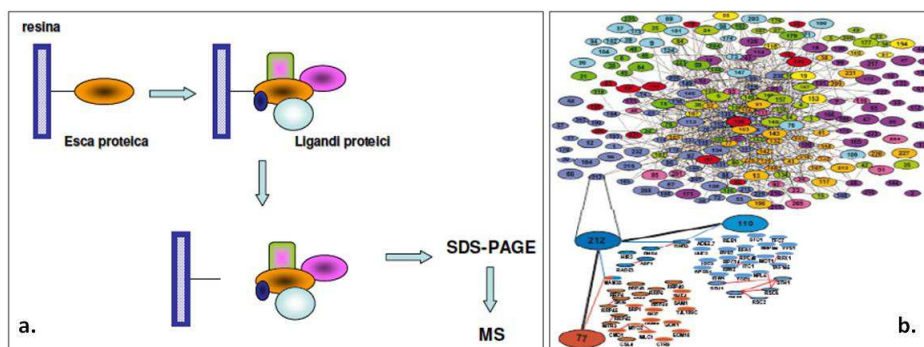


Fig. 15: a. Strategia che viene applicata nella proteomica funzionale. b. Mappa dell'interazioni che può avere una proteina in studio

1.9.2 Proteomica differenziale

Il confronto simultaneo di migliaia di proteine di un sistema biologico in condizioni diverse, o il monitoraggio delle stesse caratteristiche durante le diverse fasi di sviluppo dello stesso sistema, è uno degli obiettivi principali della proteomica differenziale. Si può eseguire questo confronto sia a livello qualitativo che quantitativo.

La metodica più usata per monitorare i cambiamenti di espressione proteica è la elettroforesi bidimensionale su gel (2DE), che separa le proteine di miscele complesse mediante due proprietà intrinseche, quali punto isoelettrico e peso molecolare. In questo modo è possibile assegnare ad ogni molecola proteica una posizione all'interno di una mappa definita da due coordinate: pI e peso molecolare. Inoltre i polipeptidi sono visualizzati e quantificati attraverso procedure di colorazione. I fattori che determinano la scelta della procedura di colorazione, risiedono nella sensibilità e nella linearità dell'intervallo di rilevabilità.

Il blu Coomassie è stato di gran lunga il colorante maggiormente utilizzato a causa della sua semplicità d'uso e alla sua compatibilità con altre tecniche analitiche come il sequenziamento di Edman e la spettrometria di massa, che trova però un limite applicativo nella proteomica per quanto riguarda la sua sensibilità che è approssimativamente 1 µg, mentre coloranti come il Silver-staining e quelli fluorescenti (Sypro Ruby e Sypro Orange), sono più sensibili e rilevano nanogrammi di proteine nei gel.

Le mappe ottenute sono acquisite da un densitometro: ad ogni pixel è associato un valore di assorbanza che è proporzionale alla concentrazione della proteina presente nel pixel. La riproducibilità di tali mappe rappresenta un punto chiave per il loro utilizzo in indagini di tipo comparativo. Le variazioni analitiche dovute al trattamento del campione,

ai procedimenti di colorazione o acquisizione dell'immagine o variazioni biologiche dovute all'ambiente in cui il campione è stato prodotto, processato e conservato; vengono annullate dai replicati analitici (variabilità sperimentale) e replicati biologici (varietà biologica) (Figura16).

In questo modo le mappe possono essere comparate per rilevare differenze statisticamente significative nell'espressione proteica.

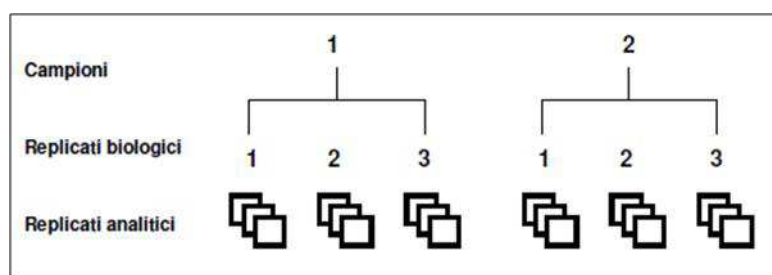


Fig. 16: Disegno sperimentale per studi differenziali

La tecnica 2D DIGE (**Differential In Gel Electrophoresis**) conferisce, teoricamente, a gli studi di proteomica comparativa una maggiore accuratezza. Essa utilizza la formazione di legami covalenti tra gli ϵ -ammino gruppi della lisina con differenti coloranti fluorescenti (Cy2, Cy3, Cy5).

Ciò perché è possibile utilizzare un solo gel per la separazione proteica e la quantificazione delle differenze tra i campioni. Il grande vantaggio di questa tecnica è che viene ridotta la variazione degli spot da gel a gel (Figura 17).

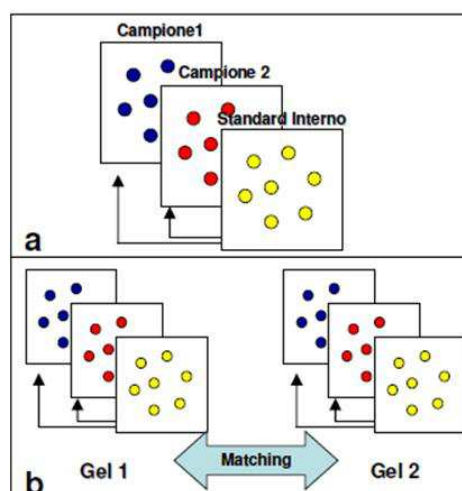


Fig. 17: Disegno sperimentale negli studi differenziali che utilizzano la tecnologia DIGE. a: determinazione simultanea all'interno dello stesso gel; b: confronto tra gel diversi.

Nell'era della post-genomica, la proteomica si posiziona al centro della ricerca della genomica funzionale, per lo studio della funzione dei geni nell'intero genoma. Inoltre nei sistemi vegetali la proteomica differenziale è ampiamente applicata. Essa ha dato il suo contributo anche alla comprensione degli effetti della fertilizzazione azotata sulla cariosside di frumento ([Altenbach *et al.*, 2011](#); [Tètard-Jones *et al.*, 2013](#); [Hurkman *et al.*, 2013](#)).

2. SCOPO DEL LAVORO

E' opinione comune che l'aumento delle allergie e delle intolleranze al frumento sia dovuto ad un aumento del contenuto proteico degli sfarinati ottenuti dalle nuove varietà che sarebbero state sviluppate proprio per permettere un uso estensivo della concimazione azotata, determinante per l'accumulo proteico nella cariosside. In quest'ottica, le vecchie varietà di frumento, soprattutto quelle sviluppate prima della Rivoluzione Verde, dovrebbero contenere una minore quantità di allergeni, oltre a rispondere meno alla concimazione azotata, essendo state concepite per permettere una produzione costante, sebbene non eccellente, in assenza di interventi di fertilizzazione.

Per poter rispondere, almeno in parte, a questa domanda, in questo lavoro abbiamo preso in considerazione due genotipi di frumento duro di recente rilascio, Svevo e Claudio, insieme a due genotipi, sempre di frumento duro, sviluppati prima degli anni '50, Senatore Cappelli e Urrià.

Le 4 varietà sono state coltivate per due annate in una sola località e sottoposte a tre regimi di concimazione azotata. La granella raccolta è stata quindi sottoposta a saggi ELISA utilizzando sieri di pazienti con allergie respiratorie al frumento e inoltre, sono stati analizzati parametri correlati con le proprietà tecnologiche degli impasti, così come è stata eseguita un'analisi proteomica relativamente alle proteine solubili, maggiormente coinvolte con le allergie respiratorie.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALE VEGETALE

Varietà di frumento duro di antica e nuova costituzione

Sono state prese in considerazione due varietà di frumento duro di antica costituzione, Senatore Cappelli e Urrù; e due varietà di nuova costituzione, Svevo e Claudio.

Le prime sono varietà che presentano caratteristiche di resa costante anche se non molto alta, e la cariosside è giallo ambra. Esse non richiedono interventi di fertilizzazione intensiva.

Le varietà di nuova costituzione sono state selezionate per l'alta produttività e per la qualità delle proteine, nonché per il notevole indice di giallo della semola. Esse richiedono interventi di concimazione.

3.2 SIERI UMANI

Per il test ELISA (paragrafo 4.5), sono stati usati i sieri di pazienti che presentavano allergie di tipo respiratorio. Questi sono stati raggruppati secondo i diversi tipi reazione sintomatiche (figura 18)

N° siero del paziente	Età	Sintomi
857	20	R
858	47	AT
863	41	AT
865	23	AT
1020	49	R+AT
1021	30	R+AT

Fig. 18: Sieri dei pazienti presi in considerazione, affetti da allergie di tipo respiratorio. AT :Asma; R: Rinite

3.3 CONCIMAZIONE AZOTATA

Sono stati utilizzati tre livelli d'azoto: N1, 30kg/ha; N2, 60kg/ha; N3, 90kg/ha. La concimazione azotata è stata effettuata sotto forma di Urea in due fasi successive, alla semina (60%) e in copertura (40%).

E' stata prima effettuata una concimazione di fondo con perfosfato triplo 2,17 q.li/ha, cioè 100U/ha P_2O_5 . La densità di semina adottata è stata di 180 kg/ha.

3.4 DISEGNO SPERIMENTALE IN CAMPO

La semina sperimentale si è svolta a Cesa (Arezzo), ed è stata effettuata dall'Università di Firenze (Prof. S. Benedettelli). E' stato utilizzato un disegno sperimentale *split-plot*: tre livelli di azoto (*main-plot*), quattro varietà di frumento duro, tre repliche biologiche(*sub-plot*) per ogni varietà in due annate (2010-2011 e 2011-2012).

In figura 19 e 10,viene schematizzata la parcella in pieno campo. Sono stata coltivate cinque varietà di frumento tetraploide, delle quali quattro di nostro interesse. Inoltre è stato applicato un riempimento (R) nel bordo della parcella; ogni fascia corrisponde ad un livello di azoto diverso (N1, N2, N3) e su ogni livello sono state realizzate tre repliche biologiche.

LIVELLI DI CONCIMAZIONE	R							
								4
2								1
	R	2	4	1	5	3	R	4
1								1
	R	1	3	2	4	5	R	4
3								1
	R	3	4	5	1	2	R	4
1								1
	R	5	3	1	2	4	R	4
3								1
	R	2	1	4	5	3	R	4
2								1
	R	4	5	3	2	1	R	4
3								1
	R	5	1	2	3	4	R	4
2								1
	R	3	4	5	1	2	R	4
1								1
	R	1	2	3	4	5	R	4
STRADA								61
1,44 1,44 1,44 1,44 1,44 1,44 1,44 10,08								

Fig. 19: Disegno eseguito in campo, nella località di Cesa, Provincia di Arezzo, annata 2010-2011.

LIVELLI DI CONCIMAZIONE	R	R	R	R	R	R	R	
								4
								1
1	R	1	3	5	4	2	R	4
		41	42	43	44	45		1
3	R	4	2	3	1	5	R	4
		40	39	38	37	36		1
P								1
2	R	2	3	4	5	1	R	4
		31	32	33	34	35		1
S								1
1	R	4	3	2	1	5	R	4
		26	27	28	29	30		1
A								1
2	R	1	5	4	2	3	R	4
		25	24	23	22	21		1
A								1
3	R	5	1	2	3	4	R	4
		16	17	18	19	20		1
								1
2	R	3	5	2	4	1	R	4
		11	12	13	14	15		1
								1
1	R	1	3	2	4	5	R	4
		10	9	8	7	6		1
								1
3	R	3	2	1	5	4	R	4
		1	2	3	4	5		1
								1
	R	R	R	R	R	R	R	4
	1,44	1,44	1,44	1,44	1,44	1,44	1,44	10,08

Fig. 20: Disegno eseguito in campo, nella località di Cesa, Provincia di Arezzo, annata 2011-2012.

3.5 ANALISI DEL CONTENUTO PROTEICO

3.5.1 Metodo CHN

E' stato eseguito in collaborazione con il gruppo del professore Stefano Benedettelli, della facoltà di Agraria dell'università di Firenze. In questa analisi sono state prese in considerazione le quattro varietà di frumento duro in esame, nei tre livelli d'azoto indicati sopra, nell'annata 2010-2011.

Da ogni parcella sono stati prelevati campioni rappresentativi di 40 g circa di granello, successivamente macinata con apposito mulino per l'ottenimento di farina integrale usata per l'analisi elementare dell'Azoto mediante analizzatore CHN (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Ogni campione è stato analizzato usando 3-4 mg di farina in apposite capsule di stagno, che vengono immessi in un reattore dove avviene la combustione rapida e completa ad una temperatura di 950 °C in eccesso di ossigeno. I gas prodotti dalla combustione del campione e contenenti carbonio, azoto e idrogeno (CO_2 , N_2 , H_2O vengono ridotti a N_2) passano in seguito in una colonna cromatografica dove avviene la separazione, e successivamente in un rilevatore a conducibilità termica che genera segnali elettrici i quali, opportunamente elaborati dal software EAGER 300, forniscono le percentuali di azoto, carbonio e idrogeno contenuti nel campione introdotto. Attraverso lo strumento, escluso il breve tempo di iniezione dell'ossigeno, viene mantenuto un flusso di elio.

Per ciascuna analisi sono state effettuate due letture. Il contenuto di proteine totali è stato poi determinato utilizzando 5,62 come fattore di conversione ed espresso come percentuale sulla sostanza secca.

3.5.2 Metodo NIR (Spettroscopia nel vicino infrarosso)

Questa analisi è stata eseguita sempre sulle quattro varietà ai tre livelli d'azoto, nelle due annate 2010-2011 e 2011-2012, in collaborazione con PSB (Produttori Sementi Bologna), utilizzando l'apparecchio "NIR Systems 6500", con la procedura consigliata dalla casa produttrice.

3.5.3 Analisi statistiche del contenuto proteico

E' stato utilizzato il programma *Statistica* (Statsoft), considerando diversi fattori a seconda dei parametri in studio per l'analisi della varianza (ANOVA).

Sono stati considerati due fattori: Varietà (4) e Trattamento azotato (3) nella sola annata 2010-2011, relativamente ai dati rilevati con il metodo CHN, mentre per i dati rilevati nelle due annate 2010-2011 e 2011-2012 attraverso il metodo NIR, è stata fatta un'ANOVA a tre vie, con il seguente disegno sperimentale: Annata (2), Trattamenti azotati (2), Varietà (4).

3.6 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DELLA CARIOSSIDE DI FRUMENTO

3.6.1 Estrazione delle subunità' gluteniniche

La frazione proteica corrispondente alle glutenine, composta da subunità ad alto peso molecolare (HMW-GS) e subunità a basso peso molecolare (LMW-GS), è stata estratta solo dalle farine delle varietà raccolte nell'annata 2010-2011, trattate con 30kg/ha e 90Kg/ha (N1 e N2).

Le gliadine e gli oligomeri gluteninici sono stati rimossi con propanolo 50% in proporzione 1:50 (mg:µl) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 10 minuti, il supernatante è stato eliminato. Questa procedura è stata ripetuta per altre 2 volte e infine il propanolo residuo è stato fatto evaporare mettendo il pellet in un evaporatore Savant per circa 5 minuti. Le subunità gluteniniche sono state estratte dal pellet in rapporto 1:5 (mg:µl) con Tris-HCl 80mM pH 8,5, propanolo 50%, DTT 1% per 30 minuti a 65°C. Dopo centrifugazione come descritto sopra, il supernatante contenente le proteine è stato alchilato con 4-vinildipiridina a concentrazione finale di 1,4% a 65°C per 30 minuti. Le proteine sono state successivamente fatte precipitare *overnight* in 50 volumi di Acetone freddo e centrifugati. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in un tampone di caricamento composto da: Tris-HCl 70mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerolo 10%, γ -pironina 0,02% e DTT 1%, centrifugato come descritto sopra e caricato in SDS-PAGE come descritto nel paragrafo 4.4.

3.6.2 Estrazione delle proteine metaboliche

Vengono pesati 150 mg di farina integrale e risospesi in rapporto 1:4 (mg:µl) nel tampone KCl (50mM Tris-HCL, 5mM EDTA, pH 7,8) e 1X di inibitori di proteasi (ROCHE). La sospensione è stata incubata per 15 minuti in ghiaccio con interruzione ogni 5minuti per agitare la soluzione e in seguito centrifugata (13000 rpm per 15 minuti a 4°C). La frazione solubile in KCl è stata precipitata in 5 volumi (v/v) di 0,1M Ammonio Acetato in metanolo freddo, il tutto eseguito a temperatura ambiente e poi lasciato *overnight* a -20°C. Il pellet contenente le proteine metaboliche o insolubili in metanolo è stato ottenuto dopo centrifugazione come descritto sopra. Il pellet è stato lavato 1 volta con acetone freddo, essiccato in evaporatore Savant e conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

3.6.3 Estrazione delle proteine cm- like

Il supernatante rimasto dopo avere eseguito il protocollo riportato nel paragrafo precedente, contiene le proteine chiamate CM-like, in quanto solubili in cloroformio e metanolo. Queste vengono fatte precipitare con Acetone freddo in rapporto 1:5 (v/v) *overnight* a -20°C e infine centrifugate a 13000 rpm per 15 min a 4°C. Il pellet così ottenuto viene lavato una volta con acetone freddo, essiccato in evaporatore Savant per 5 min, e conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo (Figura 21).

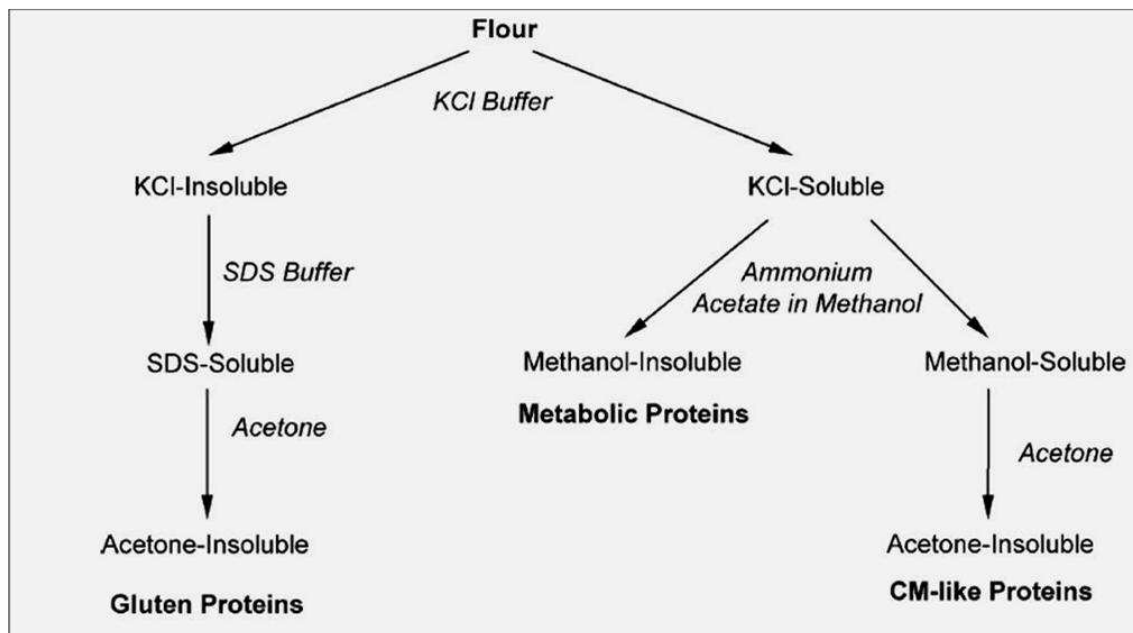


Fig. 21: Schema di estrazione delle proteine solubili e insolubili in metanolo (da Hurkman et al., 2004)

3.7 ANALISI DELLE PROTEINE

3.7.1 Saggio 2D Quanti Kit

Il saggio 2D Quanti Kit (GeHealthcare) è basato sul legame specifico di ioni rame alle proteine. Le proteine precipitate vengono risospese in una soluzione contenente rame e il rame non legato viene misurato con un agente colorimetrico. La densità colorimetrica è inversamente correlata alla concentrazione proteica. Il saggio ha una risposta lineare alle proteine, nell'intervallo di 0-50 mg. Questo kit è stato usato per avere un'accurata stima delle proteine prima di essere caricate in IEF.

Sei diluizioni (0-50 mg) di BSA fornita nel kit (2mg/ml) sono state utilizzate come standard. Cinque e dieci μ l di campione (contenente le proteine estratte e risospese in RB) sono state saggiati in ciascuna prova.

3.7.2 Saggio DC- protein

Il saggio *DC-Protein* (Bio-Rad), è un saggio colorimetrico per la concentrazione proteica, dopo la solubilizzazione in detergente, basato sulla reazione della proteina con una soluzione alcalina di tartrato di rame e reagente Folin. Questo kit è stato usato prima della marcatura DIGE, perché permette di evitare l'effetto d'interferenza del "*Lysis Buffer*" (paragrafo 3.10.1) ed è più efficiente del 2D Quanti Kit.

Per questa quantificazione, nove diluizioni (0-1,6) di BSA fornito nel kit (5mg/ml) sono stati usati come standard, e due differenti diluizioni del campione in *Lysis Buffer* (01:05, 01:10) sono stati testati.

3.8 TEST DI SEDIMENTAZIONE

Il test di sedimentazione viene utilizzato per ottenere indicazioni delle caratteristiche qualitative delle farine. Il metodo utilizzato è quello di Dick and Quick (1983).

E' stato pesato 1g di farina integrale per ogni varietà, relativamente ai livelli d'azoto N1 e N3, nelle annate 2010-2011 e 2011-2012.

La farina è stata messa in tubi di vetro, sono stati aggiunti 4ml di acqua distillata e mescolati, prima manualmente poi con il Vortex per 10 secondi alla massima velocità. Dopo un riposo di 5 minuti, e un nuovo passaggio sul Vortex di 2 secondi, e un ulteriore passaggio di riposo di 5 minuti, sono stati aggiunti 12 ml di soluzione contenente SDS2% e acido lattico 85%, e i tubi sono stati capovolti per 10 volte; dopo 20 minuti di riposo è stato misurato il volume di sedimentazione della farina (in mm), prendendo in considerazione il menisco formatosi tra il sedimento e la soluzione.

3.8.1 Analisi statistica per il test di sedimentazione

Sui dati ottenuti dal test di sedimentazione, per le due annate 2010-2011 e 2011-2012, nelle quattro varietà, con i due trattamenti azotati (N30 e N90), è stata fatta un'analisi della varianza a tre vie con il software *Statistica* (Statsoft).

3.9 ELETTROFORESI

3.9.1 SDS-PAGE per le subunità gluteniniche

Le frazioni corrispondenti alle subunità gluteniniche delle quattro varietà di frumento duro in studio, ottenute come descritto nel paragrafo 3.6.1, relative ai due livelli di azoto N1 e N3 dell'annata 2010-2011, sono state separate elettroforeticamente mediante SDS-PAGE per poi effettuare la relativa analisi densitometrica come riportato nel paragrafo 3.9.1.1.

Sono state analizzate 3 repliche tecniche (con tre cariche diverse) per ciascuna delle 3 repliche biologiche per le 4 cultivar per ciascun livello di azoto nella'annata 201-2011. E' stato utilizzato l'apparecchio SE 600 (Hoefer). Il *Main* gel aveva T=12 e C=1,28, mentre lo *Stacking* gel aveva T=3,67 e C=2,68. e in ogni gel è stato messo come standard un campione corrispondente a Svevo nel livello N1, replica biologica D4, dell'annata agricola 2010-2011 con un volume di 3µl, per poter eseguire appropriatamente l'analisi densitometrica, come riportato nel paragrafo 4.4.

La corsa è stata eseguita a 30mA per gel a 10°C. L'elettroforesi è stata fermata dopo 45 minuti dall'uscita del tracciante. I gel sono stati colorati con Coomassie R-G 250 (Sigma). I gel sono stati fissati con una soluzione contenete 30% di metanolo e 10% di acido acetico per 30 minuti in agitazione, e successivamente per 10 minuti con una soluzione contenete 30% di metanolo, infine colorati con Coomassie R-G 250 in 1% etanolo e 12% di TCA. Le immagini sono state acquisite col software EPSON Perfection V750 pro, con una risoluzione di 16 Bit e 300 dpi.

3.9.1.1 Analisi densitometrica

L'analisi densitometrica è stata eseguita sui gel monodimensionali con il software LabImage (KAPELAN Bio-Imaging Solutions).

Per evitare che possibili saturazioni nella colorazione delle bande inficiassero i risultati, sono state prima fatte delle prove che permettessero di stabilire la carica più appropriata da utilizzare. Perciò sono stati fatti i gel SDS-PAGE come descritto nel paragrafo 4.4, sui quali sono stati caricati diversi volumi di campione in modo crescente, con intervalli di 0,6 μ l (1, 7 μ l fino a 8,9 μ l). Dopo colorazione e acquisizione d'immagine come riportato nel paragrafo 3.9.1, i volumi rilevati dal software sono stati riportati in un grafico.

Inoltre, per evitare possibili problemi di diversità di carica, è stato utilizzato uno standard (varietà Svevo, replica biologica D4, nell'annata agraria 2010-2011, con un volume di 3 μ l), all'interno di ogni gel SDS-PAGE, che ha permesso di normalizzare i volumi relativi ad ogni gruppo di subunità (A, B, C).

Sono stati presi in considerazione i volumi relativi ad ogni gruppo di bande (A: "HMW-GS", B: "LMW-GS di tipo B", C: "LMW-GS di tipo C"). Successivamente, sono state calcolati i rapporti e i valori di percentuali dei diversi gruppi.

Rapporti calcolati : HMW/LMW(B); HMW/LMW(B+C);

Percentuali dei diversi gruppi: $\text{HMW} / (\text{HMW} + \text{LMW (B+C)})$; $\text{LMW(B)} / (\text{HMW} + \text{LMW (B+C)})$; $\text{LMW(C)} / (\text{HMW} + \text{LMW (B+C)})$; $\text{LMW(B+C)} / (\text{HMW} + \text{LMW (B+C)})$.

3.9.1.2 Analisi Statistiche nelle subunità gluteniniche

L'analisi della varianza sia per i diversi rapporti calcolati sia per la quantificazione delle diverse subunità, è stata realizzata considerando sempre gli stessi fattori: Varietà (4), Trattamento azotato (2), annata (1), con il software *Statistica* (Statsoft).

3.10 ANALISI BIDIMENSIONALE (2DE)

In tutte le analisi bidimensionali sono state utilizzate le strip da 18 cm (GE Healthcare) con range di pH 3-10.

L'IEF è stato eseguito nell'apparecchio IPGphor II (GE Healthcare) eseguendo un programma diverso per ogni frazione proteica (metaboliche e CM-like), riportato nei rispettivi paragrafi dedicati. Prima dell'SDS-PAGE, le strip sono state equilibrate per 15 minuti in 100mM Tris pH 6,8, 30% glicerolo, 8 M Urea, 1% SDS, 1% DTT, 0,2 mg/ml blu di bromofenolo e dopo per altri 15 minuti in 100mM Tris pH 6,8, 30% glicerolo, 8 M Urea, 1% SDS, 2,5% IAA, 0,2 mg/ml blu di bromofenolo sull'agitatore, a velocità bassa. Le strip sono state caricate su i gel di poliacrilammide di 20x20 cm e 1 cm di spessore, con T=15% e C= 1,2%. Le strip sono state bloccate sopra i gel con l'aggiunta di una soluzione contenente 1% di agarosio in tampone di corsa SDS e blu di bromofenolo. I gel sono stati fatti correre nell'apparecchio PROTEAN Plus Dodeca Cell (Bio-Rad), prima per 10 minuti a 20 mA per gel, e poi per 6-7 ore a 40 mA per gel, fino a dopo 15 minuti dell'uscita del fronte a 10°C.

Il tampone di corsa usato (*Running Buffer*) contiene 25mM Tris pH 8,3, 192 mM glicina e 0,1% SDS. Come descritto prima, la corsa è stata condotta per 12 gel contemporaneamente.

3.10.1 Proteine metaboliche

Dato che le proteine metaboliche sono molto numerose, in questo caso abbiamo utilizzato la tecnologia DIGE, che permette di eseguire analisi complesse in minor tempo.

E' stato applicato lo schema classico a tre cianine (CyDye). Questa tecnica è progettata per semplificare il rilevamento e l'identificazione delle proteine usando la tecnica 2-DE e così permettere la separazione fino a tre campioni diversi nel gel 2-D. Ognuno dei tre campioni proteici sono stati marcati con un diverso CyDye. Dopo la marcatura i tre campioni sono stati messi insieme per la corsa sulla stessa IEF strip e gel SDS-PAGE. La possibilità di avere diversi campioni sullo stesso gel fa sì che questi siano soggetti alle stesse condizioni sperimentali, e questo aiuta a superare la variazione sperimentale, che negli esperimenti di elettroforesi 2-D è dovuta principalmente alla variazione tra gel. Infine ogni singolo campione è stato visualizzato in modo indipendente, selezionando la lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione per ciascun CyDye.

L'esecuzione di campioni multipli su un singolo gel riduce il numero di gel richiesti per produrre lo stesso numero di dati. Nella DIGE, viene usato uno Standard Interno presente all'interno di tutti i gel dell'esperimento. Lo Standard Interno è generato dal *pool*

di tutti i diversi campioni dell'esperimento in un'unica aliquota, che è quindi lo stesso in tutti i gel. Ciò permette di avere un'elaborazione statistica più affidabile.

Il pellet contenente le proteine metaboliche ottenuto secondo quanto descritto nel paragrafo 3.6.2, è stato risospeso in 500 μ l di *Lysis Buffer* (8M Urea, 10 mM Tris HCl, 5 mM Acetato di Magnesio, pH 8,8) e le impurità sono state rimosse usando il 2-D Clean – Up Kit (GEHealthcare) seguendo il protocollo della casa produttrice.

Tutti i campioni sono stati solubilizzati di nuovo nel tampone di *Lysis Buffer* ad una concentrazione proteica finale compresa tra 5,5 e 7,0 mg/ml. I campioni sono stati marcati con i CyDye (Cy2, Cy3 e Cy5, GE Healthcare) seguendo il protocollo della casa produttrice.

Cinquanta μ g di proteina sono stati marcati con 200 pmol di CyDye, disciolte in dimetilformamide anidra. La miscela di reazione è stata incubata in ghiaccio al buio per 30 minuti e terminata successivamente con l'aggiunta di 10nmol di lisina. Volumi uguali di tampone 2X (7M Urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 20 mg/ml DTT e 2% IPG 3-10) sono stati aggiunti a ciascun campione proteico marcato e poi i tre campioni sono stati riuniti. In seguito, il tampone di reidratazione (7M Urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 2 mg/ml di DTT e 1% di IPG 3-10) è stato aggiunto per portare a volume 340 μ l prima dell'IEF.

Il disegno sperimentale, che prevede che ogni campione venga marcato con le due cianine alternate, è riportato nella figura 22.

Gel	Cy3	Cy5	Cy2
1	Svevo N ₁	Svevo N ₃	Pooledsamples
2	Svevo N ₁	Svevo N ₃	Pooledsamples
3	Svevo N ₃	Svevo N ₁	Pooledsamples
4	Claudio N ₁	Claudio N ₃	Pooledsamples
5	Claudio N ₃	Claudio N ₁	Pooledsamples
6	Claudio N ₃	Claudio N ₁	Pooledsamples
7	Urrìa N ₁	Urrìa N ₃	Pooledsamples
8	Urrìa N ₃	Urrìa N ₁	Pooledsamples
9	Urrìa N ₁	Urrìa N ₃	Pooledsamples
10	Senatore N ₁	Senatore N ₃	Pooledsamples
11	Senatore N ₃	Senatore N ₁	Pooledsamples
12	Senatore N ₁	Senatore N ₃	Pooledsamples

Fig.25: Disegno sperimentale (DIGE). N₁: livello 1 di concimazione azotata; N₃: livello 3 di concimazione azotata.

Le strip IPG lineari (lunghe 18 cm) sono state reidratate con i campioni proteici marcati con CyDye per 12 h a 20°C, al buio e la focalizzazione è stata eseguita a 20°C con il seguente programma: 200 V per 8h, 300 V per 3h, 3500 V in gradiente per 30 minuti, 3500 V per 3,5h, 8000V per 8h; per un totale di 92 KVh usando il IPGphorTM Isoelectric Focusing System (GE Healthcare). Successivamente le strip sono state equilibrate e fatte correre nei gel SDS-PAGE.

Le proteine marcate sono state visualizzate con Quantity One (Bio-Rad). Successivamente con lo scanner Pharos FX Molecular Imager® System (Bio-Rad) le immagini Cy3 sono state scannerizzate con un laser 532 nm e un band pass 580nm (BP). Le immagini Cy5 sono state acquisite utilizzando un laser 635 nm ed un band pass di 670nm (BP). Le immagini Cy2 sono state scannerizzate utilizzando un laser 488nm ed un band pass 530(BP). Tutti i gel sono stati sottoposti a scansione con una risoluzione di 100 µm. La PMT (*Photo Multiplier Tube*) è stata impostata per garantire la massima intensità di pixel (*Medium intensity*).

L'analisi dei gel è stata eseguita col SameSpot ProGenesis ver. 4.5 (Nonlinear Dynamics, UK) con il pacchetto specifico per la DIGE. I dati sono stati normalizzati all'interno del software utilizzando lo Standard Interno.

3.10.2 Proteine CM-like

L'analisi proteomica su questa frazione è stata effettuata attraverso la tecnica tradizionale 2D-PAGE con colorazione in Coomassie Blu. Questo perché il minor numero di polipeptidi presenti permetteva di effettuare un'analisi più dettagliata in tempi ristretti.

I polipeptidi corrispondenti alla frazione CM-like delle quattro varietà ai livelli azotati N1 e N3, ottenuta come descritto nel paragrafo 3.6.3, sono stati solubilizzati in 800 µl di soluzione di reidratazione (RB) contenente 7M Urea, 2M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) Triton X100, 1,2% (v/v) *Destreak reagent* (GE Healthcare) e 0,5% (v/v) IPG Buffer pH 3-10. Le strip sono state reidratate *overnight* a 20°C con 274 µl di soluzione contenente circa 200 µg di proteine e l'aggiunta di 66 µl di RB (*Rehydration Buffer*). La focalizzazione è stata eseguita a 20°C per 80KVh (200 V 4h, 500 V 2,5 h, 1000 V 3h, 5000 V 2 h, 8000 V in gradiente 0,5 h, 8000 V 8,5 h), usando il IPGphorTM Isoelectric Focusing System (GE Healthcare). Le strip sono state successivamente equilibrate come descritto sopra. La seconda dimensione è stata eseguita come descritto prima.

Tre repliche tecniche sono state eseguite per ogni replica biologica in ogni trattamento, dando un totale di 72 gel.

I gel sono stati colorati *overnight* con una soluzione contenente 100gr/L di ammonio solfato, 1gr/L di Coomassie G 250, 11% di acido fosforico e 20% di metanolo (Neuhoff et al, 1988). Successivamente sono stati decolorati con 3 lavaggi in acqua distillata prima di acquisire l'immagine. Tutti i gel sono stati scansionati con EPSON Perfection V750 pro, con una risoluzione di 16 Bit e 300 dpi.

I 18 gel (3 repliche biologiche x 3 repliche tecniche x 2 trattamenti azotati) relativi a ciascuna delle 4 varietà, sono stati analizzati con SameSpot ProGenesis ver. 4.5. che fornisce anche l'analisi della varianza (ANOVA) e il FDR (False Discovery Rate $\leq 0,05$), nonché la PCA (Principle Component Analysis, secondo O'Gorman et al., 2007). Solo gli spot con valore di p e q più bassi di 0,05, e con un potere superiore al 80%, sono stati considerati come differenzialmente espressi.

3.10.3 Spettrometria di massa e identificazione delle proteine

Gli spot risultati differenzialmente espressi, sia nella frazione CM-like, sia della metabolica, sono stati prelevati dai gel, tagliandoli manualmente, e sono stati lavati tre volte con acqua ultrapura. Sono stati quindi disidratati con ACN, trattati con 10 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 per 40 min a 56°C, e poi alchilati con iodoacetamide 55mM in 50 mM NH_4HCO_3 per 40 minuti al buio. Infine sono stati reidratati in ghiaccio con una soluzione 1 pmol di tripsina (Sigma) in 50 nM NH_4HCO_3 , e incubati a 37°C *overnight*. I peptidi sono stati estratti due volte consecutive da ogni spot, utilizzando 50 mM NH_4HCO_3 , FA (Acido Formico) 5% e poi riuniti. Dopo estrazione dagli spot, i peptidi sono stati purificati con Supeltip C18 (SIGMA, Aldrich) secondo le istruzioni della casa produttrice, ed essiccati sotto vuoto a temperatura ambiente per poi essere risospesi in 10% di FA.

I peptidi sono stati prima separati cromatograficamente con una colonna Phenomenex Aeris peptide (Tecnologia *core-shell*) C18, 150mm X 2.1mm, particelle 3,6 μm . La fase mobile consisteva di una soluzione al 99.9% d'acqua e acido formico 0,1% (v/v; soluzione A) e acetonitrile al 99% e acido formico 0,1% (v/v; soluzione B). La separazione è avvenuta con un gradiente da 8% a 80% tampone della soluzione B a flusso costante di 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ per 45 minuti. I peptidi eluiti sono stati ionizzati con lo spettrometro

di massa Electrospray LTQ-XL (Thermo Fisher) in collaborazione con il CRA, Fiorenzuola d'Arda (PC). Le analisi sono state eseguite in modalità ioni positivi; la potenza HV è stata impostata tra 1,8 e 2,0 KV. Sono state prese in considerazione le scansioni degli spettri di massa che andavano da 350-1400 Da m/z e, per ogni spettro MS, i due picchi più intensi di ioni doppiamente e triplamente carichi sono stati selezionati automaticamente per la frammentazione. Gli spettri MS-MS sono stati elaborati e analizzati con il software Proteome Discoverer 1.0 (Thermo Fisher) e la ricerca è stata condotta mediante SEQUEST nel database Uniprot in piante e frumento.

Per identificare una proteina senza ambiguità, sono stati utilizzati i seguenti criteri: la copertura della sequenza > 10%, almeno due peptidi indipendenti ($X_{corr} > 2,0 +2$ cariche e $X_{corr} > 2,5 +3$ cariche), una tolleranza di 1Da e massimo due siti di digestione non corretta della tripsina. L'ossidazione (M) è stata selezionata come modificazione variabile e la carbamidometilazione della cisteina come stabile.

3.11 TEST ELISA

Il test Elisa è stato eseguito mediante la strumentazione Biomek® NXP Laboratory Automation Workstation presso l'INRA di Nantes (Francia). I pozzetti delle micropiastre (NucMaxiSorp 384 pozzetti) sono stati ricoperti con 20 μ l con un antigene diluito a 5 μ g/ml in 100mM di tampone carbonato (pH 9.6) per 2h a temperatura ambiente. Una curva standard è stata fatta con diluizione in serie da 160ng/ml a 0,07 ng/ml delle IgE standard (Bodinier *et al.*, 2008). Le piastre sono state bloccate con PBS-0,1% Tween 20 e 0,5% di gelatina suina (G2500 SIGMA) per 1h a 37°C. Dopo tre lavaggi con PBS-0,1% Tween 20, le micropiastre sono state incubate con i sieri dei pazienti diluiti a 1:10 con 0,5% di gelatina/PBS/Tween per 15 h a 37°C. Anticorpi Goat anti-human IgE (A3525 - SIGMA) diluiti a 1:500 in 0,5% G-PBST sono stati incubati per 2h a 37°C. Infine, il substrato fluorescente (4-metilumbelliferil fosfato SIGMA) diluito in rapporto 1:5 in 1M Tris/HCl pH 9.8, è stato aggiunto mantenendo il tutto per 90 minuti a temperatura ambiente e al buio. La fluorescenza è stata misurata a 440 nm (eccitazione a 360 nm) e la concentrazione delle IgE specifiche legate all'antigene è stata calcolata con riferimento alla curva standard delle piastre. I dati di fluorescenza relativi a ogni frazione analizzata sono stati calibrati tenendo in considerazione la fluorescenza di base. Sono state eseguite tre repliche in tre pozzetti di controllo con 10 mM Metanolamide in carbonato, per ogni antigene

e siero. La corrispondente concentrazione degli IgE specifici è stata calcolata in base alla curva standard.

3.11.1 Analisi Statistiche dei Test ELISA

Sui dati riportati dal test ELISA, sia per la frazione metabolica sia per la frazione CM-like, in ogni paziente, è stata calcolata l'ANOVA a due vie, prendendo come fattori di studio varietà (4) e Trattamento azotato (3). L'analisi è stata condotta con il software *Statistica* (Statsoft).

4 RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 ANALISI DEL CONTENUTO PROTEICO MEDIANTE CHN

Relativamente al raccolto del primo anno (annata 2010-11), è stato misurato il contenuto proteico di tutti i campioni relativamente ai tre livelli di azoto saggiati.

Nella Tabella 1 (e in figura 23) viene riportata la media dei valori del contenuto proteico degli sfarinati nelle quattro varietà considerate relativamente ai tre livelli di concimazione azotata, mentre nella Tabella 2 viene riportata la relativa ANOVA bifattoriale.

VARIETA	N1	ES	N2	ES	N3	ES
Urrìa	13,12	0,31	13,45	0,78	13,73	0,55
Senatore Cappelli	14,75	0,60	13,79	0,32	16,58	0,46
Svevo	11,66	0,64	12,43	0,21	13,13	0,59
Claudio	10,83	0,09	11,72	0,15	12,31	0,39

Tab.1:Media dei contenuti proteici totali. Varietà di vecchia costituzione (Urrìa e Senatore Cappelli) e varietà di nuova costituzione (Svevo e Claudio) saggate ai tre livelli di azoto N1, N2 e N3. ES (errore standard)

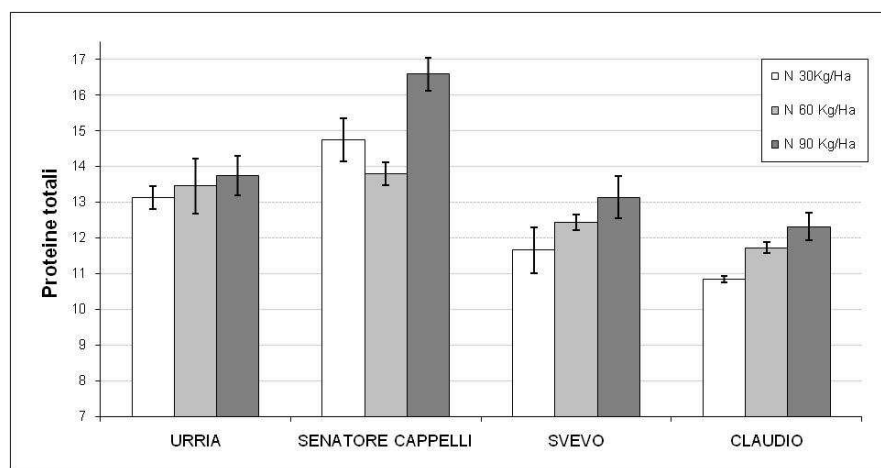


Fig. 23: Istogrammi che mostrano l'andamento medio del contenuto proteico totale nei quattro genotipi, Urrìa, Senatore Cappelli, Svevo, Claudio; sottoposti ai tre livelli di azoto 1 = 30kg/ha, 2 = 60 Kg/ha, 3 = 90Kg/ha.

Mentre le varietà Svevo, Claudio e Urrìa rispondono in modo atteso alla concimazione azotata, in quanto il contenuto proteico aumenta proporzionalmente, nella varietà Senatore Cappelli si osserva un valore non atteso (una diminuzione del contenuto

proteico totale) nel livello intermedio di concimazione azotata rispetto al valore di partenza (N1), che però aumenta notevolmente nel livello N3.

PROTEINE TOTALI	
Varietà (V)	**
Trattamento azotato (T)	***
V x T	N.S

Tab.2: ANOVA bifattoriale. NS (non significativo), ** (significativo a $p < 0.01$); *** (significativo a $p < 0.001$)

L'ANOVA mostra che, sebbene la differenza tra varietà risulti significativa e quella tra le diverse dosi di azoto sia altamente significativa, l'interazione tra i due fattori non è significativa.

Pertanto, sono stati confrontati i valori medi di contenuto proteico separatamente per ciascuno di questi fattori. I valori relativi alle varietà sono riportati in Tabella 3, mentre quelli relativi alla dose di azoto sono riportati in Tabella 4.

Varietà	Media	ES
Urrìa	13,44	0,30 b
Senatore Cappelli	15,04	0,47 a
Svevo	12,41	0,33 c
Claudio	11,62	0,25 c

Tab.3: Valori medi del contenuto proteico di ogni varietà per tutti i tre livelli di azoto. LDS (Least significant difference) $p < 0.05$. ES (errore standard). Le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei; all'interno della colonna ES i valori seguiti dalla stessa lettera non presentano differenze significative.

Il valore medio più alto di contenuto proteico totale è presente nella varietà Senatore Cappelli, seguito da Urrìa, Svevo e Claudio, sebbene questi ultimi due appartengano allo stesso gruppo di omogeneità.

Livello N	Media	ES
N1	12,59	0,49 b
N2	12,85	0,31 b
N3	13,94	0,53 a

Tab.4: Valori medi del contenuto proteico relativi ai tre livelli di azoto, 30 Kg/ha (livello 1), 60 Kg/ha (livello 2), 90 Kg/ha (livello 3).LDS (Least significant difference) $p < 0.05$. ES (errore standard). Le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei; all'interno della colonna ES i valori seguiti dalla stessa lettera non presentano differenze significative.

Per quanto riguarda i valori medi del contenuto proteico relativamente ai tre livelli di azoto (Tab. 4), non si osserva una differenza significativa tra i primi due trattamenti (N1 e N60), mentre è significativa la differenza tra N3 e gli altri due livelli.

E' evidente che le varietà di antica costituzione presentano un contenuto proteico superiore rispetto a quelle di nuova costituzione, tanto che la differenza tra antiche e nuove varietà, sulla base di tale parametro, risulta altamente significativa (Tabella 5). Anche la differenza tra varietà antiche risulta altamente significativa, mentre solo significativa è la differenza tra le varietà di nuova costituzione. Questa differenza è attesa in quanto le varietà di nuova costituzione presentano una maggiore uniformità genetica rispetto a quelle di antica, altamente variabili.

Fattori	SS	GDL	F	Sign
Antiche vs Nuove	44,47842	1	80,93571	**
Tra antiche	11,57422	1	21,06117	**
Tra nuove	2,772013	1	5,044128	*

Tab.5: ANOVA relativa alle varietà di antica e nuova costituzione: Antiche vs Nuove (Senatore Cappelli e Urrià vs Svevo e Claudio), Tra Antiche (Senatore Cappelli vs Urrià), Tra Nuove (Svevo vs Claudio), SS (devianza), GDL(Gradi Di Libertà), F(Test Fisher). Sign (significatività):* : $P < 0.05$ significativo ** : $P < 0.01$ molto significativo.

L'analisi complessiva dei dati relativi al contenuto proteico misurato nei campioni relativi al primo anno di raccolta, pertanto, conferma il ruolo della fertilizzazione azotata nell'influenzare l'incremento del contenuto proteico (Ercoli *et al.*, 2012), sebbene le differenze siano più evidenti tra il livello più basso e quello più alto di concimazione azotata.

Inoltre, sebbene sia necessario analizzare anche i dati relativi al secondo anno di raccolta per fare delle conclusioni più affidabili, i dati del primo anno indicano che le varietà di antica e nuova costituzione rispondono in modo diverso alla concimazione azotata. Questa osservazione era attesa, in quanto è noto che le varietà di nuova costituzione siano state costituite per poter rispondere in modo significativo alla concimazione azotata, mentre le antiche varietà furono costituite prevalentemente per fornire una qualità e produttività costanti, sebbene non eccellenti.

In questo caso specifico, il maggior contenuto proteico osservato nelle varietà di antica costituzione, in tutte le condizioni prese in esame, non è necessariamente correlato con le migliori proprietà tecnologiche (è noto che le varietà antiche presentino parametri qualitativi non eccellenti), perché nelle varietà antiche non è stata effettuata una selezione sul tipo di proteine costituenti il glutine, caratteristica fondamentale nelle varietà odierne per permettere la formazione di impasti con proprietà tecnologiche adeguate, ma solo sulla capacità di accumulare un quantitativo sufficiente di proteine per garantire una qualità di base.

4.2 ANALISI DEL CONTENUTO PROTEICO MEDIANTE NIR

La disponibilità della strumentazione NIR presso la Società Produttori Sementi Bologna (PSB) ha permesso di ripetere le analisi del contenuto proteico sui campioni del primo anno e di effettuarle anche sul secondo anno.

Come è evidente dalla figura 24, esiste una correlazione molto significativa tra i valori di contenuto proteico ottenuti con il metodo NIR e quelli ottenuti precedentemente con il metodo CHN, relativamente ai campioni della prima annata (2010-2011).

Data tale correlazione, e la maggiore velocità di analisi del NIR rispetto al CHN, i campioni del secondo anno sono stati analizzati solo col NIR. Inoltre, dato che i dati del primo anno precedentemente effettuati avevano mostrato che non vi era differenza significativa tra i primi due livelli di azoto, per il secondo anno (e per le analisi successive) sono stati presi in considerazione solo i due livelli di azoto estremi (N1e N3).

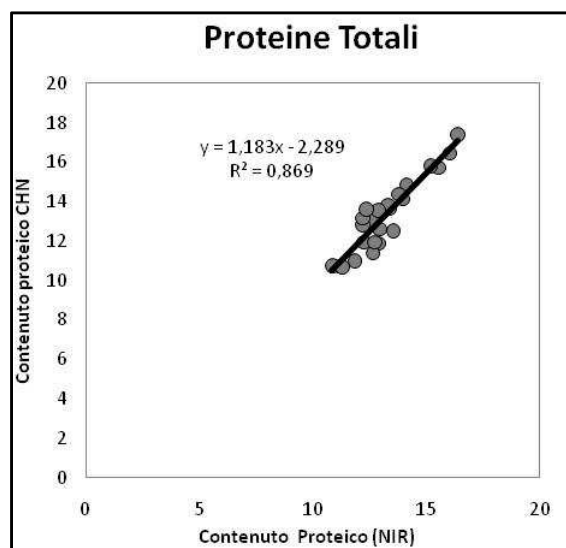


Fig.24: Correlazione del contenuto proteico calcolato mediante il metodo NIR e CHN su tutte le varietà nell'annata 2010-2011

I dati ottenuti con il NIR relativi al contenuto proteico totale delle quattro varietà in studio (V), ai due trattamenti azotati (T) nelle due annate di raccolta (A), hanno permesso di effettuare un'ANOVA a tre vie.

Tale analisi, i cui risultati sono riportati in Tabella 6, ha mostrato una non significatività della tripla interazione, così come non è risultata significativa l'interazione tra la varietà e il trattamento. Sono invece risultate significative le interazioni tra varietà e annata e tra trattamento e annata.

Fattori	SS	GDL	F	Sign
Varietà (V)	55,047	3	54,16	***
Trattamento (T)	28,352	1	83,69	***
Anno (A)	14,355	1	42,37	***
VxT	2,709	3	2,67	NS
VxA	3,773	3	3,71	*
TxA	1,706	1	5,04	*
VxTxA	1,722	3	1,69	NS
Errore	10,841	32		

Tab.6: ANOVA relativa ai dati di contenuto proteico (mediante NIR) nelle 4 varietà raccolte in due annate e sottoposte a due trattamenti azotati. Varietà confrontate: Svevo, Claudio, Senatore Cappelli, Urria. Trattamento azotato: N1 e N3. SS (devianza), GDL (Gradi Di Libertà), F (Test Fisher). Sign: NS (non significativo), * (significativo a $p < 0.05$), *** (significativo a $p < 0.001$)

Nella figura 25 vengono riportate le medie dei trattamenti in ogni varietà per ogni anno, data l'interazione osservata tra varietà e annata. Da ciò è chiaro che nell'annata 2011 tutte le varietà hanno risposto con un valore di contenuto proteico più alto rispetto all'annata 2010; inoltre si osserva che le varietà di nuova costituzione (Claudio e Svevo) hanno una differenza di risposta più marcata nei due anni rispetto alle varietà di antica costituzione (Senatore Cappelli e Urrìa).

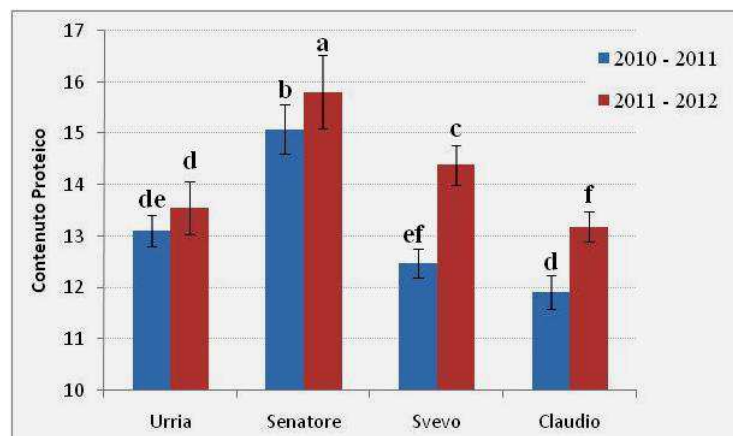


Fig.25: Valori medi del contenuto proteico (relativi all'interazione osservata tra varietà e annata). LDS (Least significant difference) $p < 0.05$. Le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei, i valori seguiti dalla stessa lettera indicano differenze non significative. Varietà di nuova costituzione (Claudio e Svevo). Varietà di antica costituzione (Senatore Cappelli e Urrìa).

Data l'interazione osservata tra trattamento e annata, nella figura 26 vengono riportate le medie dei trattamenti relative a ciascun anno. Si osserva che, nel trattamento N3 si ottiene un valore superiore del contenuto proteico in entrambi gli anni. Inoltre, anche in questo caso, per l'annata 2011-2012 si osserva un aumento del valore del contenuto proteico rispetto all'annata precedente (2010-2011).

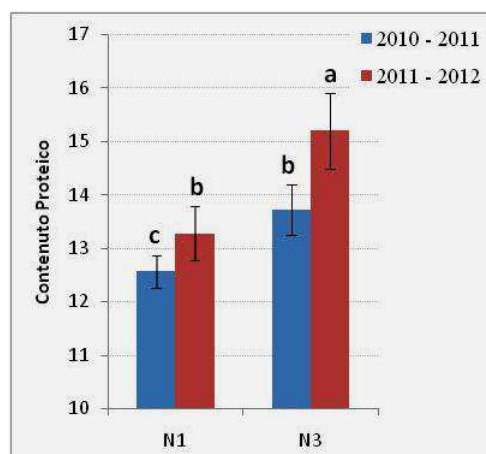


Fig.26: Valori medi del contenuto proteico (relativi all'interazione osservata tra trattamento e annata). LDS (Least significant difference) $p < 0.05$. Le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei, i valori seguiti dalla stessa lettera indicano differenze non significative.

4.3 TEST DI SEDIMENTAZIONE CON SDS (SDS-ST)

Il test del volume di sedimentazione è comunemente usato come un indicatore di qualità del glutine (in particolare la forza). Esso è influenzato da diversi parametri, tra cui il contenuto proteico e le dimensioni e la quantità dei polimeri gluteninici.

Vi sono diversi modi di effettuare il test di sedimentazione (Pinckney AJ *et al.*, 1957; Eckert B. *et al.*, 1993). Nel nostro caso, abbiamo utilizzato il test di sedimentazione in presenza di SDS e acido lattico, secondo Dick and Quick (1983).

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) a tre fattori: Varietà (Claudio, Senatore Cappelli, Svevo e Urrià) x Livello di azoto (N1 e N3) x Annata (2010-2011 e 2011-2012).

Anche in questo caso, così come nelle analisi successive (tranne nel caso dell'ELISA), si è ritenuto opportuno prendere in considerazione solo i due livelli estremi di concimazione azotata, data la differenza non significativa riscontrata tra i primi due livelli (vedi paragrafo 4.1).

Come si evince dalla Tabella 7, non sussiste alcuna interazione tra i fattori analizzati. Sono invece state rilevate differenze significative tra le varietà e tra le due annate. Non è stato invece riscontrato alcun effetto in relazione alla dose di azoto.

	SS	GDL	F	
Varietà (V)	34,518	3	200,14	***
Trattamento (T)	0,093	1	1,61	NS
Annata (A)	9,532	1	165,80	***
VxT	0,020	3	0,12	NS
VxA	0,130	3	0,75	NS
TxA	0,064	1	1,12	NS
VxTxA	0,465	3	2,70	NS
Errore	4,599	80	0,057	

Tab.7: ANOVA. Varietà confrontate: Svevo, Claudio, Senatore Cappelli, Urrià, Annata (2010 e 2011), Trattamento azotato (N1 e N3), SS (devianza), GDL (Gradi Di Libertà), F (Test Fisher). NS (non significativo), *** (significativo a $p < 0.001$)

In tabella 8 si riportano i valori medi di sedimentazione riguardo a ciascuna varietà e ciascuna annata.

	Media	ES
Varietà		
Urrìa	3,18	0.08 d
Senatore Cappelli	3,49	0.09 c
Claudio	4,34	0,09 b
Svevo	4.64	0.08 a
Annata		
2010	4.23	0.09 a
2011	3.60	0.10 b

Tab.8: Valori medi di sedimentazione (in cm).LDS (Least significant difference) $p < 0.05$. Le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei, i numeri seguiti dalla stessa lettera indicano i valori che non presentano differenze significative tra loro.

Da ciò si evince che le varietà di antica costituzione (Urrìa e Senatore Cappelli) presentano un valore medio di sedimentazione inferiore a quello riscontrato nelle varietà di nuova costituzione. Ciò era atteso in quanto è noto che le varietà di nuova costituzione sono state migliorate, non tanto per la capacità di accumulare proteine, ma quanto per il tipo di proteine presenti, che determina migliori caratteristiche tecnologiche. Inoltre, la varietà Svevo è quella che ha mostrato in assoluto il valore più elevato. Infine, nella annata 2011-2012 i valori del parametro in studio sono stati inferiori rispetto a quelli dell'annata precedente.

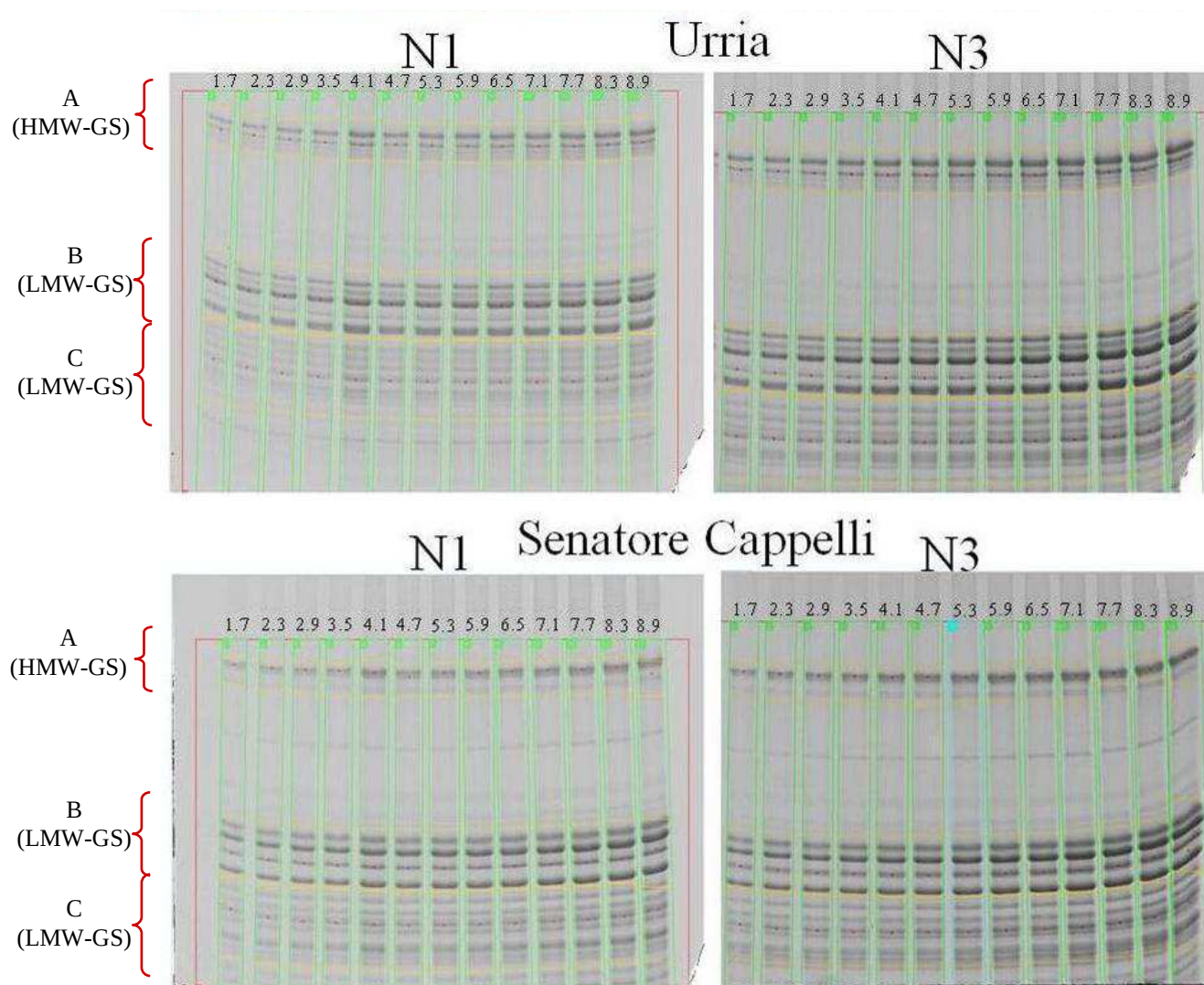
Questi dati ci indicano che il test di sedimentazione in presenza di SDS e acido lattico è maggiormente influenzato dalla “qualità” delle proteine piuttosto che dal contenuto proteico, essendo le varietà di antica costituzione, più ricche in proteine (come riportato nel paragrafo 4.1), e che pertanto la concimazione azotata, da sola, non ha un'influenza significativa sul valore del test di sedimentazione.

4.4 ANALISI ELETTROFORETICA DELLE SUB UNITÀ GLUTENINICHE

Poiché la frazione gluteninica è quella maggiormente correlata con le proprietà reologiche degli impasti, e in particolare, la quantità di glutenine, così come il rapporto HMW-GS/LMW-GS, tali parametri sono stati calcolati attraverso l'analisi densitometrica delle diverse subunità gluteniniche separate attraverso SDS-PAGE.

Prima però di effettuare il calcolo di questi parametri, si è reso necessario stabilire le cariche appropriate per effettuare l'analisi densitometrica.

Nella figura 27 vengono riportati i gel elettroforetici delle subunità gluteniniche impiegati per effettuare tale calibrazione.



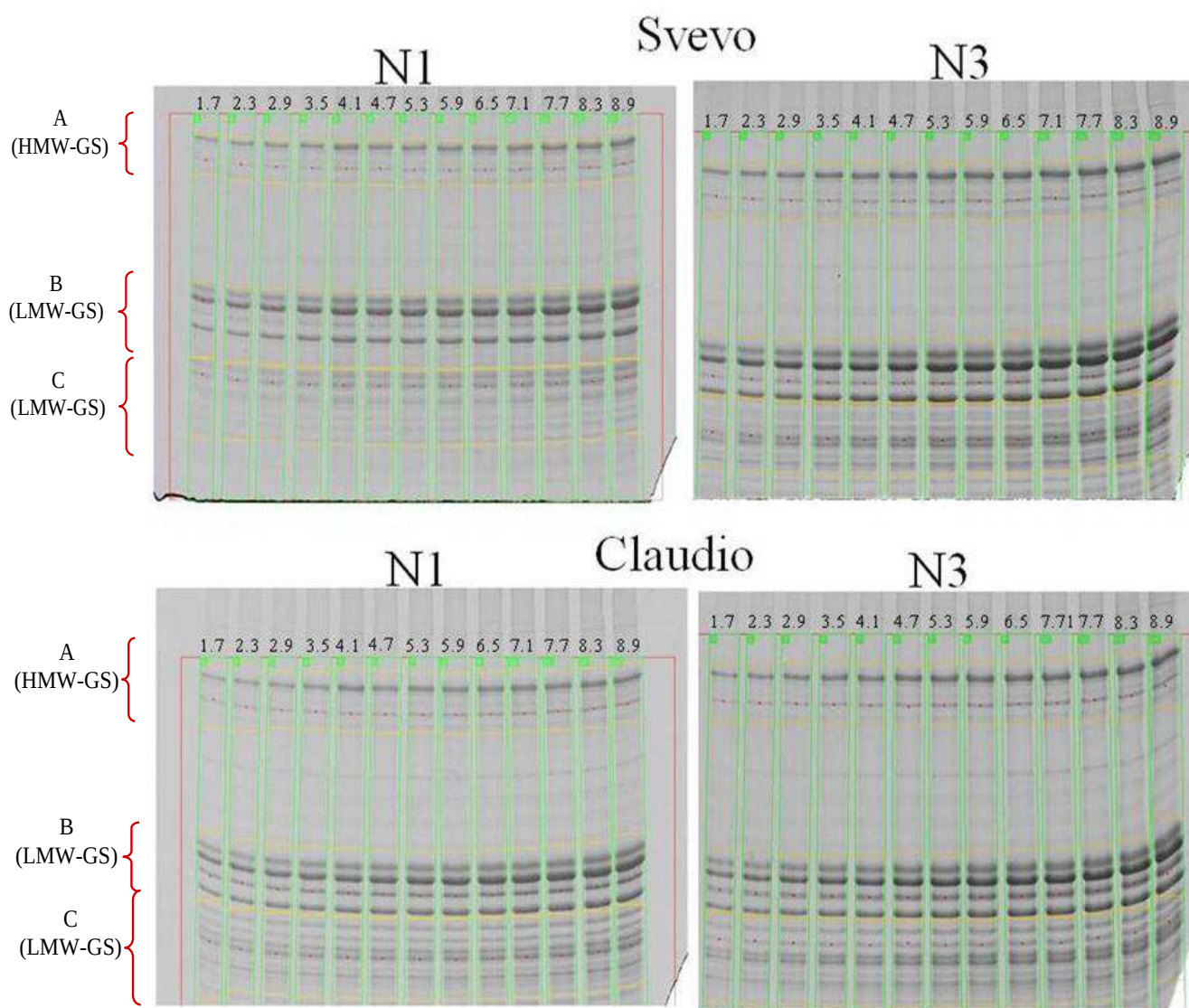


Fig. 27: Determinazione della carica appropriata per effettuare le analisi densitometriche mediante SDS-PAGE delle subunità gluteniniche. Varietà di antica costituzione Urria e Senatore Cappelli; Varietà di nuova costituzione Svevo e Claudio, N1, N3, A (HMW -GS) subunità gluteniniche ad alto peso molecolare, B (LMW-GS) subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo B, C (LMW-GS) subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo C, 1.7...- 8.9 μ l (diluizioni della frazione estratta, con intervalli di 0.6 μ l)

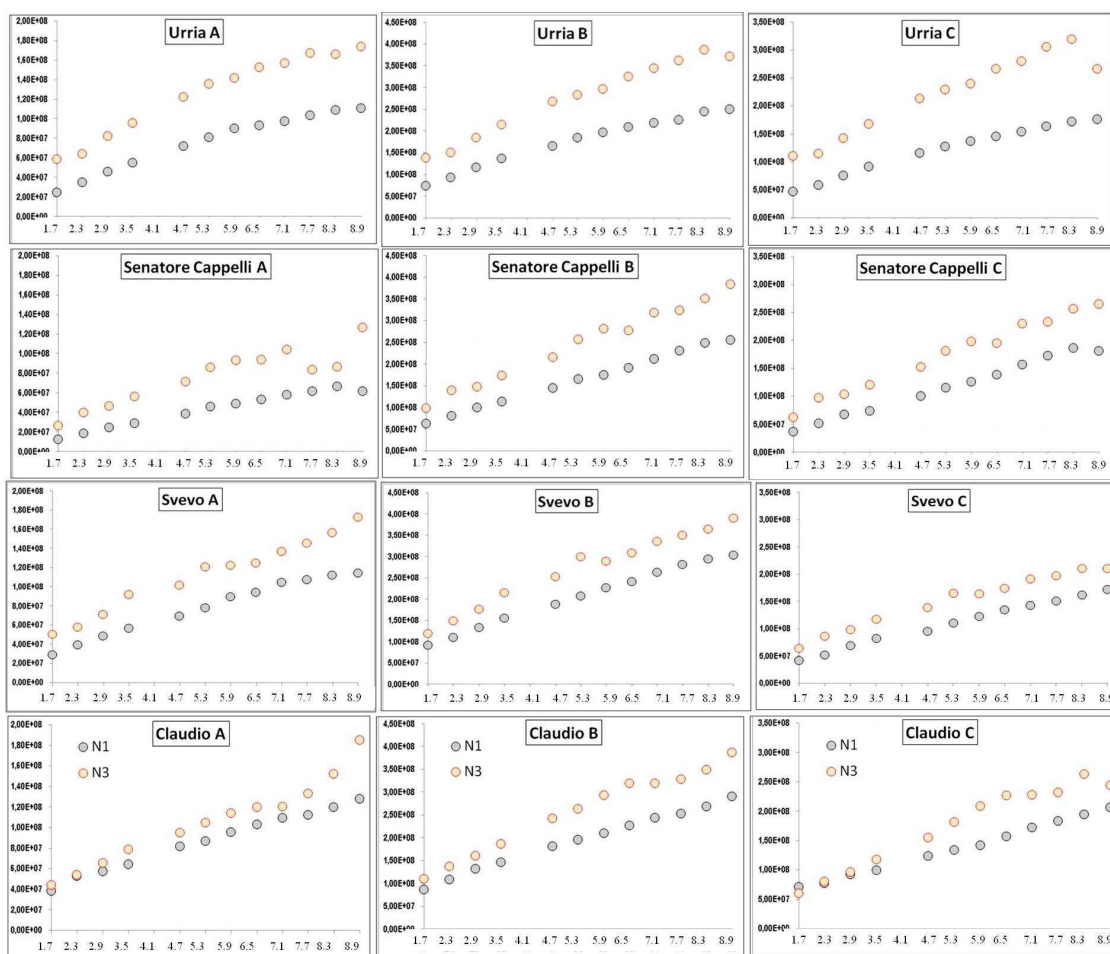
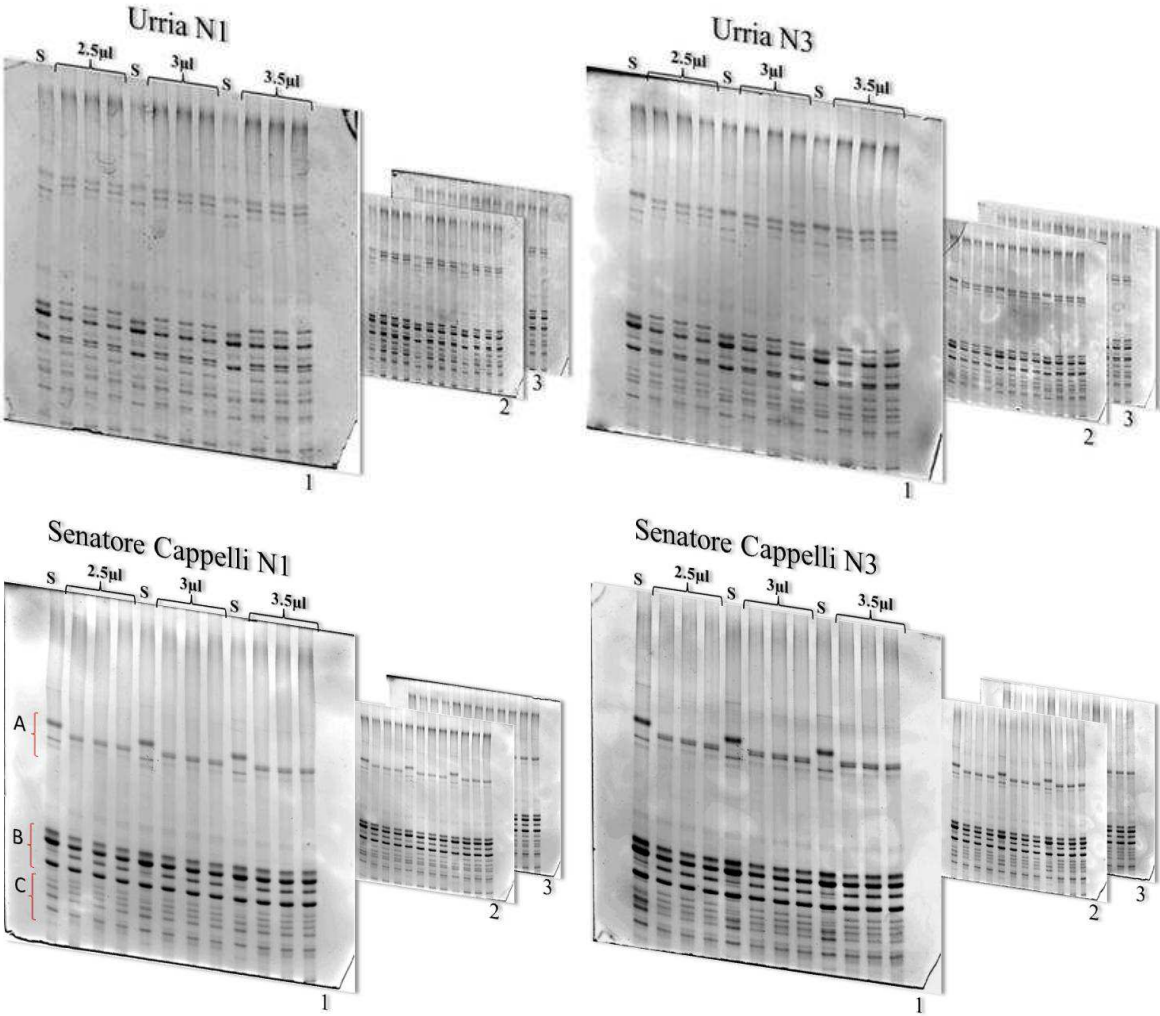


Fig.28: Grafico relativo ai volumi delle bande considerate relativamente alle diverse cariche effettuate in ogni varietà. Varietà di nuova costituzione Claudio e Svevo; varietà di antica costituzione Senatore Cappelli e Urria; N1 in grigio; N3 in giallo; A (HMW-GS) sub unità gluteniniche ad alto peso molecolare; B (LMW-GS) sub unità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo b; C (LMW-GS) sub unità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo C; sull'asse delle x sono riportate le diverse cariche effettuate; sull'asse delle y vengono riportati i volumi rilevati dall'analisi densitometrica.

L'analisi riportata nella figura 28, mostra che la linearità è migliore alle basse cariche (tra 1,7 µl e 3,5µl) rispetto a quelle più alte (da 4,7µl in poi), in quanto in alcuni casi, in queste si raggiunge il livello di saturazione.

In base a questi risultati, abbiamo stabilito di utilizzare, per le analisi quantitative, le cariche di 2.5µl, 3µl, 3.5 µl e i relativi gel elettroforetici vengono riportati in figura 29.



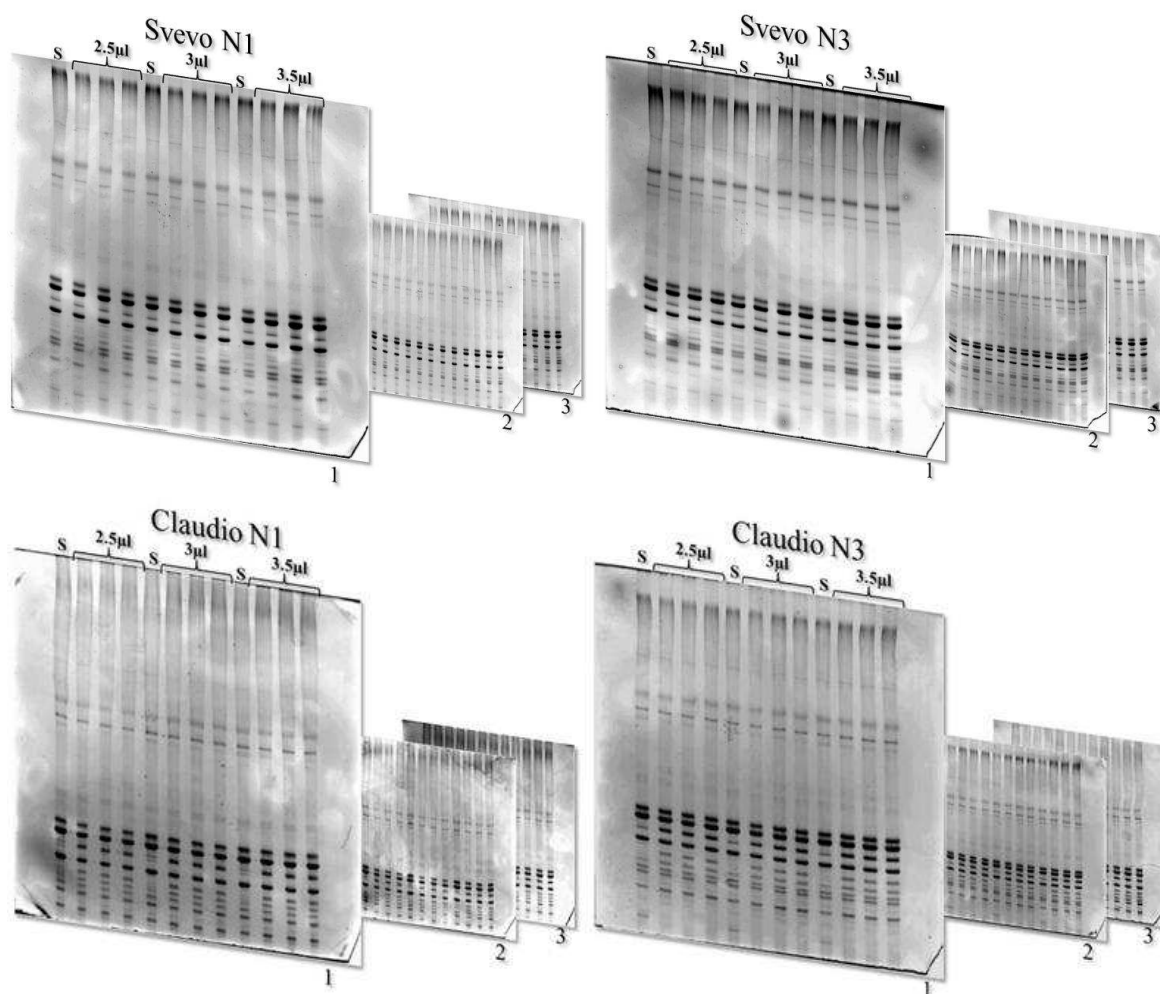


Fig. 29: Analisi densitometrica delle subunità gluteniniche mediante SDS-PAGE. Varietà di nuova (Svevo e Claudio) e antica (Urria e Senatore Cappelli) costituzione; trattamento azotato (N1 ed N3); le tre cariche scelte (2.5 µl, 3 µl, 3.5 µl); le tre repliche biologiche (1,2,3). S: standard interno

L'analisi densitometrica ha permesso di calcolare i parametri HMW/LMW (B) subunità gluteniniche ad basso peso molecolare di tipo B; HMW/LMW (B+C) subunità gluteniniche ad alto peso molecolare diviso subunità gluteniniche a basso molecolare di tipo B+C; HMW% percentuale di subunità gluteniniche ad alto peso molecolare; LMW (B)% percentuale di subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo B; LMW C% percentuale di subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo C: Essi sono stati infine analizzati mediante ANOVA. Questa analisi ha mostrato che in tutti i casi considerati, l'interazione dei fattori in studio non è significativa (Tabella9), mentre in alcuni casi è significativa la differenza tra varietà e in altri tra trattamenti. In particolare, la differenza sia tra varietà che tra trattamenti è significativa per quel che riguarda i valori HMW/LMW (B) e LMW(B)%. Invece, i valori HMW/LMW (B+C), HMW% e LMW

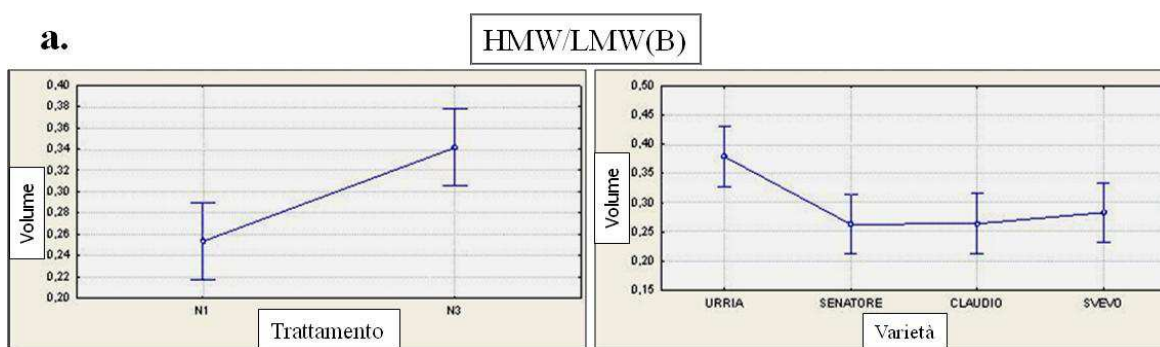
(B+C)% sono significativamente diversi tra i due trattamenti. La differenza tra varietà risulta significativa solo per ciò che riguarda il valore LMW (C)%.

	HMW/LMW (B)	HMW/LMW (B+C)	HMW%	LMW(B)%	LMW (C)%	LMW (B+C)%
Varietà (V)	**	NS	NS	**	***	NS
Trattamento(T)	**	**	**	*	NS	**
V x T	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tab. 9: ANOVA relativa ai parametri presi in considerazione. Varietà= Svevo, Claudio, Senatore Cappelli, Urria; T= N1 e N3; HMW (subunità gluteniniche ad alto peso molecolare); LMW (B) (subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo B); LMW (C) (sub unità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo C); *(significativo a $p < 0.05$); *(significativo a $p < 0.01$); *(significativo a $p < 0.001$); NS (non significativo).

Dato che l'interazione tra trattamento e varietà non è risultata significativa, in figura 29 vengono riportati i grafici con la media dei parametri che sono risultati significativi nelle varietà e/o nei trattamenti. Si osserva che il rapporto HMW/LMW(B) aumenta all'aumentare del trattamento azotato e che la varietà Urria mostra un valore maggiore rispetto alle altre tre varietà, che invece presentano un valore simile (figura 29a).

Il valore LMW (B)% diminuisce con il trattamento azotato e le varietà di nuova costituzione (Claudio e Svevo) mostrano un valore più alto rispetto alle varietà di antica costituzione (Urria e Senatore Cappelli) (figura 29b).



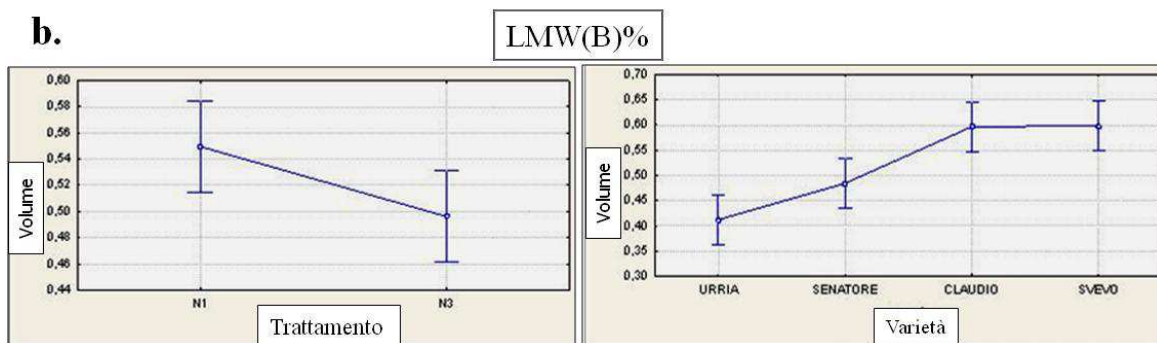


Fig. 29: a. Rapporto HMW/LMW (B); b. Percentuale di LMW (B)%. Sulle ordinate vengono riportati i valori dei volumi; sulle ascisse vengono riportati il trattamento o le varietà prese in considerazione.

Nella figura 30, osserviamo che il rapporto HMW/LMW(B+C) e il valore HMW% aumentano al livello più alto di azoto, mentre il valore LMW(B+C) diminuisce.

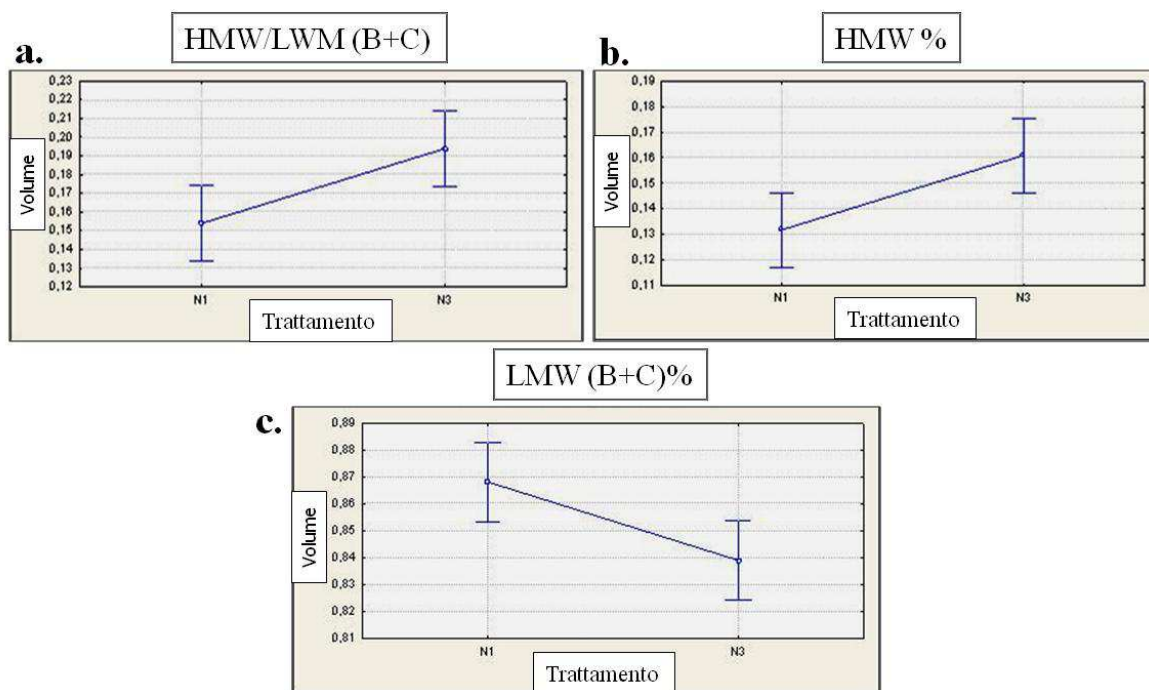


Fig. 30: a) Rapporto HMW/LMW (B+C); b) HMW%; c) LMW (B+C)%. Sulle ordinate vengono riportati i valori dei volumi; sulle ascisse viene riportato il trattamento azotato.

Infine, il valore LMW (C)% (figura 31), mostra che i valori medi per le varietà di antica costituzione (Urria e Senatore Cappelli) sono superiori rispetto alle varietà di nuova costituzione (Claudio e Svevo).

Come è noto, la frazione LMW(C)% è correlata in maggior misura a caratteristiche non eccellenti negli impasti e nei prodotti derivati da esse. Ciò si rispecchia sulle varietà di antica costituzione nell'analisi sopra descritto, con un valore maggiore rispetto alle varietà

di nuova costituzione. Questo può essere attribuito al fatto che Senatore Cappelli e Urria sono varietà le quali sono state selezionate in assenza di fertilizzanti chimici, per presentare una costante produttività piuttosto che per superiori caratteristiche qualitative. Inoltre, le note caratteristiche superiori delle varietà di nuova costituzione trovano riscontro nel valore LMW(B)% maggiore rispetto alle varietà di antica costituzione. Questo parametro, strettamente correlato con le caratteristiche qualitative degli impasti di farine di frumento duro, probabilmente è stato involontariamente selezionato durante la produzione di queste varietà, selezionate per rispondere ai fertilizzanti chimici e dare una qualità superiore.

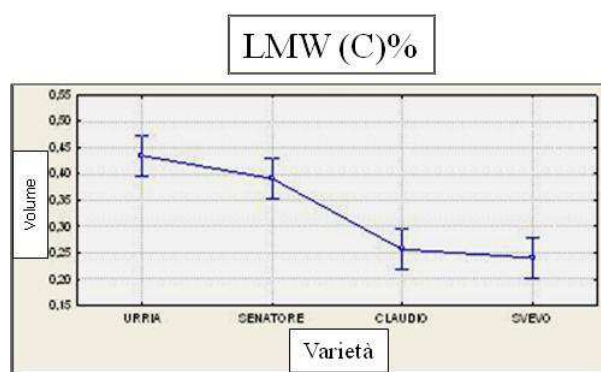


Fig.31: Rapporto LMW (C)%. Sull'asse delle ordinate vengono riportati i volumi relativi alle bande corrispondenti alle LMW(C) in percentuale rispetto al totale delle bande, mentre sull'asse delle ascisse vengono riportate le quattro varietà.

Oltre ai parametri appena esposti, abbiamo voluto confrontare le quantità assolute di subunità gluteniniche totali (HMW-GS+LMW-GS totali) e dei diversi gruppi di subunità considerati (HMW-GS totali; LMW-GS totali; LMW-GS di tipo B; LMW-GS di tipo C).

Ogni campione separato in SDS-PAGE è stato normalizzato utilizzando lo standard interno, come descritto nei Materiali e Metodi. I dati così ottenuti sono stati sottoposti ad ANOVA bifattoriale, nella quale sono stati presi in considerazione come fattori la varietà e il trattamento azotato. I risultati sono riportati in Tabella 10.

	HMW	LMW (B)	LMW (C)	LMW(B+C)	TOT.
Varietà (V)	***	***	NS	***	***
Trattamento azotato (T)	NS	NS	NS	NS	NS
V x T	***	***	*	***	***

Tab.10: ANOVA effettuata sui valori corrispondenti alle quantità normalizzate delle diverse classi di subunità gluteniniche. Varietà (Svevo, Claudio, Senatore Cappelli, Urria); Trattamento (N1 e N3); VxT (interazione dei due fattori); HMW (subunità gluteniniche ad alto peso molecolare); LMW (B) subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo B); LMW (C) (subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo C); *(significativo a $p < 0.05$); *** (significativo a $p < 0.001$); NS (non significativo).

L'ANOVA mostra come vi sia una interazione altamente significativa tra varietà e trattamento azotato, per tutti i parametri presi in considerazione, ad eccezione delle LMW-GS di tipo C, per le quali comunque, né varietà, né trattamento azotato risultano essere significativi. In figura 32 vengono riportati gli istogrammi che illustrano l'andamento delle quantità normalizzate relative a ciascuno dei cinque parametri considerati, per ciascuna varietà ai due livelli di azoto.

Si nota che tutte le frazioni diminuiscono nelle varietà di antica costituzione (Urria e Senatore Cappelli) con l'aumentare del trattamento azotato, mentre aumentano nelle varietà di nuova costituzione (Claudio e Svevo)

Per potere interpretare questi risultati, bisogna tenere presente che le varietà di nuova costituzione sono state sviluppate per rispondere alla concimazione azotata, che si riflette soprattutto sull'accumulo delle proteine del glutine, che costituiscono circa l'80% delle proteine della cariosside, in particolare con le glutenine, maggiormente correlate con le proprietà reologiche. All'opposto, le vecchie varietà di frumento furono sviluppate per dare una produttività e una qualità del glutine costanti, seppure non eccellenti, in assenza di concimazione. I risultati così ottenuti sono perciò coerenti con queste premesse, in quanto nelle nuove varietà si ha un aumento delle subunità gluteniniche in seguito a concimazione azotata, mentre nelle vecchie varietà si ha una diminuzione, probabilmente perché la concimazione va ad influenzare le proteine solubili e/o le gliadine.

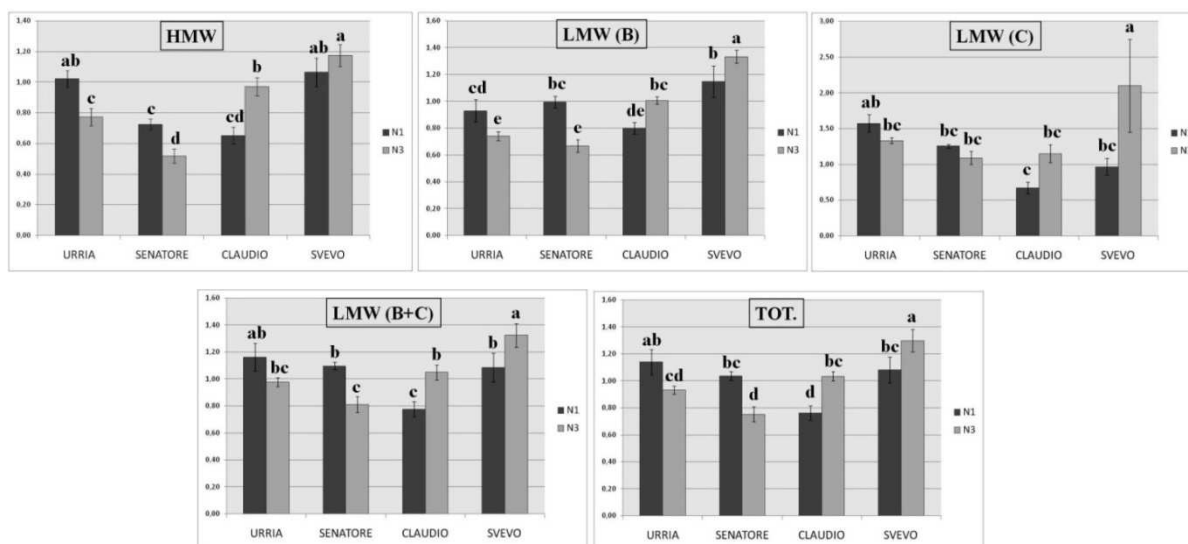


Fig.32: Confronto tra le quantità assolute di subunità gluteniniche nelle quattro varietà ai due livelli d'azoto (N1 e N3). HMW (subunità gluteniniche ad alto peso molecolare); LMW (B) (subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo B); LMW (C) (subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo C);TOT. (subunità gluteniniche ad alto e basso peso molecolare sommate). In ogni grafico, le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei secondo il test LSD (Least significant difference $p < 0.05$)

4.5 TEST ELISA

Dato che questo test è stato eseguito all'inizio del corso di dottorato, sono stati presi in considerazione i tre livelli di azoto.

Con il proposito di valutare se i polipeptidi immunogenici vengano accumulati maggiormente con l'incremento di azoto e, di conseguenza, si abbia un aumento della quantità di IgE specifiche nei pazienti affetti da allergie respiratorie al frumento, e se ci sia una differenza significativa tra le varietà di nuova costituzione e quelle di antica costituzione, è stato eseguito il test ELISA sulla frazione proteica corrispondente alle proteine metaboliche (comprendente maggiormente albumine e globuline insolubili in metanolo e cloroformio) e sulle proteine CM (ovvero solubili in cloroformio e metanolo) utilizzando sieri di pazienti affetti da tali allergie.

Tenendo conto del fatto che la risposta immunologica può variare notevolmente da individuo a individuo, i risultati sono stati analizzati singolarmente per ogni paziente, usando uno schema fattoriale comprendente 4 Varietà (V) e 3 dosi di azoto (N). I dati ottenuti relativamente a ogni paziente sono stati quindi sottoposti all'Analisi della Varianza a due vie (2-way ANOVA) (Tabella 11).

Per quanto riguarda la frazione metabolica, è stata osservata l'interazione dei due fattori in tutti i casi tranne nel paziente 865. Per quanto riguarda invece le proteine CM-like, l'interazione è stata osservata in due pazienti, in uno non è stata riscontrata, mentre nel quarto paziente non è stato osservato alcun effetto né riguardo alla varietà né al trattamento.

	PROTEINE METABOLICHE ¹				PROTEINE CM-like ²			
	Paziente 1021	Paziente 865	Paziente 858	Paziente 857	Paziente 1020	Paziente 865	Paziente 863	Paziente 858
Varietà (V)	***	*	***	***	***	**	NS	***
Trattamento (T)	***	***	***	***	*	***	NS	***
VxT	**	NS	***	***	***	NS	NS	***

Tab.11: ANOVA bifattoriale relativa alle risposte osservate in ciascun paziente contro le proteine metaboliche e le CM-like. NS (non significativo), *** (significativo a $p < 0.001$), ** (significativo a $p < 0.01$), * (significativo a $p < 0.05$). Pazienti affetti di Asma + Rinite (1020, 1021). Pazienti affetti da Asma (858, 863, 865); Paziente affetto da Rinite (857).

Proteine Metaboliche

Nella figura 33 viene illustrata, riguardo alle proteine metaboliche, la risposta di ogni paziente per ogni varietà ai tre livelli di azoto.

In tutti pazienti si nota una diminuzione della risposta con l'aumentare della dose di azoto. Ciò può trovare una spiegazione nel fatto che l'azoto va ad influenzare principalmente l'accumulo delle proteine del glutine, per cui si ha una diminuzione delle proteine solubili.

Nel caso del paziente 865 (affetto da asma), dove è stata osservata l'indipendenza dei fattori azoto e varietà, si nota (Tabella 11, figura 33 e Tabella 12) come la risposta alle due dosi inferiori di azoto sia notevolmente superiore rispetto alla risposta relativa alla dose più alta. Riguardo alle varietà, si osserva che Claudio, Svevo e Senatore Cappelli appartengono allo stesso gruppo di omogeneità e quindi non presentano differenze significative tra di loro, mentre la varietà Urria genera una risposta significativamente inferiore.

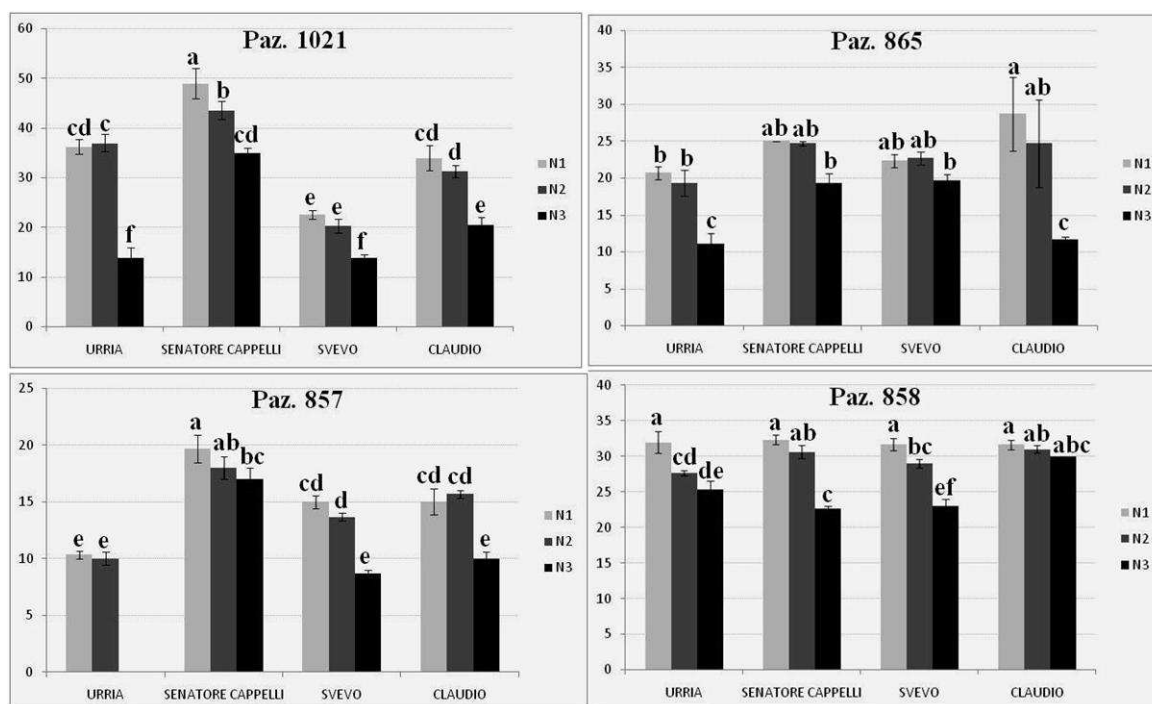


Fig. 33: Risposta dei pazienti alle proteine metaboliche estratte dalle 4 varietà sottoposte a tre livelli di azoto. Pazienti affetti da Asma (858, 865); Pazienti affetti da Rinite (857); Pazienti affetti da Asma + Rinite (1021). Per ogni grafico, le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei secondo il test LSD (Least significant difference $p < 0.05$).

	Media	ES	
Varietà			
Urrìa	17,00	1,67	b
Senatore Cappelli.	23,00	1,00	a
Svevo	21,56	0,65	a
Claudio	21,67	3,40	a
DoseAzoto			
N1	24,17	1,42	a
N2	22,83	1,49	a
N3	15,32	1,32	b

Tab. 12: Valori medi del test ELISA contro le proteine metaboliche estratte nei campioni sottoposti ai tre trattamenti azotati, riscontrati nel paziente 865. Per ogni valore, le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei secondo il test LSD (Least significant difference $p < 0.05$)

Proteine CM-like

Come si osserva nella figura 34, non c'è una tendenza omogenea nei 4 pazienti analizzati. Un andamento analogo alle proteine metaboliche, cioè decrescente con l'aumentare della dose di azoto, è stato evidenziato nei pazienti 1020 e 865, sebbene non costante per tutte le varietà. Nel paziente 865 è stata accertata l'indipendenza dei fattori (Tabella 11 e Tabella13). Sempre riguardo a questo paziente, si osserva che le varietà Claudio, Urrìa e Senatore Cappelli mostrano un valore medio di risposta inferiore rispetto a Svevo.

L'assenza di effetti significativi dei fattori nel paziente 863 potrebbe essere attribuita all'elevata variabilità nelle ripetizioni tecniche del test (vedi gli errori standard nella figura 34) probabilmente dovuta alla scarsa attendibilità del test quando i valori sono molto bassi (inferiori a 20).

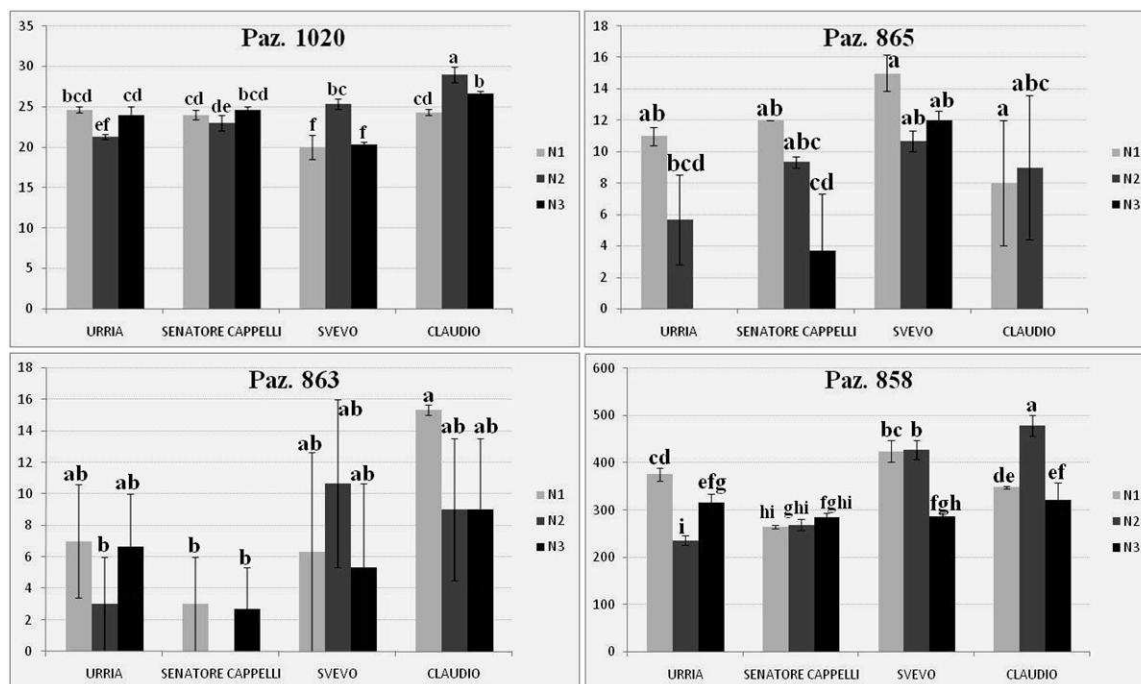


Fig. 34: Risposta dei pazienti alle proteine CM-like estratte dalle 4 varietà sottoposte ai tre livelli di azoto. Pazienti affetti di Asma (863, 858, 865); Pazienti affetti di Asma + Rinite (1020). LSD (Least significant difference) $p < 0.05$. Per ogni grafico, le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei secondo il test LSD (Least significant difference $p < 0.05$)

	Media	ES	
Varietà			
Urria	5,56	1.80	b
Senatore C.	8.33	1.62	b
Svevo	12.56	0.77	a
Claudio	5.67	2.26	b
Dose Azoto			
30	11.50	1.17	a
60	8.67	1.29	a
90	3.92	1.68	b

Tab. 13: Valori medi del test ELISA contro le proteine CM-like estratte nei campioni sottoposti ai tre trattamenti azotati, riscontrati nel paziente 865. Per ogni valore, le lettere indicano i sottoinsiemi omogenei secondo il test LSD (Least significant difference $p < 0.05$)

4.6 Analisi proteomica comparativa delle proteine solubili

4.6.1 Frazione metabolica

L'analisi proteomica di questa frazione è stata eseguita con la tecnica DIGE (Differential In Gel Electrophoresis). Nella figura 35 viene riportato un esempio di confronto relativo ai campioni N1 ed N3 di Svevo. I due campioni a confronto sono stati marcati con due cianine diverse (Cy3 o Cy 5), mentre tutti i campioni analizzati nell'esperimento sono stati marcati con la cianina Cy2, come riportato nei materiali e metodi.

Nella figura 36 viene riportato un gel preparativo (quindi colorato con Coomassie Blu) nel quale sono stati indicati gli spot corrispondenti ai polipeptidi differenzialmente espressi nelle 4 varietà.

L'analisi dei gel ha permesso l'individuazione di 29 spot. In particolare sono stati identificati: 6 spot nella varietà Svevo, 3 spot nella varietà Claudio, 11 spot nella varietà Senatore Cappelli e 9 spot nella varietà Urrià. Nella tabella 14 vengono riportati i risultati relativi all'identificazione mediante MS di ciascuno degli spot presi in considerazione.

I termini “sottoespresso” o “sopraespresso” significano che la proteina risultante è rispettivamente meno o più abbondante in N3 rispetto ad N1, dato che quest'ultimo è il riferimento.

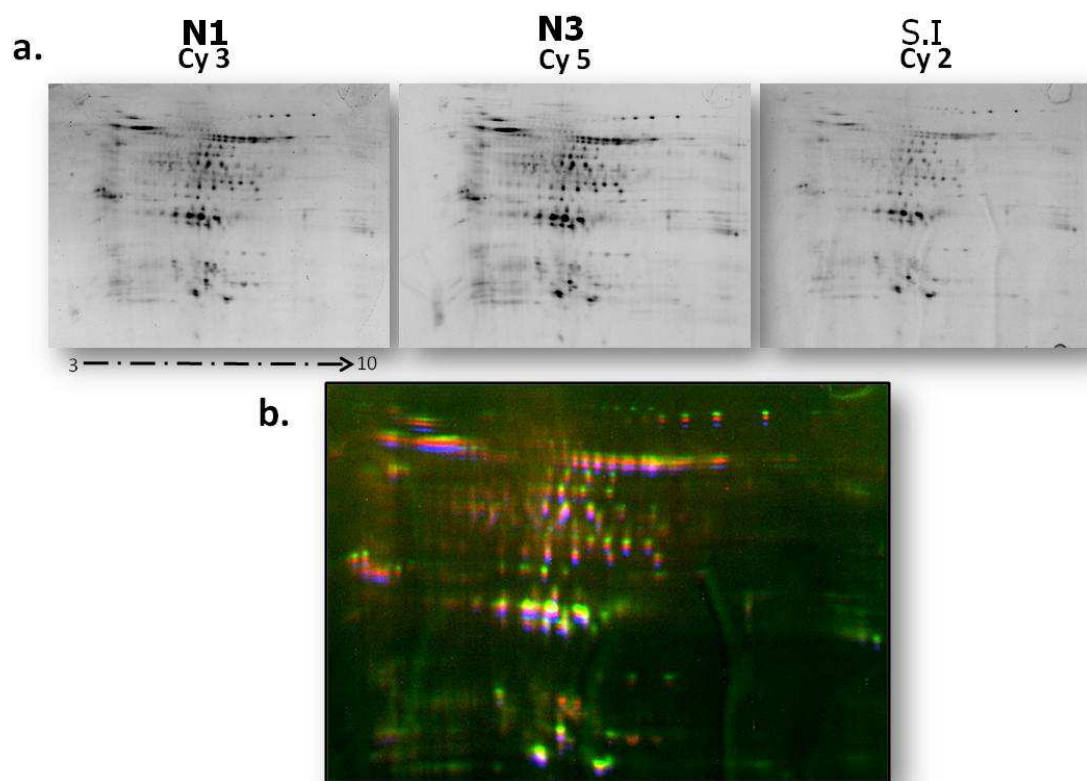
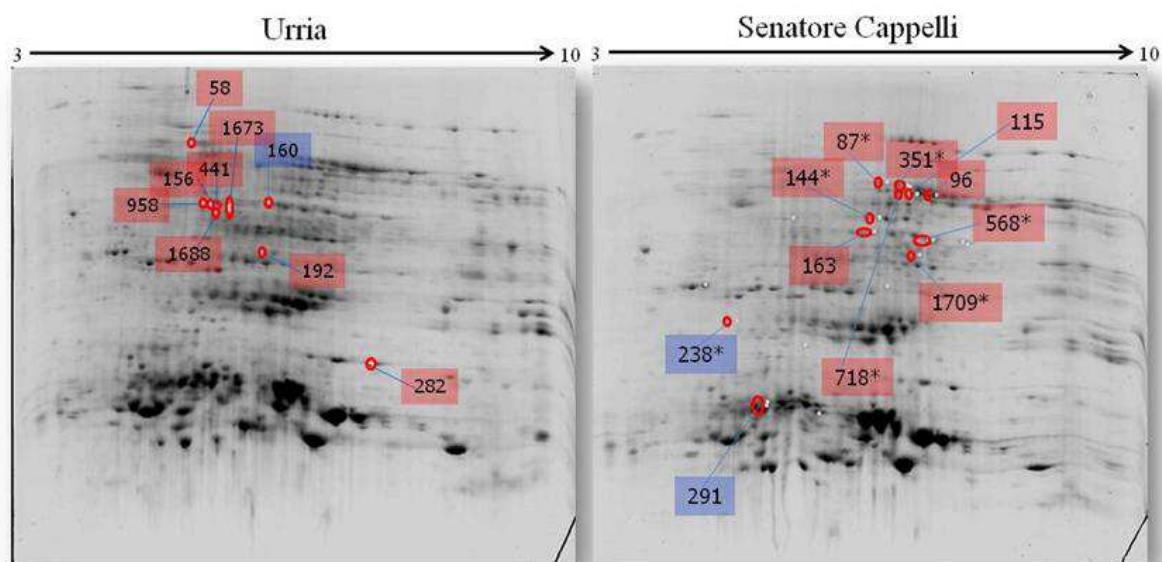


Fig. 35: Esempio della marcatura utilizzata per eseguire l'analisi DIGE. In a) sono state riportate le mappe bidimensionali dedotte dalla varietà Svevo, relativamente ai due trattamenti messi a confronto. In b) viene riportata l'immagine reale DIGE corrispondente alla sovrapposizione dei tre campioni in a).



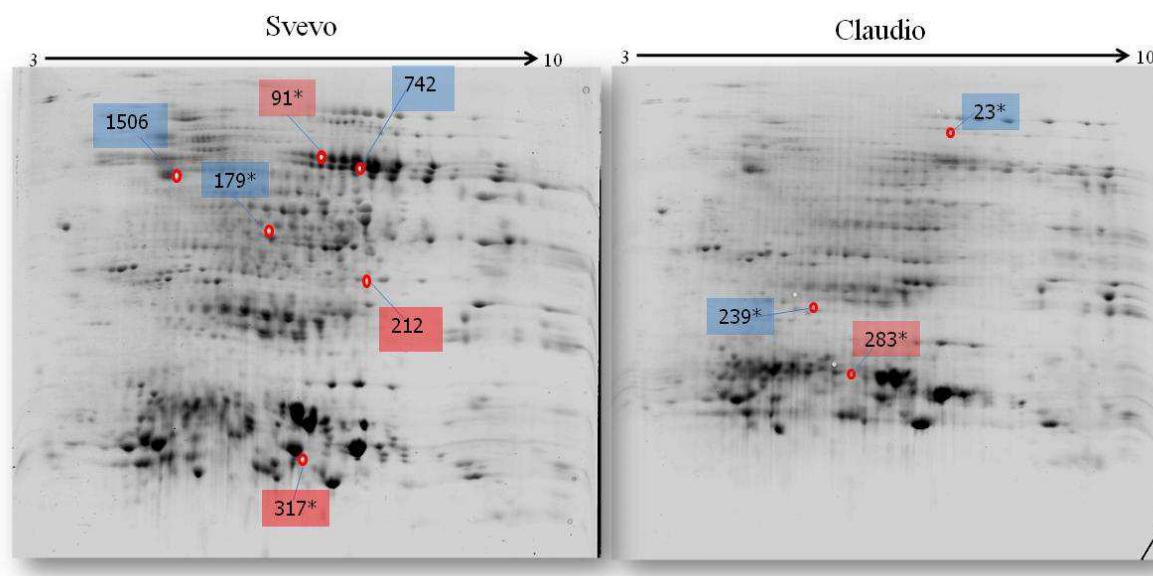


Fig. 36: 2D-PAGE preparativi delle proteine metaboliche delle quattro varietà in studio: Svevo, Claudio, Urria e Senatore Cappelli. In blu vengono riportati gli spot sottoespressi e in rosso gli spot sopraespressi; l'asterisco indica i polipeptidi non identificati mediante MS.

E' necessario sottolineare che, almeno per questo tipo di proteine, l'analisi DIGE non si è mostrata particolarmente risolutiva, probabilmente perché queste proteine non sono particolarmente ricche in lisina, che è l'amminoacido che viene marcato dalle cianine utilizzate nella DIGE. Pertanto, solo le proteine più abbondanti risultano sufficientemente marcate da permetterne l'analisi, mentre le meno abbondanti, o le meno ricche in lisina, non risultano ben visibili. Infatti, gli spot identificati presentavano un'intensità bassa che probabilmente spiega anche il motivo del basso *fold-change* determinato (tra 1,2 e 1,7) e dei bassi *q-values* che servono ad indicare la possibilità di false identificazioni.

Come si può vedere dalla Tabella 14, alcuni polipeptidi non sono stati identificati, probabilmente perché scarsamente abbondanti (vedi anche figura 36).

Sebbene in entrambi i casi delle varietà di nuova e antica costituzione, non vi sia una enorme differenza di espressione in seguito ai due trattamenti azotati qui testati, questi risultati indicano che, comunque, le due varietà di antica costituzione sembrano rispondere maggiormente per quel che riguarda l'espressione delle proteine metaboliche. Infatti in esse è stato osservato un maggior numero di polipeptidi differenzialmente espressi tra i due trattamenti azotati, includendo anche i polipeptidi non identificati (Tabella 14).

Tenendo in considerazione le quattro varietà, il livello azotato superiore (N3) determina generalmente una maggiore espressione, in quanto circa il 70% dei polipeptidi

identificati come maggiormente espressi sono quelli relativi a questo trattamento (inclusi quelli non identificati).

Il fatto che le varietà di antica costituzione rispondano di più rispetto alle nuove al fattore concimazione azotata, può essere spiegato tenendo in considerazione che la concimazione azotata influenza maggiormente le proteine del glutine rispetto a quelle solubili. Pertanto è possibile che la concimazione azotata abbia aumentato la quantità di proteine del glutine a scapito di quelle solubili nelle cultivar di nuova costituzione.

Le proteine identificate come differenzialmente espresse vengono descritte qui di seguito (rif. Tabella 14). Per quanto riguarda la varietà Claudio, non è stato possibile identificare nessun polipeptide mediante MS, in quanto i pochi polipeptidi che risultavano differenzialmente espressi, presentavano segnali molto deboli.

Group 3 Late Embryogenesis Abundant Protein (LEA): identificata nella varietà Svevo come sottoespressa, questa proteina è prodotta in abbondanza durante lo sviluppo del seme ed è coinvolta nella tolleranza a stress di tipo abiotico, come ad esempio: freddo, siccità e alta salinità (Ingram J, Bartels D, 1996; Thomashow MF, 1999). Essa infatti ha un ruolo antiossidante e stabilizzatore delle proteine di membrana durante lo stress idrico (Tunnacliffe and Wise, 2007, Goyal *et al*, 2005). Questa proteina viene espressa nel seme maturo, soprattutto nell'embrione, e un recente lavoro (Irar *et al*, 2010) ha mostrato, sia attraverso un approccio proteomico che con RT-PCR, che la LEA (in particolare quella del Gruppo 3) è meno abbondante negli embrioni di una varietà di frumento duro tollerante agli stress idrici e salini rispetto ad una varietà suscettibile. Al riguardo è interessante sottolineare che la varietà Svevo è mediamente tollerante al freddo e, in condizioni migliori di concimazione (il livello N3) presenta anch'essa minori livelli di LEA.

Globuline 3A e 3B: la Globulina 3A è stata identificata in Senatore Cappelli (sottoespressa) e Urrìa (sopraespressa), mentre la 3B in Svevo (sottoespressa). Inoltre, due polipeptidi (nr 96 e nr 115 di Senatore Cappelli) sopraespressi in N3, che non sono risultati caratterizzabili mediante la banca UniProt, ma che sono stati sottoposti ad analisi BLAST, mostravano però un'identità del 84% con una proteina Globulin-like di riso. Le globuline sono considerate proteine di riserva e sono coinvolte nelle allergie al frumento di tipo alimentare e respiratorio (Michell L. *et al.*, 2012), oltre che, in alcuni casi, al diabete di tipo

in alcuni soggetti sensibili (Loit *et al.*, 2009). L'espressione differenziale di proteine globulin-like è stata riportata in casi di stress termico (Hurkman *et al.*, 2009; Pompa *et al.*, 2013).

Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase: Questa proteina risulta sopraespressa nella varietà Senatore Cappelli e sottoespressa nella varietà Urrià. La GADPH è coinvolta nella glicolisi ed è stata identificata come uno degli allergeni principali nell'asma del panificatore (Tatham and Shewry, 2008).

Una funzione secondaria è riportata da Bustos and Iglesias (2003), in cui la GADPH nell'endosperma di frumento e nel germoglio subisce fosforilazione post-traduzionale che consente l'interazione con proteine della famiglia 14-3-3, tale da permettere il mantenimento del livello energetico nel citoplasma. Inoltre, studi di proteomica (Hancock *et al.*, 2005) hanno mostrato che l'attività GAPDH in *Arabidopsis* veniva inibita da H₂O₂, suggerendo che GAPDH possa avere un ruolo nel mediare il segnale ROS nelle piante. In frumento, un'analisi proteomica condotta su plantule sottoposte a stress salino, mostrava dei lievi, ma significativi cambiamenti nell'espressione di questo enzima.

α -amylaseinhibitors: nella varietà Senatore Cappelli è stato riscontrato come sottoespresso un polipeptide corrispondente ad un inibitore dimerico delle α -amilasi, mentre nella varietà Urrià è risultato sopraespresso un inibitore delle α amilasi endogene e della subtilisina. Mentre il primo tipo di polipeptidi è in grado di inibire enzimi proteolitici esogeni, il secondo agisce solo inibendo le proteasi endogene. Inoltre, il primo tipo è noto per essere uno dei principali allergeni del frumento (Fränken *et al.*, 1994), in particolare per quanto riguarda l'allergia di tipo respiratorio (l'asma del panificatore) e la dermatite atopica, mentre il secondo non viene riportato come un allergene (riferimenti in Tatham and Shewry, 2008).

Gli inibitori delle α amilasi (soprattutto quelle esogene) fanno parte dei composti di difesa prodotti dalle piante in seguito all'attacco di patogeni. Questo tipo di enzimi viene descritto più in dettaglio nel paragrafo delle frazioni CM-like, dato che queste proteine sono presenti principalmente in questa frazione.

Phosphoglycerate kinase: tre spot della varietà Urrìa risultano sopraespressi al livello N3. Questo enzima è coinvolto nella glicolisi e contribuisce quindi al metabolismo energetico. La sua sopraespressione pertanto denoterebbe un aumento del metabolismo energetico a livelli superiori di concimazione azotata.

β -amylase: questa proteina risulta sopraespressa nella varietà Urrìa. Essa è presente nell'endosperma di frumento ed è coinvolto nello sviluppo dell'embrione, in quanto contribuisce al metabolismo dell'amido. In questo caso non abbiamo una spiegazione plausibile delle motivazioni che portano a un cambiamento di espressione in seguito a fertilizzazione azotata

Serpin: Le serpine sono inibitori a serina delle proteasi. Esse risultano sopraespressi al livello N3 in Urrìa. Le serpine sono diffuse nel regno vegetale e rappresentano fino al 4% delle proteine totali nell'endosperma maturo dei semi di cereali (Rasmussen *et al.*, 1996; Østergaard *et al.*, 2000). Esse sono proteine di difesa che vengono espresse in seguito all'attacco di patogeni. Inoltre, esse sono conosciute anche come allergeni (Wu *et al.*, 2012). La sopraespressione in seguito a fertilizzazione è già stata riportata in frumenti teneri (Flåte *et al.*, 2005), sebbene le motivazioni non siano note.

Ribulosebiphosphatecarboxylase: la RuBisCo risulta sopraespressa in Urrìa. Anche essa contribuisce al metabolismo energetico.

Lipoprotein-like: Nella varietà Svevo, il polipeptide corrispondente allo spot nr 212 non è stato identificato; pertanto è stata condotta l'analisi BLAST che ha indicato che il polipeptide in questione presentava un'identità dell'86% con il riso.

Nella figura 37 viene riportato il grafico a torta relativo alle funzioni molecolari attribuite alle proteine presenti nella frazione metabolica e identificate mediante MS.

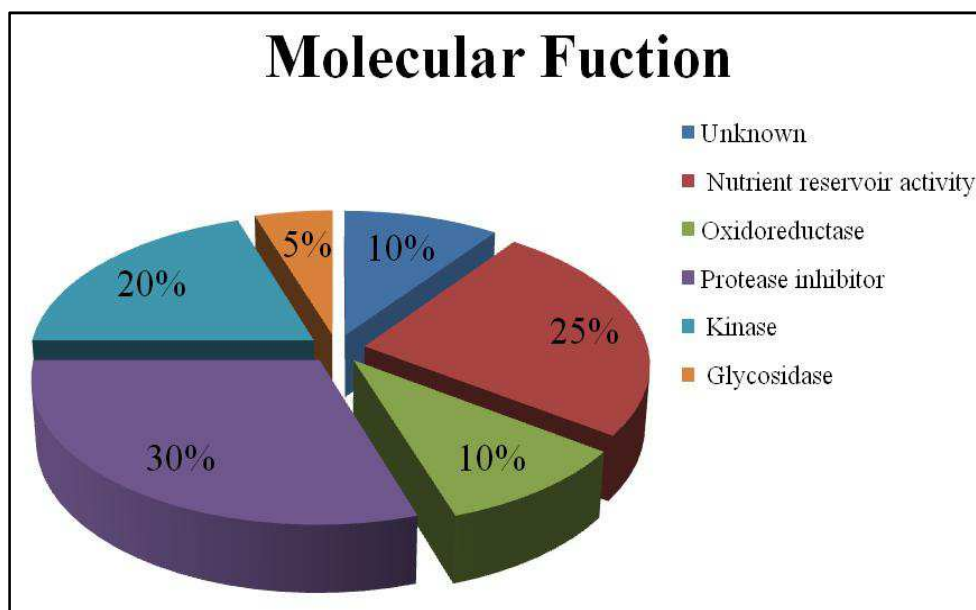


Fig. 37: Grafico relativo alle funzioni molecolari attribuite alle proteine presenti nella frazione metabolica che sono risultate differenzialmente espresse e identificate mediante MS.

Spot	Anova	Proteina	Accession	Specie	Score	%Coverage	Fold	N1	N3
SVEVO									
1506	0,000172	Group 3 late embryogenesis abundant protein	Q03967	Triticum aestivum	7,4	10,73	1,3	*	
742	0,00235	Globulin 3B	B7U6L5	Triticum aestivum	12,99	13,1	1,3	*	
317	0,0281	/					1,6		*
91	0,0401	/					1,1		*
179	0,0419	/					1,2	*	
212	0,0562	Predictedprotein	F2EBF9 ¹	Hordeum vulgare	24,09	25	1,7		*
CLAUDIO									
283	0,0253	/					1,3		*
239	0,0284	/					1,3	*	
23	0,0371	/					1,5	*	
SENATORE CAPPELLI									
1709	0,00279	/					1,4		*
568	0,0053	/					1,3		*
238	0,0075	/					1,4	*	
87	0,0173	/					1,5		*
163	0,0184	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	P26517	Hordeum vulgare	26,42	32,94	1,4		*
351	0,0239	/					1,6		*
144	0,0265	/					1,4		*
115	0,0274	Uncharacterized protein	J3LTM2 ²	Oryza brachyantha	6,21	4,84	1,3		*
96	0,0356	Uncharacterized protein	J3LTM2 ²	Oryza brachyantha	9,93	4,84	1,3		*
718	0,0506	/					1,4		*
291	0,0586	Globulin-3°	I6QQ39	Triticum aestivum	16,03	16,15	1,3	*	
	0,0586	Dimeric alpha-amylase inhibitor	I6PWK7	Triticum aestivum	8,98	32,08	1,3	*	
URRIA									
160	0,00063	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	C7C4X1	Triticum aestivum	32,04	34,42	1,3	*	
958	0,0289	Phosphoglycerate kinase, cytosolic	P12783	Triticum aestivum	16,28	23,94	1,4		*

58	0,0327	Beta amylase	F2EFV1	Hordeum vulgare	12,66	12,21	1,2	*
282	0,0357	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor	P16347	Triticum aestivum	54,09	87,22	1,5	*
192	0,0396	Globulin-3 ^a	I6QQ39	Triticum aestivum	11,41	8,33	1,4	*
1673	0,0417	Serpin-Z2A	Q9ST57	Triticum aestivum	38,08	29,65	1,4	*
		Phosphoglycerate kinase	P12783	Triticum aestivum	30,07	29,68	1,4	*
156	0,0488	Phosphoglycerate kinase	P12783	Triticum aestivum	32,12	29,93	1,3	*
		Ribulosebiphosphate carboxylase large chain	P11383	Triticum aestivum	25,66	21,08	1,3	*
		Serpin-N3.7	H9AXB4	Triticum aestivum	12,79	12,79	1,3	*
1686	0,0509	Serpin-Z2A	Q9ST57	Triticum aestivum	41,59	27,89	1,2	*
441	0,0549	Serpin-Z2A	Q9ST57	Triticum aestivum	33,04	28,64	1,4	*

Tab. 14: Polipeptidi identificati con BLAST. ¹La sequenza del polipeptide identificato nello spot 212 in Svevo ha riportato un'identità dell'86 % con una lipoproteina –*likedi* riso.²La sequenza dei polipeptidi identificati negli spot 96 e 115 in Senatore Cappelli hanno riportato un'identità dell'84% con una Globulina – *likedi* riso. Il simbolo / indica la non identificazione dei polipeptidi trovati su i corrispettivi spot.

4.6.2 Frazione CM-like

Questa frazione è stata presa in considerazione perché contiene la maggior parte delle proteine conosciute come allergeni. L'analisi proteomica su questa frazione è stata effettuata attraverso la tecnica tradizionale 2D-PAGE con colorazione in Coomassie Blu. Questo perché il minor numero di polipeptidi presenti permetteva di effettuare un'analisi più dettagliata in tempi ristretti.

In figura 38 vengono riportate le mappe bidimensionali di ogni varietà, con i corrispettivi spot risultanti differenzialmente espressi in seguito al confronto dei due trattamenti presi in considerazione.

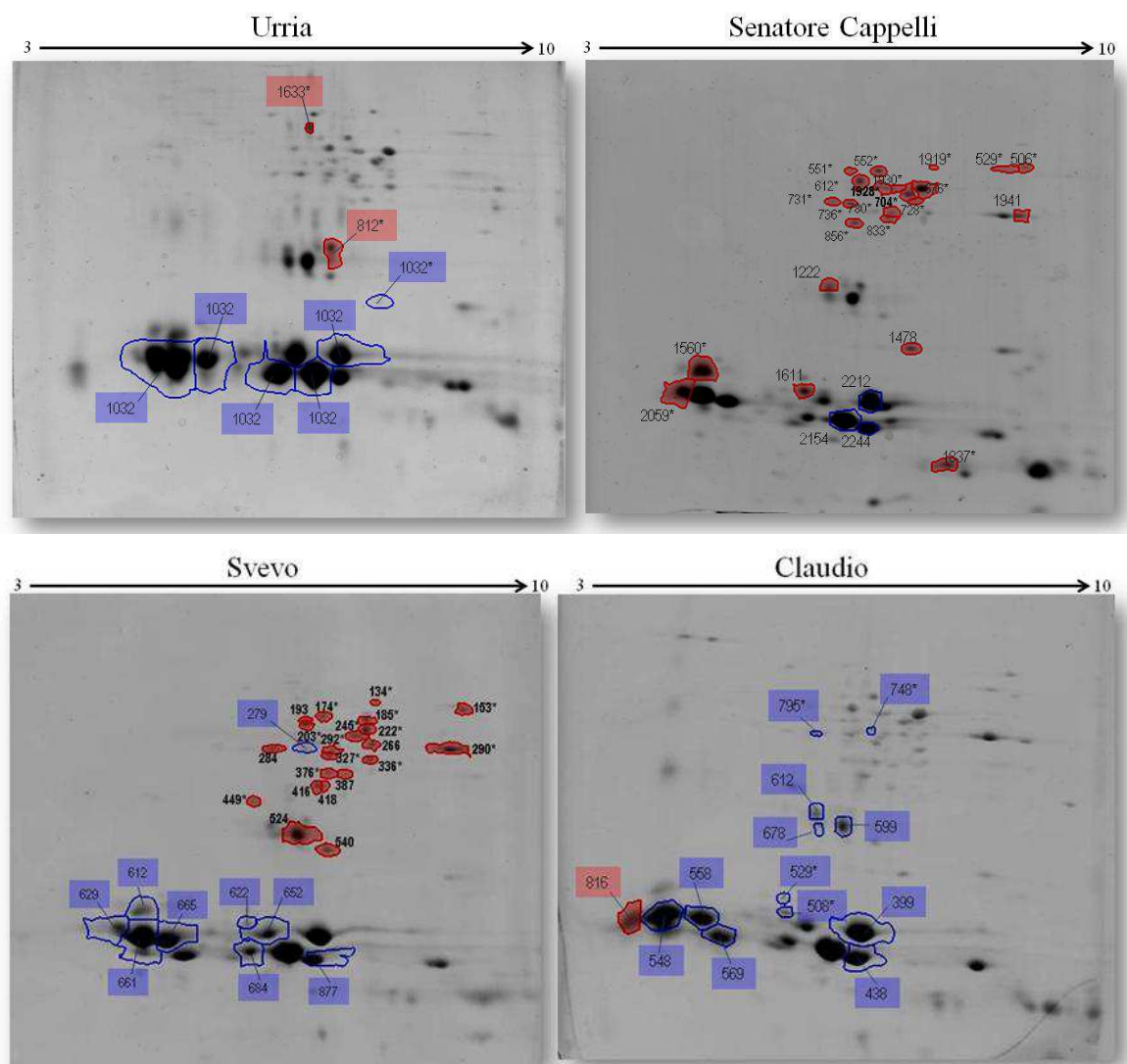


Fig. 38: Mappe 2D-PAGE delle proteine CM-like delle quattro varietà in studio: Svevo, Claudio, Urria e Senatore Cappelli. In blu vengono riportati gli spot sottoespressi e in rosso gli spot sovraespressi; l'asterisco indica i polipeptidi non identificati con MS.

Dall'analisi è risultato in primo luogo che le varietà Senatore Capelli e Svevo presentavano il maggior numero di spot differenzialmente espressi, mentre Urrià e Claudio mostravano un numero minore. Questo primo risultato non mostra un'associazione per quanto riguarda possibili differenze nell'accumulo dei polipeptidi tra le varietà di nuova o antica costituzione, come è stato trovato invece nella frazione metabolica. Gli spot presi in considerazione mostravano un valore di ANOVA e power ≤ 0.05 ; un q value ≥ 0.8 e un *fold-change* che varia tra 1,2 e 4,7; tutti parametri che indicano una buona attendibilità.

Considerando le quattro varietà, è risultato che il 61% dei polipeptidi è sopraespresso nel livello N3 e il 39% è sottoespresso. Inoltre, Claudio e Urrià rispondono maggiormente al livello più basso di azoto, mentre Svevo e Senatore Cappelli al maggiore.

Successivamente gli spot sono stati sottoposti all'analisi di spettrometria di massa. In Tabella 15 vengono riportate le proteine identificate con i relativi numeri di accessione e i valori di *coverage* e *score*. Sono stati identificati principalmente tre tipi di proteine: le γ - gliadine, gli inibitori di α amilasi e tripsina, e la superossidodismutasi.

γ - gliadine: queste proteine sono state identificate negli spot 266, 540, 524 della varietà di Svevo (sopraespressi); negli spot 599, 612, 678 della varietà Claudio (sottoespressi); e in 1222 nella varietà Senatore Cappelli (sopraespressa). Esse sono proteine di riserva e sono anche coinvolte nella celiachia ([Anderson et al., 2013](#)). La loro quantità può variare in seguito a stress termico ([Pompa et al., 2013](#)).

α -amylase/trypsininhibitor CM3: identificata negli spot 416, 622, 652, 418 nella varietà di Svevo; nello spot 399 nella varietà Claudio; nello spot 2212 nella varietà Senatore Cappelli e nello spot 1356 nella varietà Urrià; per la maggior parte risulta sottoespressa. Membri della famiglia degli inibitori delle α -amilasi sono presenti solo nei tessuti di riserva della cariosside (endosperma) ([Salcedo et al., 2011](#)). Questo tipo di inibitori è codificato da una famiglia multigenica con membri che si trovano su diversi cromosomi; in particolare sono stati assegnati ai bracci corti e lunghi dei cromosomi 3, 4, 6 e 7 dei genomi B e D ([Carbonero et al., 1999](#); [Islam et al., 2003](#)).

Questa proteina è nota come il principale allergene correlato con l'asma del panificatore ([Tatham and Shewry, 2008](#)). Inoltre studi riportano che la proteina CM3 può

legare IgE nei sieri di pazienti colpiti da dermatiti atopica o da asma del panificatore (Sander *et al.*, 2011, Kusaba-Nakayama *et al.*, 2000) e test cutanei in pazienti che presentavano allergie respiratorie hanno dato risultati positivi alle allergie alimentari al frumento (Larrè *et al.*, 2011). Gli inibitori delle α -amilasi/tripsina appartengono alla superfamiglia delle prolamine (Breitender and Radauer, 2004). Sono coinvolte nei meccanismi di difesa della pianta contro insetti e microorganismi (Svensson *et al.*, 2004). Il contenuto di inibitori delle α -amilasi/tripsina CM3 nel frumento può essere influenzato non solo dalla varietà, ma anche dalle pratiche agronomiche (Prandi *et al.*, 2013), inclusa la concimazione azotata.

Major allergen CM16: identificata negli spot 612, 629, 661 in Svevo e negli spot 816, 548 in Claudio, nella maggior parte dei casi sottoespressa. Corrisponde alla forma tetramericata dell'inibitore di α -amilasi/tripsina (WTAI) che può presentarsi sotto forma glicosilata, e ha un peso molecolare di 60KDa. E' conosciuta come il principale allergene del frumento, in particolare per il suo forte legame con le IgE dei pazienti che presentano l'asma del panificatore (Sanchez-Monge R. *et al.*, 1992). Nello specifico, la sua funzione molecolare è fermare, impedire o ridurre l'attività delle endopeptidasi a serina.

Superoxidedismutase [Cu-Zn]: identificata nello spot 622 nella varietà Svevo (sottoespressa) e nello spot 1611 nella varietà Senatore Cappelli (sopraespressa). Questa proteina si trova nel mitocondrio e la sua funzione è distruggere i radicali che sono normalmente prodotti all'interno delle cellule e che sono tossici per i sistemi biologici.

Endogenous α -amylase/subtilisininhibitor: identificata nello spot 1478 nella varietà Senatore Cappelli, risulta sopraespressa nel livello più alto del trattamento azotato. Come descritto nel paragrafo della frazione metabolica, questo enzima non è solitamente correlato con le allergie al frumento. E' conosciuta anche con il nome di WASI (WheatAmylase/SubtilisinInhibitor).

Alcuni studi riportano che inibitori di proteasi reagiscono con gli IgE dei sieri di pazienti che presentano l'asma del panificatore, ma non presentano alcuna reazione con gli IgE dei sieri di pazienti affetti da allergie alimentare al frumento, celiachia o allergie al polline delle *Graminaceae* (Costantin *et al.*, 2008).

Dimeric α -amylaseinhibitors: Le due forme dimeriche dell'inibitore dell' α amilasi 0.19 e 0.53, sono conosciute anche come WDAI (Wheat Dimeric Amylase Inhibitor). Entrambe sono state identificate come sottoesprese negli spot 684, 877, 665, 661 nella varietà Svevo, nello spot 438 nella varietà Claudio, 2244 nella varietà Senatore Cappelli. La loro funzione è stata descritta sopra, nel paragrafo α amylase/trypsin inhibitor per le proteine CM-like.

α -amylase/trypsin inhibitor CM2: Negli spot 629, 661 della varietà Svevo, nello spot 569 della varietà Claudio, nello spot 2154 della varietà Senatore Cappelli, negli spot 1175, 1140, 1144, 1167 della varietà Urrià, sono stati identificati questi polipeptidi come sottoespressi.

Nella figura 39 vengono riportate le funzioni molecolari dei polipeptidi identificati nella frazione CM-like.

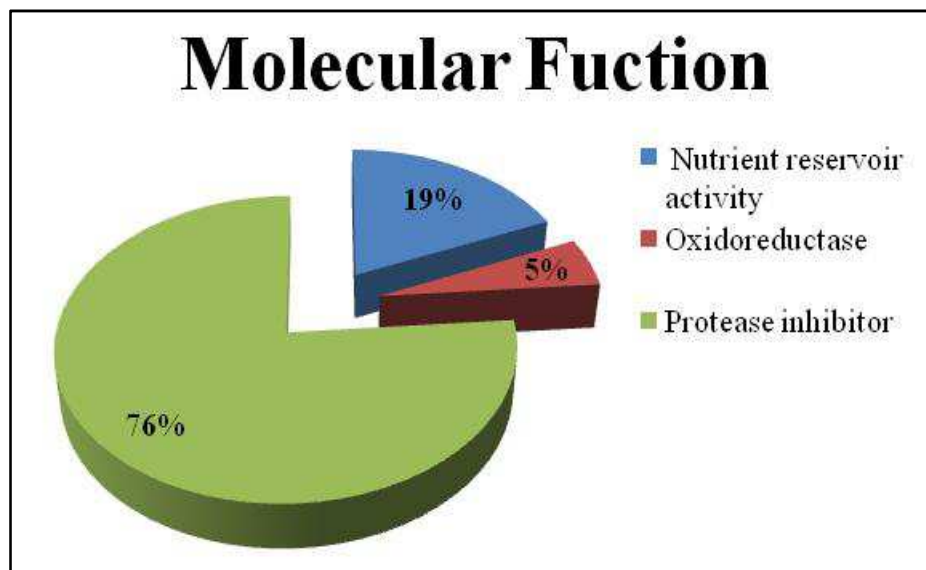


Fig 39: Funzioni molecolari dei polipeptidi identificati nella frazione CM-like come differenzialmente espressi

Spot	Anova	Proteina	Accession	Specie	Score	%Coverage	Fold	N1	N3
SVEVO									
449	5,83E-08	/					4,4		*
185	1,15E-07	/					4,1		*
222	4,05E-07	/					4,7		*
661	4,28E-07	Major allergen CM16	B5B0D5	Triticuma estivum	39,26	68,53	1,5	*	
		Alpha-amylase inhibitor 0.53	P01084	Triticuma estivum	26,72	58,06	1,5	*	
		Monomeric alpha-amylase inhibitor	A4ZIU6	Triticum urartu	10,69	26,45	1,5	*	
174	8,21E-07	/					3,2		*
290	1,1E-06	/					2,8		*
629	1,98E-06	Major allergen CM16	B5B0D5	Triticum aestivum	24,85	48,95	1,9	*	
	1,98E-06	Dimeric alpha-amylase inhibitor	I6PWK7	Triticum aestivum	8,35	32,08	1,9	*	
336	1,2E-05	/					3,2		*
416	1,43E-05	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	P17314	Triticum aestivum	20,19	33,33	3,3		*
684	1,93E-05	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2	P16851	Triticum aestivum	10,28	40	1,8	*	
	1,93E-05	0.19 dimeric alpha-amylase inhibitor	Q5UHH6	Triticum aestivum	9,12	31,45	1,8	*	
376	3,81E-05	/					2,5		*
327	5,67E-05	/					3,4		*
134	7,16E-05	/					2,8		*
245	9,84E-05	/					2,6		*
153	0,000714	/					2,3		*
540	0,00081	Gamma gliadin	A7XDG3	Triticum aestivum	23,41	21,38	1,7		*
266	0,000907	Gamma-gliadin	Q94G97	Triticum aestivum	10,28	14,06	2,1		*
292	0,000932	/					2,2		*
203	0,000113	/					2,4		*
612	0,000147	Major allergen CM16	B5B0D5	Triticum aestivum	22,48	45,45	1,3	*	
652	0,000314	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	P17314	Triticum aestivum	59,32	74,4	1,5	*	
877	0,00181	0.19 dimeric alpha-amylase inhibitor	Q5UHH6	Triticum aestivum	57,87	78,23	1,3	*	
622	0,00248	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	P17314	Triticum aestivum	17,58	47,02	1,4	*	
	0,00248	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	C3VQ50	Triticum aestivum	10,46	31,58	1,4	*	

279	0,00282	/					1,7	*
193	0,00378	/					1,9	*
284	0,00515	/					1,7	*
665	0,00571	0.19 dimeric alpha-amylase inhibitor	Q5MD68	Triticum aestivum	48,2	69,35	1,2	*
524	0,00635	Gamma gliadin	A7XDG3	Triticum aestivum	49,21	26,21	1,4	*
387	0,0078	/					1,8	*
418	0,00784	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	P17314	Triticum aestivum	29,96	47,02	2,1	*
CLAUDIO								
399	2,32E-06	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	P17314	Triticum aestivum	60,4	72,01	1,5	*
438	4,08E-06	0.19 dimeric alpha-amylase inhibitor	Q5UHH6	Triticum aestivum	58,2	78,23	1,3	*
508	8,6E-06	/					1,7	*
529	2,14E-05	/					2	*
569	7,59E-05	Monomeric alpha-amylase inhibitor	A4ZIU6	Triticum urartu	20,8	51,24	1,5	*
548	0,00015	Major allergen CM16	B5B0D5	Triticum aestivum	24,1	48,95	1,4	*
558	0,000289	0.19 dimeric alpha-amylase inhibitor	Q5MD68	Triticum aestivum	53,6	69,35	1,4	*
795	0,000414	/					1,7	*
612	0,00102	Gamma gliadin	A7XDG3	Triticum aestivum	16,7	21,38	1,4	*
748	0,00131	/					1,5	*
599	0,00156	Gamma gliadin	A7XDG3	Triticum aestivum	28,5	21,38	1,4	*
816	0,00283	Major allergen CM16	B5B0D5	Triticum aestivum	16,4	45,45	1,3	*
678	0,00475	Gamma gliadin	A7XDG3	Triticum aestivum	17,5	21,38	1,3	*
SENATORE CAPPELLI								
856	1,4E-06	/					2,2	*
1478	2,04E-05	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor	P16347	Triticum aestivum	29,62	72,22	1,8	*
612	5,87E-05	/					2,5	*
728	6,38E-05	/					2,1	*
506	0,000675	/					2,8	*
704	0,000791	/					2,3	*
2212	0,000954	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	P17314	Triticum urartu	50,6	69,05	1,4	*

1928	0,000151	/					1,8	*
552	0,000179	/					2,3	*
731	0,000261	/					1,7	*
1611	0,000312	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	C3VQ50	Triticum aestivum	18,36	36,18	1,3	*
736	0,000334	/					1,7	*
551	0,00106	/					1,9	*
833	0,00114	/					1,8	*
1919	0,00142	/					2,1	*
1837	0,00182	/					1,7	*
780	0,00225	/					1,9	*
2244	0,00246	0.19 dimeric alpha-amylase inhibito	Q5UHH6	Triticum aestivum	64,04	89,52	1,3	*
1930	0,00348	/					1,8	*
529	0,00403	/					2,4	*
676	0,00427	/					1,8	*
2059	0,00453	/					1,3	*
1222	0,00458	Gamma gliadin	A7XDG3	Triticum aestivum	20,07	26,21	1,5	*
2154	0,00487	Putative alpha-amylase inhibitor CM2	D2TGC2	Triticum aestivum	34,31	83,33	1,2	*
1560	0,00503	/					1,2	*
URRIA								
1144	2,08E-06	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2	P16851	Triticum aestivum	5,42	38,62	1,6	*
1140	2,1E-06	Dimeric alpha-amylase inhibitor	A4GFP2	Triticum dicoccoides	33,4	69,35	1,6	*
1175	3,1E-06	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2	P16851	Triticum aestivum	5,42	38,62	1,6	*
812	5,56E-05	/					1,9	*
1356	0,000236	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	P17314	Triticum aestivum	42,3	72,2	1,4	*
1167	0,000253	Alpha-amylase inhibitor	Q5I4D5	Aegilops speltoides	14,2	35,48	1,3	*
1032	0,0012	/					2,1	*
1633	0,00418	/					1,7	*

Tab. 15: Il simbolo / indica la non identificazione dei polipeptidi trovati su i corrispettivi spot.

5 CONCLUSIONI

Il frumento è ampiamente coltivato in quanto ha un'importanza notevole nell'alimentazione umana e animale. Nell'alimentazione umana vengono utilizzati principalmente gli sfarinati di frumento (farina e semola) per la produzione di un'ampia gamma di prodotti.

La versatilità del frumento nel dare origine a tanti prodotti diversi è principalmente dovuta alle frazione proteica degli sfarinati, composta da proteine del glutine, soprattutto con funzione di riserva, e proteine solubili, con funzione soprattutto metabolica e strutturale.

Purtroppo, accanto a questi lati positivi, il frumento presenta lati negativi, tra cui la capacità di scatenare intolleranze e vere e proprie allergie. Esso è infatti classificato tra gli sei cibi più allergenici.

Sin dai tempi degli antichi Romani, è conosciuta la patologia oggi nota come “asma del panificatore”, che colpisce nella maggior parte dei casi, i lavoratori coinvolti nei processi di lavorazione dei prodotti a base di frumento. Alle allergie di tipo respiratorio, si aggiungono anche quelle di tipo alimentare, tutte scatenate dalla frazione proteica presente negli sfarinati.

Sia le proteine del glutine che quelle solubili sono coinvolte in tali allergie, nonché anche in intolleranze, quali la celiachia, o la sensibilità al glutine. Sia allergie che intolleranze sembrano essere aumentate di frequenza negli ultimi decenni e, a questo riguardo, c'è una grande controversia riguardo alle possibili cause. Viene comunemente ritenuto che il miglioramento genetico abbia portato a un aumento del contenuto proteico dei genotipi di frumento, per cui le vecchie varietà di frumento, tra cui Senatore Cappelli è una di quelle maggiormente “in voga”, sarebbero più salubri. Inoltre, la Rivoluzione Verde ha determinato l'affermarsi di varietà di frumento altamente produttive e con una buona qualità tecnologica, dovuta all'alto tenore proteico, in presenza di interventi di fertilizzazione. Anche questo fattore viene comunemente invocato come causa dell'aumento delle reazioni avverse al frumento, in quanto, determinando un aumento del contenuto proteico, determinerebbe, a sua volta, un aumento delle patologie legate alla presenza delle proteine di frumento.

Queste considerazioni sono state la base di partenza del presente lavoro: il confronto tra genotipi di frumento duro di vecchia costituzione con quelli di nuova costituzione, sottoposti agli stessi interventi di concimazione azotata, allo scopo di monitorare gli effetti sulle caratteristiche qualitative e l'accumulo di allergeni.

Sebbene per ovvi motivi legati ai tempi e ai costi sperimentali ci si sia dovuti limitare ad analizzare solo 2 varietà di ogni gruppo, cresciuti in una singola località per due annate consecutive, e quindi con una valenza non generalizzabile, i risultati ottenuti ci permettono di fare le seguenti considerazioni:

Per quanto riguarda gli aspetti qualitativi:

Il contenuto proteico dei due frumenti duri di antica costituzione è maggiore rispetto a quello delle varietà di nuova costituzione. Ciò è stato recentemente confermato da [Kasarda \(2013\)](#).

Come atteso, il contenuto proteico aumenta all'aumentare della fertilizzazione azotata, indipendentemente dal fatto che le varietà di frumento duro siano di nuova o antica costituzione. Questo aumento del contenuto proteico è però variabile secondo l'annata di coltivazione.

I dati relativi al test di sedimentazione, correlato con la forza dell'impasto, mostrano che non vi è correlazione col contenuto proteico, dato che risulta sempre superiore nelle varietà di nuova costituzione, mostrando perciò che la qualità reologica non dipende solo dal contenuto proteico, ma anche dal tipo e l'organizzazione delle proteine del glutine, soprattutto delle subunità gluteniniche. Inoltre, queste ultime sono più abbondanti nelle varietà di nuova costituzione, in particolare quando viene applicata la fertilizzazione azotata più abbondante. L'opposto viene osservato nelle varietà di antica costituzione, nelle quali la fertilizzazione azotata è associata a un minor contenuto in subunità gluteniniche.

Per quanto riguarda la presenza di allergeni:

Il test ELISA, condotto utilizzando sieri di pazienti con allergie di tipo respiratorio, ha indicato che la quantità di polipeptidi immunogenici diminuisce con l'incremento del trattamento azotato in tutte le varietà considerate, sia relativamente alla frazione

metabolica che per la frazione *CM-like* (quest'ultima maggiormente correlata con tale patologia). Inoltre, è stata confermata anche la già nota alta variabilità della risposta soggettiva.

L'analisi proteomica infine ha mostrato che la concimazione azotata determina l'accumulo di un numero maggiore di polipeptidi appartenenti alle frazioni metabolica e *CM-like* al regime superiore di fertilizzazione azotata e che le proteine differenzialmente espresse corrispondono, nella maggior parte dei casi, ad allergeni noti.

In conclusione, questi risultati ci mostrano che, almeno nei genotipi qui considerati e nelle condizioni prese in esame, non ci sono dati a favore dell'ipotesi che i genotipi di vecchia costituzione contengano quantità inferiori di allergeni.

6 RINGRAZIAMENTI

Prima di tutto vorrei ringraziare la mia professoressa Stefania Masci per il supporto scientifico, per la fiducia e soprattutto per la sua infinita disponibilità.

Ringrazio il professore . Domenico Lafiandra per la sua disponibilità e i suoi consigli di natura scientifica.

Vorrei estendere la mia gratitudine anche al mio fratello Carlos per la collaborazione incondizionata e per i preziosi consigli.

Ringrazio i Dott. V.M.C. Moliterni e P. Laino (CRA-GPG di Fiorenzuola d'Arda (PC)) che mi hanno permesso di condurre gli esperimenti di Spettrometria di Massa.

Ringrazio il professore Giovanni Candiano per la sua disponibilità e i consigli di natura scientifica riguardo la tecnica 2D DIGE.

Ringrazio il professore Stefano Benedettelli e Lisetta Ghiselli per aver cresciuto e seguito le coltivazioni in campo oltre che per la loro disponibilità.

7. BIBLIOGRAFIA

Akagawa, M., Handoyo, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Morita, N., Suyama, K. 2007. Proteomic analysis of wheat flour allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (17): 6863-6870.

Altenbach Susan B, Charlene K Tanaka, William J Hurkman, Linda C Whitehand, William H Vensel and Frances M Dupont. 2011. Differential effects of a post-anthesis fertilizer regimen on the wheat flour proteome determined by quantitative 2-DE. *Proteome Science*. 2011. 9:46.

Anderson, O.D., Huo, N., Gu, Y.Q. 2013. The gene space in wheat: the complete γ -gliadin gene family from the wheat cultivar Chinese Spring. *Functional and Integrative Genomics*. 1-13.

Arentz Hansen, H., Mcadam, S.N., Molberg, O., Fleckenstein, B., Lundin, K.E.A., Jorgensen, T.J.D., Jung, G., Sollid, L.M. 2002. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*. 123 (3): 803-809.

Asero, R. 2005. Plant food allergies: A suggested approach to allergen-resolved diagnosis in the clinical practice by identifying easily available sensitization markers. *International Archives of Allergy and Immunology*. 138 (1): 1-11.

Asero, R., Ballmer-Weber, B.K., Beyer, K., Conti, A., Dubakiene, R., Fernandez-Rivas, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Vieths, S. 2007. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Molecular Nutrition and Food Research*. 51 (1): 135-147.

Autran, J.-C., Lew, E. J.-L., Nimmo, C. C., and Kasarda, D. D. 1979. N-terminal amino sequencing of prolamins from wheat and related species. *Nature*. 282: 527-529.

Baik BK, Ullrich SE. 2008. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *J Cereal Sci*. 48: 233-242.

Barlow, K.K., Butrose, M.S., Simmonds, D.H. and Vesik, M. 1973. The nature of the starch protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chem*. 50: 443-454.

Battais, F., Courcoux, P., Popineau, Y., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Denery-Papini, S. 2005. Food allergy to wheat: Differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *Journal of Cereal Science*. 42 (1): 109-117.

Battais, F., Pineau, F., Popineau, Y., Aparicio, C., Kanny, G., Guerin, L., Moneret-Vautrin, D.A., Denery-Papini, S. 2003. Food allergy to wheat: Identification of

immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical and Experimental Allergy*. 33 (7): 962-970.

Battais, F., Richard, C., Jacquenet, S., Denery-Papini, S., Moneret-Vautrin, D.-A. 2008. Wheat grain allergies: An update on wheat allergens. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. 40 (3): 67-76

Battais, F., Richard, C., Szustakowski, G., Denery-Papini, S., Moneret-Vautrin, D.A., Leduc, V., Guérin, L. 2006. Wheat flour allergy: An entire diagnostic tool for complex allergy. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. 38 (2): 59-61.

Beccari, J. B. 1745. De Frumento. De Bononiensi Scientarium et Artium. Instituto atque Academia Commentarii: Bologna 2: 122-127.

Belton, P.S. 1999. On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*. 29: 103-107.

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.

Bietz, J.A. and Wall, J.S. 1973. Isolation and characterization of gliadin-like subunits from glutenins. *Cereal Chem*. 50: 537-547.

Blake NK, Lehfelddt 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.

Bock, S.Allan, Muoz-Furlong, A., Sampson, H.A. 2001. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 107 (1): 191-193.

Bodinier, M., Brossard, C., Triballeau, S., Morisset, M., Guérin-Marchand, C., Pineau, F., Denery-Papini, S. 2008. Evaluation of an in vitro mast cell degranulation test in the context of food allergy to wheat. *International Archives of Allergy and Immunology*. 146 (4): 307-320.

Boggini C., Dal Belin Peruffo A., Mellini F., Pogna N.E. 1987. Storage protein composition, morphophysiological and quality characters of 24 old durum wheat varieties from Sicily. *Rachis* 6: 30-35.

Boyce, J.A., Assa'ad, A., Burks, A.W., Jones, S.M., Sampson, H.A., Wood, R.A., Plaut, M., Schwaninger, J.M. 2010. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 126 (6): 1105-1118.

Bozzini A., Corazza L., D'Egidio M.G., Di Fonzo N., La Fiandra D., Pogna N.E., Poma I., 1998. *Durum wheat*. In: Scarascia Mugnozza G.T. and Pagnotta M.A. Eds. *Italian contribution to plant genetics and breeding*, 181-194.

Breitender, H., and Radauer, C..2004. A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 113(5): 821-830.

Breiteneder, H., Ebner, C. 2000. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 106 (1 I): 27-36.

Brown AF., McKinnom D., Chu K. 2001. Emergency department anaphylaxis : a review of 142 patients in a single year. *J Allergy Clin Immunol*. 108:861-6.

Bushuk, W., and Zillman, R.R. 1978. Wheat cultivars identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus method and nomenclature. *Can. J. Plant Sci*. 58: 505-515.

Bustos D.M., Iglesias A.A. 2003. Phosphorylated Non-Phosphorylating Glyceraldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase from Heterotrophic Cells of Wheat Interacts with 14-3-3 Proteins. *Plant Physiology*. 133: 2081-2088.

Carbonero P., García-Olmedo F. 1999 A multi gene family of trypsin/ α -amylase inhibitors from cereals. In: Shewry PR, Casey R eds. *See proteins*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 617-33.

Cullinan, P., Cook, A., Nieuwenhuijsen, M.J., Sandiford, C., Tee, R.D., Venables, K.M., McDonald, J.C., Newman Taylor, A.J. 2001. Allergen and dust exposure as determinants of work-related symptoms and sensitization in a cohort of flour-exposed workers; A case-control analysis. *Annals of Occupational Hygiene*. 45 (2): 97-103.

Cutler, G.H. and Brinson, G.A. 1935. The granulation of whole wheat meal and a method of expressing it numerically. *Cereal Chem*. 12: 120-129.

D'Ovidio, R., Masci, S. 2004. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J. Cereal Sci*. 39: 321-339.

Darlington, H.F., Rouster, J., Hoffmann, L., Halford, N.G., Shewry, P.R. and Simpson, D.J. 2001. Identification and molecular characterisation of hordoinolines from barley grain. *Plant Mol. Biol*. 47: 785-794.

De Cillis E., 1927. *I grani d'Italia*. Tipografia della Camera dei Deputati, Roma.173.

Devaux, M.-F., Deschault de Monredon, F.L., Guibert, D., Novales, B. and Abecassis, J. 1998. Particle size distribution of break, sizing and middling wheat flours by laser diffraction. *J. Sci. Food Agric*. 78: 237-244.

Dewar, D., Pereira, P. S., Ciclitira, P. J. 2004. The pathogenesis of coeliac disease. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36: 17-24.

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.

Dick, J. W. and Quick, J. S. 1983. A modified screening test for rapid estimation of gluten strength in early-generation wheat breeding lines. *Cereal Chemistry*. 60:315-318.

Douliez, J.-P., Michon, T., Elmorjani, K., Marion, D. 2000. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *Journal of Cereal Science*. 32 (1): 1-20.

Dubcovsky J, Dvorak J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploidy wheat under domestication. *Sci*. 316: 1862-1866.

Dupont, F.M., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Altenbach, S.B. 2011. Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. *Proteome Science*. 9: 10.

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.

Ebo, D.G., Stevens, W.J. 2001. IgE-mediated food allergy - Extensive review of the literature *Acta Clinica Belgica*. 56 (4): 234-247.

Eckert R. L., Yaffe M. B., Crish J. F., Murthy S., Rorke E. A. and Welter J. F. 1993. Involucrin—Structure and Role in Envelope Assembly. *Journal of Investigative Dermatology*. 100: 613–617.

Ellis, H.J., Pollock, E.L., Engel, W., Fraser, J.S., Rosen-Bronson, S., Wieser, H., Ciclitira, P.J. 2003. Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease. *Gut*. 52: 212-217.

Ercoli, L., Arduini, I., Mariotti, M., Lulli, L., Masoni, A. 2012. Management of sulphur fertiliser to improve durum wheat production and minimise S leaching. *European Journal of Agronomy*. 38 (1): 74-82.

Evers, T. , Millart, S. 2002. Cereal grain structure and development: some implications for quality. *Journal of Cereal Science*. 36: 261-284.

Ferrari G. And Eng P.A. 2011. IgE-mediate food allergies in Swiss infants and children. *Swiss Medical Weekly*. 141 w13269.

Flæte, N.E.S., Hollung, K., Ruud, L., Sogn, T., Færgestad, E.M., Skarpeid, H.J., Magnus, E.M., Uhlen, A.K. 2005. Combined nitrogen and sulphur fertilisation and its effect on wheat quality and protein composition measured by SE-FPLC and proteomics. *Journal of Cereal Science*. 41 (3): 357-369.

Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*. 269 (2): 397-412.

Franken, J., Stephan, U., Meyer, H.E., Konig, W. 1994. Identification of alpha amylase inhibitor as a major allergen of wheat flour. *International Archives of Allergy and Immunology*. 104 (2): 171-174.

García-Olmedo F., Salcedo G. Sàanchez-Monge R., et al. 1992. Trypsin/alpha-amylase inhibitors and thionins: possible defence proteins from barley. In :Sehewry PR, editor. Berley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. Wallingford (United Kingdom): CAB International 335-50.

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.

Godovac-Zimmermann, J., Brown, L.R. 2003. Proteomics approaches to elucidation of signal transduction pathways. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 5 (3): 241-249.

Goyal, K., Walton, L.J., Tunnacliffe, A. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* 388 (1): 151-157.

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.

Hancock J. T., Henson D., Nvirenda M., Desikan R., Harrison J., Lewis M., Hughes J., Neill S. J. 2005. Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 828–835.

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.

Hischenhuber, C., Crevel, R., Jarry, B., Mäki, M., Moneret-Vautrin, D.A., Romano, A., Troncone, R., Ward, R. 2006. Review article: Safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 23 (5): 559-575.

Hurkman W.J., Vensel W.H., Tanaka C.K., Whitehand L., Altenbach S.B. 2009. Effect of high temperature on albumin and globulin accumulation in the endosperm proteome of the developing wheat grain. *Journal of Cereal Science*. 49: 12-23.

Hurkman, W.J., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Thilmony, R., Altenbach, S.B. 2013. Comparative proteomic analysis of the effect of temperature and fertilizer on gliadin and glutenin accumulation in the developing endosperm and flour from *Triticum aestivum* L. cv. Butte 86. *Proteome Science*. 11 (1): art. no. 8.

Ingram J., and D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47: 377-403.

Irar, S., Brini, F., Goday, A., Masmoudi, K., Pagès, M. 2010. Proteomic analysis of wheat embryos with 2-DE and liquid-phase chromatography (ProteomeLab PF-2D) - A wider perspective of the proteome. *Journal of Proteomics*. 73 (9): 1707-1721.

Islam, N., Tsujimoto, H., Hirano, H. 2003. Proteome analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat: Towards understanding genome interaction in protein expression. *Proteomics*. 3 (4): 549-557.

Jackson, E.A., Holt, L.M., Payne, P.I. 1983. Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localisation of their controlling genes. *Theor. Appl. Genet.* 66: 29-37.

Jacobs, J.H., Meijster, T., Meijer, E., Suarthana, E., Heederik, D. 2008. Wheat allergen exposure and the prevalence of work-related sensitization and allergy in bakery workers. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 63 (12): 1597-1604.

James, J.M., Sixbey, J.P., Helm, R.M., Bannon, G.A., Burks, A.W. 1997. Wheat α -amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 99 (2): 239-244.

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.

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.

Jolly, C.J., Glenn, G.M. and Rahman, S. 1996. GSP-1 genes are linked to the grain hardness locus (Ha) on wheat chromosome 5D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2408–2413.

Kader, J.-C. 1996. Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 47 (1): 627-654.

Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.-A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., Thevenin, F. 2001. Population study of food allergy in France. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 108 (1): 133-140.

Kano, H., Juji, F., Shibuya, N., Narita, M., Naritaka, S., Suko, M., Morita, Y., Iwata, T. 2000. Clinical courses of 18 cases with food-dependent exercise- induced anaphylaxis. *Japanese Journal of Allergology.* 49 (6): 472-478.

Kasarda, D.D., Autran, J.C., Lew, E.J.-L., Nimmo, C.C., and Shewry, R.P. 1983. N terminal amino acid sequences of ω -gliadins and ω -secalins; Implications for the evolution of prolamin genes. *Biochim. Biophys. Acta.* 747: 138-150.

Khatkar, B.S., Fido, R.J., Tatham, A. S., Schofield, J.D. 2002. Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality. *Journal of Cereal Science.* 35: 299-306.

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.

Kopferschmitt-Kubler, M.-C., Popin, E., Vervloet, D., Ameille, J., Pauli, G. 2003. L'observatoire national des asthmes professionnels. (The National Occupational Asthma Registry). *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 43 (1): 6-12.

Kreis, M., Forde, B.G., Rahman, S., Mifflin, B.J., Shewry, P.R. 1985. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *Journal of Molecular Biology.* 183 (3): 499-502.

Kusaba-Nakayama, M., Ki, M., Iwamoto, M., Shibata, R., Sato, M., Imaizumi, K. 2000. CM3, one of the wheat α -amylase inhibitor subunits, and binding of IgE in sera from Japanese with atopic dermatitis related to wheat. *Food and Chemical Toxicology*. 38 (2-3): 179-185.

Lafiandra, D., and Kasarda, D. D. 1985. One- and two-dimensional (two-pH) polyacrylamide gel electrophoresis in a single gel: Separation of wheat proteins. *Cereal Chemistry*. 62: 314–319.

Larré, C., Lupi, R., Gombaudo, G., Brossard, C., Branlard, G., Moneret-Vautrin, D.A., Rogniaux, H., Denery-Papini, S. 2011. Assessment of allergenicity of diploid and hexaploid wheat genotypes: Identification of allergens in the albumin/globulin fraction. *Journal of Proteomics*. 74 (8): 1279-1289.

Larré, C., Lupi, R., Gombaudo, G., Brossard, C., Branlard, G., Moneret-Vautrin, D.A., Rogniaux, H., Denery-Papini, S. 2011. Assessment of allergenicity of diploid and hexaploid wheat genotypes: Identification of allergens in the albumin/globulin fraction. *Journal of Proteomics*. 74 (8): 1279-1289.

Laurière, M., Pecquet, C., Bouchez-Mahiout, I., Snégaroff, J., Bayrou, O., Raison-Peyron, N., Vigan, M. 2006. Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis*. 54 (5): 283-289.

Leman, P., Goesart, H., Vandeputte, G.E., Lagrain, B., Delcour, J.A. 2005. Maltogenic amylase has a non-typical impact on the molecular and rheological properties of starch. *Carbohydrate Polymers*. 62 (3): 205-213

Letho M., Airaksinen L., Pustinen A. Et al. 2010. Thaumatin-like protein and baker's respiratory allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 104:139-146.

Loit, E., Melnyk, C.W., MacFarlane, A.J., Scott, F.W., Altosaar, I. 2009. Identification of three wheat globulin genes by screening a triticum aestivum BAC genomic library with cDNA from a diabetes-associated globulin. *BMC Plant Biology*. 9 , art. no. 93.

Londei, M., Ciacci, C., Ricciarelli, I., Vacca, L., Quarantino, S., Maiuri, L. 2005. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Molecular Immunology*. 42: 913-918.

Lorenzetti F., 2000. La semente ed il progresso dell'agricoltura. *Sementi elette* 2, 5-8.

MacGregor, E. Ann, Janeček, S., Svensson, B. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1546 (1): 1-20.

Marie A., Bellmer-Weber B.K., Vieths S. 2005. the oral allergy syndrome: improved diagnostic and treatment methods. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5:267-273

Martin M., Miceli F., Mosca G., Zerbi G. 1990. Influence of nitrose and timing of application on the yield of winter wheat varieties. *Agr. Med.* 120: 129-137.

Masci, S., Lafiandra, D., Porceddu, E., Lew, E.J.L., Tao, H.P., Kasarda, D.D. 1993. D glutenin subunits: N-Terminal sequences and evidence for the presence of cysteine. *Cereal Chem.* 70: 581-585.

McDonald J:C, Keynes H., Meredith S. 2000. Reported incidence of occupational asthma in the United Kingdom 1989-1997. *Occup. Environ Med.* 57:823-9

McFadden ES, Sears ER. 1946. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J Hered.* 37: 81-89.

Michell, S.L. 2012. A Better understanding of what makes some proteins "fat". *Journal of Bacteriology*. 194 (9): 2129-2130.

Miller HE, Rigelhof F, Marquart L. 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J Am Coll Nutr.* 19: 312S-319S.

Miller T.E., 1987. Systematic and evolution. Miller, T.E. (Ed.), Wheat breeding: its scientific basis. Chapman and Hall, London 1-30.

Mittag, D., Niggemann, B., Sander, I., Reese, I., Fiedler, E.-M., Worm, M., Vieths, S., Reese, G. 2004 . Immunoglobulin E-reactivity of wheat-allergic subjects (baker's asthma, food allergy, wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis) to wheat protein fractions with different solubility and digestibility. *Molecular Nutrition and Food Research*. 48 (5): 380-389.

Moneret-Vautrin, D.A., Flabbee, J., Morisset, M., Beaudouin, E., Kanny, G. 2004. Épidémiologie de l'anaphylaxie pré-létale et létale (Epidemiology of prelethal and lethal anaphylaxis) *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 44 (3): 315-322.

Morris CF, Greenblatt GA, Bettge AD, Malkawi HI. 1994. Isolation and characterization of multiple forms of friabilin. *J Cereal Sci.* 2: 167-174.

Morris, C.F. and Rose, S.P. 1996. Wheat. 3-54. In R.J. Henry and P.S. Kettlewell (Eds.) *Cereal grain quality*. Chapman and Hall, London.

Morrison, W.R. 1995. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Foods World*. 40: 43-46.

Mowat, A.McI. 2003. Coeliac disease - A meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet*. 361 (9365): 1290-1292.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with a clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255–262.

O’Gorman M., Beauvallet C., Lepercq P. David O., Seksik Ph., Beaugerie L., Doré J., Martin P., Bogard P., Juste C. 2007. An Investigation into Crohn’s Disease using the Progenesis SameSpots Analysis Platform. 24th *Journée Françaises de Spectrométrie de Masse*. PAU.

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.

Oøstergaard H., Rasmussen S.K., Roberts T.H., Hejgaard J. 2000. Inhibitory serpins from wheat grain with reactive centers resembling glutamine-rich repeats of prolamin storage proteins. Cloning and characterization of five major molecular forms. *Journal of Biological Chemistry*. 43: 33272-33279.

Osborne, T.B. 1924. The vegetable proteins.154. Longmans (Green & Co). London.

Palaci A., VArela J., et al., 2009. Ricombinantlipid transfer protein Tri a 14: a novel heat ant proteolytic resistant tool for the diagnosis of baker’s asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 39 (8): 1267-1276.

Palosuo, K. 2003. Update on wheat hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 3 (3): 205-209.

Pastorello, E.A., Farioli, L., Conti, A., Pravettoni, V., Bonomi, S., Iametti, S., Fortunato, D., Ortolani, C. 2007. Wheat IgE-mediated food allergy in european patients: α -amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins - Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *International Archives of Allergy and Immunology*. 144 (1): 10-22.

Payne, P. I. and Rhodes, A. P. 1982. *Encyclopaedia of Plant Physiology*, New Series (Springer, Berlin). 14A: 346-369.

Payne, P.I. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 141-153.

Payne, P.I., Corfield, K.G. 1979. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta.* 145: 83-88.

Payne, P.I., Holt, L.M., Jarvis, M.G., Jackson, E.A. 1985. Two dimensional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (*Triticum aestivum*): biochemical and genetic studies. *Cereal Chem.* 62: 319-326.

Payne, P.I., Holt, L.M., Lawrence, G.J., and Law, C.N. 1982. The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm. *Qual. Plant. Food Hum. Nutr.* 31: 229-241.

Peretz C., De Peter N., De Monchy J. Et al. 2005. assessment of exposure to wheat flour and the shape of its relationship with specific sensitization. *Scand. J. Work Environ. Health.* 31:65-74.

Pinckney, A. J.; Greenaway, W. T.; Zeleny, L. 1957: Further Developments in the Sedimentation Test for Wheat Quality. *Cereal Chern.* 34: 16-25.

Pogna, N. E., Autran, J. C., Mellini, F., Lafiandra, D., and Feillet, P. 1990. Chromosome 1B encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationship to gluten strength. *J. Cereal Science.* 11:15-34.

Pomeranz, Y. and Williams, P.C. 1990. Wheat hardness: its genetic, structural, and biochemical background, measurement, and significance. In: Y. Pomeranz (Ed.) *Advances in Cereal Science and Technology.* X: 288-289.

Pompa, M., Giuliani, M.M., Palermo, C., Agriesti, F., Centonze, D., Flagella, Z. 2013. Comparative analysis of gluten proteins in three durum wheat cultivars by a proteomic approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 61 (11): 2606-2617.

Poole JA, Barriga K, Leung DYM, Hoffman M, Eisenbarth GS, Rewers M, Norris JM. 2006. Timing of initial exposure to cereal grains and the risk of wheat allergy. *Pediatrics.* 117: 2175-2182.

Porceddu E., 1987. Evoluzione varietale e problemi attuali del miglioramento genetico dei cereali vernini. *Riv. Di Agron.* 21: 33-54.

Prandi, B., Faccini, A., Tedeschi, T., Galaverna, G., Sforza, S. 2013. LC/MS analysis of proteolytic peptides in wheat extracts for determining the content of the allergen amylase/trypsin inhibitor CM3: Influence of growing area and variety. *Food Chemistry* 140 (1-2): 141-146.

Prescott, S. and Allen, K.J. 2011. Food allergy: Riding the second wave of the allergy epidemic *Pediatric. Allergy and Immunology*. 22 (2): 155-160

Rasanen, L., Lehto, M., Turjanmaa, K., Savolainen, J., Reunala, T. 1994. Allergy to ingested cereals in atopic children. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 49 (10): 871-876.

Rasmussen S.K., Klausen J., Hejgaard J., Svensson B., Svendsen I. 1996. Primary structure of the plant serpin BSZ7 having the capacity of chymotrypsin inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1297: 127-130.

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

Salcedo, G., Quirce, S., Diaz-Perales, A. 2011. Wheat allergens associated with Baker's asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 21 (2): 81-92.

Sampson, H.A. 1999. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 103 (5 II): 717-728.

Sampson, H.A. 2003a. Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics* 111 (6 III): 1601 1608.

Sampson, H.A. 2005 .Food allergy - Accurately identifying clinical reactivity. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Supplement 60 (79): 19-24.

Sampson, R.J. 2003b. The neighborhood context of well-being. *Perspectives in Biology and Medicine*. 46 (3 SUPPL.): S53-S64.

Sánchez-Monge, R., García-Casado, G., López-Otín, C., Armentia, A., Salcedo, G. 1997. Wheat flour peroxidase is a prominent allergen associated with baker's asthma. *Clinical and Experimental Allergy* .27 (10): 1130-1137.

Sanchez-Monge, R., Gomez, L., Barber, D., Lopez-Otin, C., Armentia, A., Salcedo, G. 1992. Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. Glycosylated subunits of the α amylase-inhibitor family have enhanced IgE-binding capacity. *Biochemical Journal*. 281 (2): 401-405.

Sander, I., Rozynek, P., Rihs, H.-P., Van Kampen, V., Chew, F.T., Lee, W.S., Kotschy-Lang, N., Raulf-Heimsoth, M. 2011. Multiple wheat flour allergens and cross-reactive carbohydrate determinants bind IgE in baker's asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* . 66 (9): 1208-1215.

Sandiford, C.P., Nieuwenhuijsen, M.J., Tee, R.D., Newman Taylor, A.J. 1994. Measurement of airborne proteins involved in Bakers' asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. 24 (5): 450-456.

Sandiford, C.P., Tatham, A.S., Fido, R., Welch, J.A., Jones, M.G., Tee, R.D., Shewry, P.R., Newman Taylor, A.J. 1997. Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clinical and Experimental Allergy*. 27 (10): 1120-1129.

Sapone, A., Bai, J. C.; Ciacci, C.; Dolinsek, J.; Green, P. H.; Hadjivassiliou, M.; Kaukinen, K.; Rostami, K.; Sanders, D. S.; Schumann, M.; Ullrich, R.; Villalta, D.; Volta, U.; Catassi, C.; Fasano, A. 2012. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on nomenclature and classification. *BMC Med*. 10: 13.

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.

Schofield, J. D. 1994. Wheat proteins: structure and functionality in milling and breadmaking. In. *Wheat production, properties and quality* (ed. W. Bushuk & V. F. Rasper) , 72–106. London: Chapman & Hall.

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 Sicco. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 192: 124-129.

Shewry P. R. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*. 60: 1537–1553.

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, P.R., Popineau, Y., Lafiandra, D., Belton, P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science and Technology*. 11: 433-441.

Shewry, P.R., Halford, N.G. 2002. Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*. 53 (370): 947-958.

Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S. 1995. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell* , 7: 945-956.

Shewry, P.R., Tatham, A.S. 1997. Biotechnology of wheat quality. *J. Sci. Food Agric*. 73: 397-406.

Sicherer, S.H. 2011 Epidemiology of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 127 (3): 594-602

Sicherer, S.H., Morrow, E.H., Sampson, H.A. 2000. Dose-response in double-blind, placebo controlled oral food challenges in children with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 105 (3): 582-586.

Sicherer, S.H., Sampson, H.A. 2006. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117 (2 SUPPL. 2): S470-S475+S489.

Simmonds, D.H., Barlow, K.K. and Wrigley, C.W. 1973. The biochemical basis of grain hardness in wheat. *Cereal Chem.* 50: 553-562.

Skylas, D. J., Mackintosh, J. A., Cordwell, S. J., Walsh, B. J., Harry, J., Blumenthal, C., Copeland, L., Wrigley, C. W., and Rathmell, W. G. 2000. Proteome approach to the characterisation of protein composition in the developing and mature wheat-grain endosperm. *J. Cereal Sci.* 52: 169-188.

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.

Svensson B, Ekelund K, Ogura H & Christiansson A. 2004. Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *Int Dairy J.* 14: 17-27.

Symes, K.J. 1965. The inheritance of grain hardness in wheat as measured by the particle size index. *Austr. J. Cereal Res.* 16: 113-123.

Symes, K.J. 1969. Influence of a gene causing hardness on the milling and baking quality of two wheats. *Aust. J. Cereal Res.* 20: 971-979.

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.

Tatham, A.S., Shewry, P.R. 2008. Allergens to wheat and related cereals. *Clinical and Experimental Allergy.* 38: 1712-1726.

Tétard-Jones, C., Shotton, P.N., Rempelos, L., Cooper, J., Eyre, M., Orr, C.H., Leifert, C., Gatehouse, A.M.R. 2013. Quantitative proteomics to study the response of wheat to contrasting fertilisation regimes. *Molecular Breeding.* 31 (2): 379-393.

Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology.* 50: 571-599.

Thompson, S., Bishop, D.H.L., Madgwick, P., Tatham, A.S., Shewry, P.R. 1994. High-level expression of a wheat LMW glutenin subunit using a baculovirus system. *J. Agricultural and Food Chemistry*. 42: 426-31.

Tippless, K.H., Kilborn, R.H. and Presto, K.R. 1994. Bread-wheat quality defined. 25-35. In Bushuk and Rasper (eds.) *Wheat: production, properties and quality*. Blackie Academic and Professional. Chapman and Hill, Glasgow, U.K.

Tunnacliffe A, Wise MJ. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*. 94: 791–812.

Vensel, W.H., Dupont, F.M., Sloane, S., Altenbach, S.B. 2011. Effect of cleavage enzyme, search algorithm and decoy database on mass spectrometric identification of wheat gluten proteins. *Phytochemistry*. 72: 1154-61.

Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Cai, N., Wong, J.H., Buchanan, B.B., Hurkman, W.J. 2005. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics*. 5: 1594–1611.

Wang J. and Sampson H.A. 2007. Food Anaphylaxis. *Clinical and Experimental Allergy*. 37:651-660.

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.

Weiss, W., Huber, G., Engel, K.-H., Pethran, A., Dunn, M.J., Gooley, A.A., Görg, A. 1997. Identification and characterization of wheat grain albumin/globulin allergens. *Electrophoresis*. 18 (5): 826-833.

Woods, R.K., Abramson, M., Bailey, M., Walters, E.H. 2001. International prevalences of reported food allergies and intolerances. Comparisons arising from the European community respiratory health survey (ECRHS) 1991-1994. *European Journal of Clinical Nutrition*. 55 (4): 298-304.

Woychik, J. H., Boundy, J. A. and Dimler, R. J. 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys*. 94: 477-482.

Wrigley, C.W. 1970. Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis: Application to the study of genotypic variations in wheat gliadins. *Biochem. Genet*. 4: 509-516.

Wrigley, C.W. 1982. Lawrence, G.J., and Shepherd, K.W. Association of glutenin subunits with gliadin composition and grain quality in wheat. *Aust. J. Plant Physiol*. 9: 15-30

- Wrigley, C.W.** 1996. Giant proteins with flour power. *Nature*. 381: 738-739.
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP.** 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*. 181: 777-794.
- Ziegler, P.** 1999. Cereal beta-amylases. *Journal of Cereal Science*. 29 (3): 195-204.
- Zohary D, Feldman M.** 1962. Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat. (*Aegilops-Triticum*). Group. *Evolution* 16: 44-61.
- Zuidmeer L, Goldhahn K, et al.** 2008 The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 121(5): 1210-1218.e1214.

