

SEBASTIAN GASPARIS**ANNA NADOLSKA-ORCZYK**

Zakład Genomiki Funkcjonalnej

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Genetyczne uwarunkowania twardości ziarna pszenicy i pszenżyta

Genetic background of wheat and triticale grain hardness

Twardość ziarna pszenicy heksaploidalnej *T. aestivum* jest cechą determinowaną między innymi przez geny puroindolinowe *Pina* i *Pinb*. Geny te kodują białka puroindolinowe PINA i PINB, które akumulowane są w endospermie na powierzchni ziaren skrobiowych. Geny *Pina* i *Pinb* występują w genomie D pszenicy heksaploidalnej oraz w genomach pszenic diploidalnych, natomiast pszenica tetraploidalna o genomie AABB nie posiada tych genów. Ortologi genów puroindolinowych występują również u innych gatunków zbóż i wykazują ponad 90% podobieństwo z sekwencją kodującą genów *Pin* pszenicy. U żyta i pszenżyta heksaploidalnego są to geny sekaloindolinowe *Sina* i *Sinb*, które zlokalizowane są w genomie żytnim R. Ze względu na swoje znaczenie, cecha twardości ziarna pszenicy jest obiektem badań od ponad kilkudziesięciu lat. Pierwsze istotne doniesienia na temat dziedziczności tej cechy pojawiły się już w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku. Natomiast od końca lat dziewięćdziesiątych nastąpił znaczny postęp w tym obszarze, gdy w badaniach wykorzystano nowoczesne metody inżynierii genetycznej. W ramach tych badań ustalono sekwencje genów puroindolinowych i ich promotorów, scharakteryzowano ich zróżnicowanie alleliczne i profile ekspresji. W znacznym stopniu ustalono również strukturę białek puroindolinowych i mechanizm ich działania.

Słowa kluczowe: pszenica, pszenżyto, puroindoliny, sekaloindoliny, twardość ziarna

Grain hardness of hexaploid wheat *T. aestivum* is controlled by puroindoline genes *Pina* and *Pinb*. They encode puroindoline proteins PINA and PINB which are accumulated on starch granule surface in the endosperm. Genes *Pina* and *Pinb* are located in genome D of hexaploid wheat and in other genomes of diploid wheat species. Both genes are absent in tetraploid wheat with genome AABB. Orthologs of puroindoline genes were detected in other cereal species and showed above 90% similarity of coding sequences with *Pin* genes. Secaloindoline genes are orthologs of puroindolines in rye and hexaploid triticale and are located in genome R. In regard of its importance, wheat grain hardness has been studied from the second half of the last century. However, significant progress in this area started at the end of the last century when the advanced genetic engineering techniques were applied. As a result of this research the coding sequences of puroindoline genes and their promoters were determined as well as the allelic variation and the structure of puroindoline proteins.

Key words: grain hardness, puroindolines, secaloindolines, triticale, wheat

WSTĘP

Twardość ziarna pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) jest jedną z najważniejszych cech, decydujących o właściwościach technologicznych mąki i końcowej jakości produktu. Cecha ta ma bezpośredni wpływ na wartość przemiałową, wypiekową, wielkość cząstek mąki i zdolność do absorpcji wody. Mąka z ziarna miękkiego zawiera więcej nieuszkodzonych ziaren skrobi i nadaje się do wypieku ciast i ciastek. Z kolei ziarno twarde daje mąkę z większą ilością uszkodzonych ziaren skrobi i o większej zdolności do absorpcji wody, przez co nadaje się ona do produkcji pieczywa (Dubreil i in., 1998a; Igrejas i in., 2001).

Cecha ta różnicuje odmiany pszenicy zwyczajnej na typy o twardym i miękkim ziarnie. Ziarno pszenicy tetraploidalnej typu durum (*Triticum turgidum* ssp. *durum* L.) jest twardsze niż ziarno pszenicy zwyczajnej i wykorzystywane jest głównie do produkcji makaronów.

Genetyczne podłoże twardości ziarna pszenicy zostało dość dobrze poznane i opisane w literaturze. Symes (1965) jako jeden z pierwszych prowadził badania nad dziedzicznością tej cechy. Porównując wskaźnik wielkości cząstek mąki PSI (particie size index) w krzyżówkach odmian miękkich i twardych, dowiódł on, że twardość ziarna determinowana jest pojedynczym *locus*. Law i in. (1978) zlokalizowali *locus* twardości *Ha* (*Hardness*) na krótszym ramieniu chromosomu 5D. W przełomowej pracy, Greenwell i Schofield (1986) zidentyfikowali białko wielkości 15 kDa, jako biochemiczny marker twardości. Analiza ponad 150 różnych odmian pszenicy wykazała, że białko to wyizolowane z oczyszczonej frakcji skrobi występuje w dużych ilościach u odmian miękkich, w bardzo małych ilościach u odmian twardych, natomiast u pszenicy twardej typu durum stwierdzono jego brak.

Kolejne badania dotyczące białka 15 kDa, zwanego friabiliną lub GSP (Grain Softness Protein) potwierdzają, że jego akumulacja w endospermie warunkowana jest przez *locus Ha*, a także, że jest to białko złożone, zbudowane z dwóch podjednostek puroindolinowych (Jolly i in., 1993; Blochet i in., 1993; Rahman i in., 1994; Gautier i in., 1994). W pierwszych pracach dotyczących związku wspomnianego białka 15 kDa z twardością ziarna, autorzy używają nazwy friabilina i GSP zamiennie. Obecnie termin friabilina odnosi się do białka kodowanego przez geny puroindolinowe, natomiast GSP do białka kodowanego przez gen *GSP-1* (Morris, 2002).

Obecnie wiadomo, że tekstura endospermy ziarna determinowana jest przez geny puroindolinowe *Pina* i *Pinb*. Geny te wraz z genem *Gsp-1* tworzą *locus Ha* i u pszenicy zwyczajnej zlokalizowane są na chromosomie 5DS. Geny *Pina* i *Pinb* kodują białka puroindolinowe — PINA i PINB, które są podjednostkami friabiliny — białka o masie 13 kDa. W ziarnach miękkich friabilina występuje na powierzchni ziaren skrobiowych. Allele typu dzikiego genów *Pin* — *Pina-D1a* i *Pinb-D1a* decydują o powstawaniu ziaren miękkich, natomiast ziarno twarde jest efektem mutacji jednego lub obydwu genów (Giroux i Morris, 1998). Geny puroindolinowe występują również u diploidalnych gatunków pszenicy, natomiast nieobecne są w genomie pszenicy tetraploidalnej *T.*

turgidum ssp. *durum* (Gautier i in., 2000). Obecność ich ortologów stwierdzono również u innych gatunków zbóż z plemion *Avenae* i *Triticeae*.

W niniejszej pracy przedstawiamy podsumowanie najnowszych badań dotyczących genów i białek puroindolinowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich korelacji z twardością ziarna i właściwościami technologicznymi pszenicy i pszenżyta.

WYSTĘPOWANIE GENÓW PUROINDOLINOWYCH U PSZENICY

Geny puroindolinowe występują u wszystkich przebadanych dotychczas diploidalnych gatunków pszenic z rodzaju *Triticum* i *Aegilops* w genomach A^m, C, D, M, S, U. Wśród tych gatunków geny puroindolinowe *Ae. tauschii* wykazują największe podobieństwo (do 100%) z sekwencją nukleotydową i aminokwasową puroindolin pszenicy zwyczajnej (Gautier i in., 2000). U pozostałych gatunków podobieństwo sekwencji aminokwasowych wynosi od 95,9% do 96,6% dla PINA i od 90,5% do 93,2% dla PINB (Lillemo i in., 2002). U pszenic tetraploidalnych obecność genów *Pin* potwierdzono u dwóch gatunków: *Ae. ventricosa* w obu genomach D^v i N^v (Gazza i in., 2006) oraz *T. timopheevii* w genomie A (Li i in., 2008), natomiast u pszenic tetraploidalnych posiadających genomy A i B (*T. turgidum* ssp. *durum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*) geny *Pin* nie występują, a ich ziarno klasyfikowane jest jako bardzo twarde (Gautier i in., 2000). Utrata genów puroindolinowych u tych gatunków jest najprawdopodobniej konsekwencją poliploidyzacji, która wystąpiła w trakcie rozwoju ewolucyjnego. U *T. turgidum* powstałej w wyniku hybrydyzacji pomiędzy *T. urartu* (genom AA) i jednym z gatunków z sekcji *Sitopsis* (prawdopodobnie *Ae. speltoides* — genom BB) stwierdzono delecję dużych obszarów *locus Ha* w genomach A i B o długości odpowiednio około 50 kbp i 37 kbp (Chantret i in., 2005). U pszenicy heksaploidalnej *T. aestivum* *locus Ha* w genomie A i B jest mniejszy o odpowiednio 75,7 i 77 kbp w porównaniu z *locus Ha* w genomie D. Analiza zakonserwowanych sekwencji znajdujących się w obrębie miejsc delecji wykazała obecność skróconych retroelementów w obydwu genomach. Chantret i in. (2005) wskazują na udział tych retroelementów w delecji fragmentów *locus Ha* na drodze nieuprawnionej rekombinacji, przy czym proces ten wystąpił w genomie A i B niezależnie od siebie. Geny puroindolinowe zostały wprowadzone do *T. aestivum* wraz z genomem D w trakcie hybrydyzacji pomiędzy *T. turgidum* (genom BBAA) a *Ae. tauschii* (genom DD). Przemawia za tym 100% homologia sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych puroindolin u *T. aestivum* i *Ae. tauschii*.

CHARAKTERYSTYKA GENÓW PUROINDOLINOWYCH

Analiza klonów BAC u *T. aestivum*, *T. monococcum* i *Ae. tauschii* pozwoliła na dokładną charakterystykę sekwencji znajdujących się w obrębie *locus Ha*. Region ten, oprócz genów *Pinb*, *Pina* i *Gsp-1* zawiera również dwie dodatkowe, zdegenerowane kopie genu *Pinb* oraz dwie sekwencje kodujące o bliżej nieokreślonej funkcji (Chantret i in., 2005). Geny puroindolinowe *Pina* i *Pinb* mają postać pojedynczych egzonów o długości

447 pz. Podobieństwo sekwencji kodujących wynosi 70,2%, a sekwencji 3'UTR około 54% (Gautier i in., 1994).

Analiza sekwencji promotorowych wskazuje na obecność kluczowych elementów regulatorowych w obszarze pomiędzy -210 a -388 powyżej kodonu start, które warunkują ekspresję genów w endospermie. Najważniejszym z tych elementów jest zakonserwowany motyw TGAGAAAAG obecny w obydwu promotorach (w pozycji -203 w promotorze *Pina* i -223 w promotorze *Pinb*). Motyw ten wykazuje podobieństwo do sekwencji zwanej endosperm box: TG(T/A/C)AAA(A/G)(G/T). Jest to jeden z dwóch elementów motywu prolamin box, który występuje w promotorach większości genów białek zapasowych zbóż, specyficznych dla endospermy (Digeon i in., 1999; Lillemo i in., 2002).

ZRÓŻNICOWANIE ALLELICZNE GENÓW PUROINDOLINOWYCH

Jak wspomniano wcześniej, fenotyp o miękkim ziarnie wymaga obecności w genomie obydwu alleli genów *Pin* typu dzikiego. Ziarno twarde powstaje w wyniku mutacji w jednym lub obydwu genach *Pin*. Odmiany pszenicy zwyczajnej określane jako twarde wykazują różny stopień twardości ziarna. W zależności od rodzaju mutacji przyjmuje on wartości pośrednie pomiędzy pszenicą miękką a pszenicą twardą typu durum. Z kolei u odmian z delecją obydwu genów *Pin* poziom twardości ziarna jest znacznie wyższy, podobny do poziomu twardości pszenicy twardej typu durum (Tranquilli i in., 2002).

Zgodnie z nomenklaturą stosowaną w Catalogue of Gene Symbols for Wheat (McIntosh i in., 2005) allele genów *Pin* oznaczane są kolejną literą alfabetu dodawaną do pełnej nazwy genu tj. *Pina-D1* i *Pinb-D1*. Allele typu dzikiego, dla których wzorcem jest odmiana Chinese Spring oznaczone są jako *Pina-D1a* i *Pinb-D1a*. Dotychczas u *T. aestivum* i *Ae. tauschii* zidentyfikowano 18 zmutowanych alleli genu *Pina* oraz 24 allele genu *Pinb*. Mutacje te obejmują delecję genów, polimorfizm pojedynczych nukleotydów prowadzący do substytucji aminokwasów oraz insercje, delecje i substytucje, których skutkiem jest przesunięcie ramki odczytu i przedwczesny kodon stop (przeгляд w Bhave i Morris, 2008; Nadolska-Orczyk i in., 2009). Wśród dotychczas przebadanych populacji pszenic najczęściej występującymi allelami są *Pinb-D1b* i *Pina-D1b*. Mutacja w pierwszym z nich jest związana z substytucją glicyny na serynę w białku PINB w pozycji 46. Efektem mutacji jest mniejsza zawartość friabiliny w endospermie skrobiowej i większa twardość ziarna, która przyjmuje wartości pośrednie pomiędzy twardością ziaren miękkich i bardzo twardech (Giroux i Morris, 1997, 1998). Allelem *Pina-D1b* oznaczono mutację polegającą na delecji genu *Pina*. Jej efektem jest brak białka PINA i niska zawartość białka PINB w endospermie skrobiowej. Odmiany z tą mutacją wytwarzają ziarno twarde, o wartości zbliżonej do twardości pszenicy durum (Giroux i Morris 1998, Lillemo i Morris, 2000).

Przeanalizowane dotąd dwie polskie odmiany, Kontesa i Torca posiadają allel typu dzikiego genu *Pina* (*Pina-D1a*), natomiast gen *Pinb* obu odmian występuje w postaci allelu *Pinb-D1c* (Gasparis i in., 2011). Zgodnie z badaniami Lillemo i Morris (2000) mutacja w tym allelu skutkuje zamianą aminokwasu leucyny na prolinę w kodowanym białku, a rośliny wytwarzały ziarno średnio twarde lub twarde. Jak w wyniku z naszych badań (Gasparis, 2012), mimo stwierdzenia tych samych alleli genów *Pin* w obu analizowanych

odmianach, różniły się one wyraźnie twardością ziarna. Indeks twardości u Torki jest typowy dla odmian o średniej twardości ziarna, natomiast Kontesa wytwarza ziarno miękkie.

EKSPRESJA GENÓW *PIN* W TKANKACH NASION

Ekspresja genów *Pin* wykazuje specyficzność tkankową i podlega regulacji w trakcie rozwoju nasion. Liczne obserwacje wskazują, że akumulacja transkryptów genów *Pin* zachodzi już w początkowym okresie rozwoju nasion, a jej intensywność stopniowo wzrasta i osiąga maksimum w środkowym stadium rozwoju endospermy. Hybrydyzacja northern całkowitego RNA wyizolowanego z dojrzewających nasion wykazała, że akumulacja obu transkryptów następuje od 8. dnia po zapyleniu, po czym znacząco wzrasta pomiędzy 15–18 DPA (z ang. days post anthesis), osiągając maksimum między 26–33 DPA i zanika całkowicie po 40 DPA (Gautier i in., 1994; Hogg i in., 2004). Tendencję tę, z niewielkimi różnicami, potwierdziła również bardziej czuła analiza, wykorzystująca ilościową reakcję RT-PCR (Amoroso i in., 2004).

Mimo podobnego profilu ekspresji, poziom transkryptu poszczególnych genów *Pin*, jak i zawartość białek puroindolinowych był różny. Analiza porównawcza jednoznacznie wskazuje, że u odmian miękkich (*Pina-D1a* / *Pinb-D1a*) poziom transkryptu genu *Pina* i zawartość białka PINA jest wyższa niż poziom odpowiednio, transkryptu *Pinb* i białka PINB (Gautier i in., 1994; Giroux i Morris, 1997; Turnbull i in., 2003; Amoroso i in., 2004; Hogg i in., 2004; Gazza i in. 2005; Ikeda i in., 2005). Różnice w zawartości białek puroindolinowych zaobserwowane u odmian twardych nie zawsze skorelowane są z poziomem mRNA poszczególnych genów *Pin*. Giroux i Morris (1997) dowiedli, że u odmian twardych ze zmutowanym allelem *Pinb-D1b* (mutacja punktowa powodująca zamianę aminokwasu) poziom transkryptu *Pina* i *Pinb* był taki sam jak u odmian miękkich. Podobne wyniki uzyskali Amoroso i in. (2004). W analizie ilościowej qRT-PCR porównali oni dodatkowo odmiany z delecją genu *Pina* (*Pina-D1b* / *Pinb-D1a*). Również u tych odmian ilość transkryptu *Pinb* była na tym samym poziomie jak u odmian miękkich i twardych z mutacją *Pinb-D1b*. Pszenice miękkie i twarde różniły się jednak zawartością białka PINB, która u odmian twardych była niższa. Turnbull i in. (2000) wykazali, że zawartość białek PINA i PINB jest nieznacznie lub wyraźnie większa u pszenic miękkich niż u pszenic twardych *Pina-D1a* / *Pinb-D1b*, natomiast zawartość PINB jest zdecydowanie mniejsza u pszenic twardych z delecją genu *Pina* (*Pina-D1b* / *Pinb-D1a*). Ekspresję genów *Pin* i zawartość białek puroindolinowych badano również w polskich odmianach pszenicy jarej, Kontesa i Torka (Gasparis i in., 2011). Profile ekspresji genów *Pina* i *Pinb* wyznaczone na podstawie analizy ilościowej qRT-PCR nie różniły się znacząco od dotychczas opisanych w literaturze. U obu odmian maksymalny poziom ekspresji genów *Pin* następował pomiędzy 20. a 26 dniem po zapyleniu. Na podstawie analizy SDS-PAGE oszacowano również zawartość białek puroindolinowych. U odmian tych nie stwierdzono różnic pomiędzy zawartością białka PINA i PINB, mimo iż posiadają one zmutowany allel genu *Pinb* (*Pina-D1a* / *Pinb-D1c*). Może to świadczyć o tym, że mutacja ta nie wpływa na poziom akumulacji białka PINB w endospermie.

Jak wspomniano wcześniej, promotory obydwu genów *Pin* posiadają specyficzne elementy regulatorowe kontrolujące przebieg ekspresji w tkankach nasion. Dotychczasowe badania potwierdzają, że ekspresja genów *Pin* u pszenicy zachodzi wyłącznie w dojrzewających nasionach (Dubreil i in., 1998 b). Nie stwierdzono obecności transkryptów *Pin* w kiełkujących siewkach (Gautier i in., 1994). Wiley i in. (2007) badali aktywność promotorów *Pin* w różnych tkankach pszenicy wykorzystując gen reporterowy *uidA*. Analiza histochemiczna GUS wykazała ekspresję tego genu jedynie w endospermie skrobiowej nasion. Nie stwierdzono jej w zarodku ani w organach wegetatywnych, jak korzeń, liść oraz generatywnych, to jest załązni, pylnikach czy w pyłku. Gen reporterowy *uidA* pod kontrolą promotora *Pinb* wykazywał podobny wzór ekspresji w nasionach transgenicznych roślin pszenicy oraz ryżu (Digeon i in., 1999; Evrard i in., 2007). Inaczej było w przypadku promotora *Pina* w transgenicznym ryżu, który nie posiada ortologów genów *Pin*. Jego aktywność zaobserwowano, poza nasionami, również w innych organach, to jest w korzeniach, liściach i w różnych elementach kwiatu. Ponadto promotor *Pina* u tych roślin indukowany był poprzez patogena i zranienie tkanki (Evrard i in., 2007).

Immunodetekcja białek puoroindolinowych w nasionach wskazuje, że ich akumulacja następuje przede wszystkim w części skrobiowej bielma oraz w warstwie aleuronowej (Gautier i in., 1994; Dubreil i in., 1998 b; Digeon i in., 1999; Capparelli i in., 2005; Wiley i in., 2007; Feiz i in., 2009).

GENY SEKALOINDOLINOWE U PSZENŻYTA

Pierwotne pszenżyto heksaploidalne (*x Triticosecale* Wittmack) jest gatunkiem syntetycznym powstałym przez skrzyżowanie pszenicy tetraploidalnej z żytem ($2n = 6x = 42$, AABBRR).

Ziarno większości pierwotnych form pszenżyta klasyfikowane jest jako miękkie (Li i in. 2006), podobnie jak ziarno żyta (Williams, 1986).

Jak wspomniano wcześniej, geny sekaloindolinowe występują w genomie żytnim na chromosomie 5RS. W dotychczasowej literaturze bardzo mało jest danych dotyczących zróżnicowania allelicznego tych genów. Gautier i in. (2000) wykazali obecność genu sekaloindoliny w genomie żyta poprzez jego amplifikację przy użyciu starterów specyficznych dla sekwencji kodującej gen *Pina*. Gen oznaczony później jako *Sina-R1a* wykazuje 100% homologii z sekwencją allelu dzikiego *Pina-D1a*. Simeone i Lafiandra (2005) zidentyfikowali u żyta dwa allele sekaloindoliny b oznaczone jako *Sinb-R1a* i *Sinb-R1b*. Oba wykazują podobieństwo do sekwencji kodującej *Pinb-D1a* na poziomie 93,1%. Li i in. (2006) jako pierwsi zidentyfikowali u pszenżyta allel *Sina-R1b* z substytucją tryptofanu na argininę w pozycji 44 oraz allel *Sinb-R1c* z substytucją dwóch aminokwasów i insercją cysteiny w peptydzie sygnałowym. Massa i Morris (2006) scharakteryzowali sekwencję aminokwasową sekaloindoliny a u żyta, która zawierała substytucję argininy na glutaminę w pozycji 65. Zgodnie ze stosowaną nomenklaturą allel ten powinien być oznaczony jako *Sina-R1c*.

W badaniach nad funkcją genów *Sin* u pszenżyta po raz pierwszy zastosowano nowoczesną technologię wyciszania genów, bazująca na interferencji RNA (RNAi).

Pozwoliła ona na uzyskanie szeregu linii odmiany Wanad z wyciszoną ekspresją genów *Sina* i *Sinb* (Gasparis, 2012). Ten silny spadek ekspresji wiązał się z bardzo małą ilością lub brakiem sekaloindolin. Nie stwierdzono większych różnic w twardości ziarna pomiędzy wyciszanymi liniami i liniami kontrolnymi. Nie wykazano również korelacji pomiędzy obniżeniem zawartości lub brakiem sekaloindolin a wzrostem twardości ziarna badanych linii pszenżyta.

CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK PUROINDOLINOWYCH I SEKALOINDOLINOWYCH

Badania nad strukturą i biologiczną funkcją białek puroindolinowych rozpoczęły się pod koniec lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku, wraz z odkryciem friabiliny jako markera twardości ziarna u pszenicy (Greenwell i Schofield, 1986). Od tamtej pory w wielu laboratoriach podjęto prace badawcze nad biologiczną funkcją puroindolin (Glenn i Saunders, 1990; Oda i in., 1992; Jolly i in., 1993; Rahman i in., 1994; Bettge i in., 1995; Greenblatt i in., 1995), ich strukturą (Blochet i in., 1993; Jolly i in., 1993; Morris i in., 1994; Gautier i in., 1994; Le Bihan i in., 1996; Oda i Schofield, 1997) oraz wpływem twardości ziarna na właściwości technologiczne mąki i jakość produktów końcowych (Morris, 1992; Bettge i Morris, 2000; Campbell i in., 2007; Dubreil i in., 1998 a; Hogg i in., 2005). Chociaż stan wiedzy na temat białek puroindolinowych wzrósł znacząco w ciągu ostatnich kilkunastu lat, to jednak niektóre aspekty związane z ich funkcją wciąż wymagają wyjaśnienia.

Nazwa białek puroindolinowych jest połączeniem słów puro (z gr. puros — pszenica) i indoline — od pierścienia indolowego w tryptofanie (Blochet i in., 1993). Należą one do dużej grupy białek posiadających zdolność wiązania lipidów. U roślin wyróżnia się kilka rodzin tych białek m. in. tioniny, białka transportujące lipidy (LTP) oraz indoliny (Douliet i in., 2000). Puroindoliny są białkami zasadowymi (pI 10,5 dla PINA i 10,7 dla PINB), rozpuszczalnymi w wodzie i bogatymi w reszty cysteinowe. Występują w postaci dwóch izoform — puroindoliny a i puroindoliny b, obie o masie około 13 kDa, zbudowane ze 148 aminokwasów o 60% podobieństwie sekwencji (Gautier i in. 1994). Cechą charakterystyczną puroindolin (i innych białek z tej grupy) jest tzw. szkielet cysteinowy, złożony z dziesięciu reszt cysteinowych oraz domena tryptofanowa zawierająca pięć reszt tryptofanowych u puroindoliny a (WRWWKWWK) i trzy reszty tryptofanowe u puroindoliny b (WPTKWWK). Motywy te są zakonserwowane w grupie białek indolinowych, a szkielet cysteinowy pokrywa się również częściowo z podobną strukturą u białek ns-LTP (z ang. non-specific lipid transfer proteins) (Gautier i in., 1994). Puroindoliny syntetyzowane są w postaci prekursorów, które mogą ulegać przekształceniom potranslacyjnym. Wskazuje na to obecność N- i C-końcowych peptydów zawierających miejsce rozcięcia. N-końcowy fragment o długości 28–29 reszt zawiera peptyd sygnałowy i miejsce rozcięcia w pozycji 19. C-końcowy fragment złożony z 4 reszt aminokwasowych jest identyczny u PINA i PINB co sugeruje, że oba białka mogą podlegać tej samej obróbce potranslacyjnej. Le Bihan i in. (1996) analizowali strukturę białek puroindolinowych wykorzystując spektroskopię w podczerwieni i spektroskopię Ramana. Drugorzędowa struktura puroindolin uzależniona jest od pH środowiska, w którym

znajdują się te białka i przy pH równym 7,0, 30% tej struktury ma postać α -helisy, 30% postać β -harmonijki, a pozostałe 40% jest w postaci nieuporządkowanej. Przewidywana struktura trzeciorzędowa obejmuje cztery α -helisy oddzielone pętlami, stabilizowane pięcioma mostkami dwu-siarczkowymi między resztami cysteiny. Domena tryptofanowa zlokalizowana jest w pętli pomiędzy helisą H1 a H2 i jest częściowo odsłonięta. Strukturalnie puroindoliny wykazują pewne podobieństwa do niespecyficznych białek transportujących lipidy — ns-LTP. U roślin zidentyfikowano dwie klasy tych białek nsLTP1 i nsLTP2 o masie odpowiednio 9 kDa i 7 kDa. Posiadają one szkielet cysteinowy zawierający osiem reszt cysteiny, a ich strukturę trzeciorzędową tworzą cztery α -helisy stabilizowane czterema mostkami dwu-siarczkowymi. Białka ns-LTP nie posiadają domeny tryptofanowej (Douliez i in., 2000). Podobieństwo strukturalne puroindolin i ns-LTP wiąże się zapewne z podobnymi właściwościami tych białek, wśród których najważniejszą jest zdolność wiązania lipidów, oraz pewne właściwości antybiotyczne. Mimo wielu danych na temat biochemicznych właściwości białek puroindolinowych, mechanizm ich działania w regulacji twardości ziarna nie jest do końca wyjaśniony. Ziarno miękkie powstaje, gdy oba białka puroindolinowe kodowane są przez allele dzikie *Pina-D1a* i *Pinb-D1a*. Zidentyfikowane dotychczas mutacje genów puroindolinowych skutkują najczęściej zwiększeniem twardości ziarna. Również prace wykorzystujące transformację genetyczną z udziałem genów *Pin* potwierdzają ich rolę w powstawaniu miękkiej endospermy. Wprowadzenie dzikich alleli genów puroindolinowych do roślin ryżu (Krishnamurthy i Giroux 2001) i do mutantów pszenicy o twardym ziarnie (Beecher i in., 2002; Hogg i in., 2004; Martin i in., 2006; Wanjugi i in. 2007) powodowało znaczące obniżenie twardości ziarna w tych roślinach. W badaniach nad funkcją genów puroindolinowych zastosowano również technikę RNAi (ang. RNA interference) pozwalającą na wyciszenie ekspresji badanego genu. Potranskrypcyjne wyciszenie ekspresji genów *Pin* u pszenicy zwyczajnej skutkowało obniżeniem zawartości białek puroindolinowych w endospermie i znacznym wzrostem twardości ziarna (Gasparis i in., 2011). Jak wspomniano wcześniej, immunodetekcja białek PIN wykazała ich akumulację głównie w endospermie na powierzchni ziaren skrobiowych oraz w warstwie aleuronowej. Związane jest to ze zdolnością białek puroindolinowych do wiązania fosfolipidów i wnikania w błonę fosfolipidową ziaren skrobi. Według niektórych badaczy obecność białek puroindolinowych na powierzchni ziaren skrobi przeciwdziała przyleganiu do nich białkowego matriks, co skutkuje luźniejszą strukturą endospermy i w rezultacie bardziej miękkim ziarnem. Sugestie te wydają się potwierdzać zdjęcia preparatów skrobi wykonane skaningowym mikroskopem elektronowym. U odmian o twardym ziarnie, ziarna skrobi mają nieregularną powierzchnię, do której przylegają skupiska białkowej matriks i są ściślej upakowane. Natomiast u odmian o miękkim ziarnie, ziarna skrobi są gładkie, wyraźnie oddzielone od białkowej matriks i są luźniej upakowane (Beecher i in., 2002; Chen i in., 2005).

W badaniach dotyczących mechanizmu wiązania białek puroindolinowych z błonami lipidowymi wyróżniono obecność reszt tryptofanowych, oddziaływania elektrostatyczne i zasadowy charakter puroindolin, jako główne czynniki sprzyjające wspomnianej interakcji. Najważniejszym z tych czynników jest niewątpliwie oddziaływanie hydrofobowe

między domeną tryptofanową a węglowodorowymi łańcuchami cząsteczek lipidów (Kooijman i in., 1997; Wall i in., 2010). Rola tryptofanu w tym oddziaływaniu wynika z jego właściwości fizycznych (Yau i in., 1998). Zdolność wiązania lipidów jest silniejsza u PINA niż u PINB, co prawdopodobnie związane jest z mniejszą liczbą reszt tryptofanowych (3 zamiast 5) w domenie tryptofanowej u PINB (Dubreil i in., 1997). PINB wykazuje natomiast większe powinowactwo do fosfolipidów o ujemnym ładunku, ponieważ jego ładunek dodatni jest większy niż u PINA. Obydwa białka silniej wiążą się z ujemnie naładowanymi błonami bakteryjnymi niż z neutralnymi błonami komórek eukariotycznych, co potwierdza udział oddziaływań elektrostatycznych jako dodatkowej siły wzmacniającej powinowactwo puroindolin do fosfolipidów (Douliez i in., 2000; Jing i in., 2003). Ponadto Charnet i in. (2003) wykazali zdolność puroindoliny a do formowania kanałów jonowych zarówno w sztucznych, jak i biologicznych błonach fosfolipidowych. Ze względu na zdolność białek puroindolinowych do dekompozycji błon fosfolipidowych, wykazują one pewne właściwości cytotoksyczne względem grzybów i bakterii (Dubreil i in., 1998 b; Krishnamurthy i in., 2001; Jing i in., 2003; Capparelli i in., 2005; Luo i in., 2008; Palumbo i in., 2010). Stąd ich pierwotną funkcją wydaje się być udział w reakcjach obronnych na infekcję patogenów.

Białka sekaloindolinowe wykazują wysokie podobieństwo do sekwencji puroindolin pszenicy, a charakterystyczne elementy tych białek, jak domena tryptofanowa i motyw zawierający 10 reszt cysteiny są identyczne u obu gatunków. Podobna budowa pozwala przypuszczać, że białka sekaloindolinowe mogą mieć analogiczny wpływ na strukturę endospermy i twardość ziarna, jak puroindoliny u pszenicy. Jednak uzyskane do tej pory wyniki badań są niejednoznaczne, a czasami sprzeczne. Li i in. (2006) analizowali twardość ziarna u 171 linii pszenżyta z kolekcji CIMMYT. Na podstawie indeksu twardości SKCS, 70,8% testowanych linii sklasyfikowano jako miękkie, 19,3% jako pośrednie i 9,9% jako twarde. Dalsza analiza zawartości friabiliny u wybranych 30 linii, w tym 10 twardych, 9 pośrednich i 11 miękkich wykazała, że linie miękkie charakteryzowały się wysoką zawartością fraibiliny we frakcji skrobi, natomiast u linii twardych zawartość friabiliny była wyraźnie niższa.

Korelacji pomiędzy zawartością fraibiliny a twardością ziarna nie potwierdzają z kolei Ramirez i in. (2003) po przetestowaniu ośmiu odmian pszenżyta. Różnice te mogą jednak wynikać z zastosowania przez obu autorów odmiennej metodyki izolacji białek. Budak i in. (2004) badali linie substytucyjne pszenżyta Presto z podstawionymi chromosomami z genomu D pszenicy heksaploidalnej. Zamiana chromosomu 5R na 5D pochodzącego z odmiany twardej pszenicy zwyczajnej wyraźnie zwiększyła twardość ziarna, co potwierdza udział *locus Ha* w kształtowaniu tej cechy u pszenżyta.

Nie ustalono dotychczas, czy mutacje genów sekaloindolinowych mogą mieć wpływ na fenotyp ziarna, ponieważ żadna z tych mutacji nie warunkuje jednoznacznie ziarna twardego. Ponadto mutacje tych genów nie pokrywają się z mutacjami genów puroindolinowych pszenicy heksaploidalnej, dlatego nie można porównać efektu fenotypowego. Zidentyfikowane przez Li i in. (2006) allele *Sina-R1b* i *Sinb-R1c* występują zarówno u linii miękkich i twardych. Allel *Sina-R1b* kodujący białko SINA z substytucją tryptofanu na argininę w poz. 44 występował u linii miękkich pszenżyta. Co ciekawe,

podobna substytucja występująca w białku PINB (kodowanym przez allel *Pinb-D1d*) u pszenicy, warunkuje powstawanie ziaren twardych (Lillemo i Morris 2000). Niewiele wiadomo na temat pozostałych zmian w sekwencji białka SINB. Część substytucji aminokwasowych jest nieistotna z punktu widzenia ich właściwości fizykochemicznych, niektóre występują również u gatunków pszenic diploidalnych, jednak są to gatunki o miękkim ziarnie (Simeone i Lafiandra 2005). Sekwencje genów *Sina* i *Sinb*, które scharakteryzowano u polskiej odmiany pszenżyta — Wanad, różnią się od dotychczas poznanych sekwencji u żyta i pszenżyta (Gasparis, 2012).

PODSUMOWANIE

Jak wspomniano wcześniej, twardość ziarna pszenicy ma istotny wpływ na właściwości fizyczne mąki i jakość wytwarzanych z niej produktów. Cecha ta odgrywa również duże znaczenie u innych gatunków zbóż korelując z jakością ziarna, wpływając na jego przetwarzanie, a w przypadku jęczmienia na słodowanie czy łuszczenie. Nieliczne prace wskazują również na jej związek z odpornością na czynniki biotyczne (grzyby, bakterie). W krajach zachodnich twardość jest jednym z najważniejszych wskaźników jakości zbóż. Stąd tak duże znaczenie ma wiedza na temat genetycznych uwarunkowań kształtujących tę cechę. Jak wynika z badań, twardość ziarna pszenicy jest w głównej mierze kontrolowana przez dwa geny *Pin* znajdujące się w jednym *locus* lub przez ortologi tych genów u innych gatunków. U zbóż alloheksaploidalnych jak pszenica, pszenżyto, owies *locus* twardości znajduje się tylko w jednym z genomów diploidalnych. A więc jest to cecha przekazywana w prosty sposób, a co za tym idzie powinna być w sposób prosty kontrolowana w procesie hodowlanym. Ze względu na ważność cechy oraz postęp w badaniach, warto wykorzystać tę wiedzę do charakterystyki polskich odmian i materiałów hodowlanych głównie pszenicy, ale i innych zbóż jak jęczmień, pszenżyto czy owies. Pozwoli na bardziej precyzyjny dobór materiałów hodowlanych i uzyskanie odmian o przewidywanych właściwościach, zgodnych z oczekiwaniami producentów żywności i konsumentów.

LITERATURA

- Amoroso M. G., Longobardo L., Capparelli R. 2004. Real time RT-PCR and flow cytometry to investigate wheat kernel hardness: role of puroindoline genes and proteins. *Biotechnol. Lett* 26: 1731 — 1737.
- Beecher B., Bettge A., Smidansky E., Giroux M. J. 2002. Expression of wild-type PinB sequence in transgenic wheat complements a hard phenotype. *Theor. Appl. Genet.* 105: 870 — 877.
- Bettge A. D., Morris C. F. 2000. Relationships among grain hardness, pentosan fractions and end-use quality of wheat. *Cereal Chem.* 77: 241 — 247.
- Bettge A. D., Morris C. F., Greenblatt G. A. 1995. Assessing genotypic softness in single wheat kernels using starch granule associated friabilin as a biochemical marker. *Euphytica* 86: 65 — 72.
- Bhave M., Morris C. F. 2008. Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. *Plant Mol. Biol.* 66: 205 — 219.
- Blochet J-E., Chevalier C., Forest E., Pebay-Peyroula E., Gautier M. F., Joudrier P., Pezolet M., Marion D. 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cysteine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett.* 329: 336 — 340.

- Budak H., Baenziger P. S., Beecher B. S., Graybosch R. A., Campbell B. T., Shipman M. J., Erayman M., Eskridge K. M. 2004. The effect of introgressions of wheat D-genome chromosomes into 'Presto' triticale. *Euphytica* 137: 261 — 270.
- Campbell J. B., Martin J. M., Crutcher FD, Meyer F, Clark DR and Giroux MJ. 2007. Effects on soft wheat (*Triticum aestivum* L.) quality of increased puroindoline dosage. *Cereal Chem.* 84: 80 — 87.
- Capparelli R., Amoroso M. G., Palumbo D., Iannaccone M., Faleri C., Cresti M. 2005. Two plant puroindolines colocalize in wheat seed and in vitro synergistically fight against pathogens. *Plant Mol. Biol.* 58: 857 — 867.
- Chantret N., Salse J., Sabot F., Rahman S., Bellec A., Laubin B., Dubois I., Dossat C., Sourdille P., Joudrier P., Gautier M.-F., Cattolico L., Beckert M., Aubourg S., Weissenbach J., Caboche M., Bernard M, Leroy P., Chalhouh B. 2005. Molecular basis of evolutionary events that shaped the Hardness *locus* in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* 17: 1033 — 1045.
- Charnet P., Molle G., Marion D., Rousset M., Lullien-Pellerin V. 2003. Puroindolines form ion channels in biological membranes. *Biophys J.* 84: 2416 — 2426.
- Chen M., Wilkinson M., Tosi P., He G., Shewry P. 2005. Novel puroindoline and grain softness protein alleles in *Aegilops* species with the C, D, S, M and U genomes. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1159 — 1166.
- Digeon J.-F., Guiderdoni E., Alary R., Michaux-Ferrière N., Joudrier P., Gautier M-F. 1999. Cloning of a wheat puroindoline gene promoter by IPCR and analysis of promoter regions required for tissue-specific expression in transgenic rice seeds. *Plant Mol. Biol.* 39: 1101 — 1112.
- Doulliez 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. *J. Cereal Sci.* 32: 1 — 20.
- Dubreil L., Compoin J. P., Marion D. 1997. Interaction of puroindoline with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *J. Agric. Food Chem.* 45: 108 — 116.
- Dubreil L., Meliande S., Chiron H., Compoin J-P., Quillien L., Branlard G., Marion D. 1998 a. Effect of puroindolines on the bread making properties of wheat flour. *Cereal Chem.* 75: 222 — 229.
- Dubreil L., Gaborit T., Bouchet B., Gallant D. J, Broekaert W. F, Quillien L, Marion D. 1998 b. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non-specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Sci.* 138: 121 — 135.
- Evrard A., Meynard D., Guiderdoni E., Joudrier P., Gautier M-F. 2007. The promoter of the wheat puroindoline-a gene (PinA) exhibits a more complex pattern of activity than that of the PinB gene and is induced by wounding and pathogen attack in rice. *Planta* 255: 287 — 300.
- Feiz L., Wanjugi H. W., Melnyk C. W., Altossar I., Martin J. M., Giroux M. J. 2009. Puroindolines co-localize to the starch granule surface and increase seed bound polar lipid content. *J. Cereal Sci.* 50: 91 — 98.
- Gasparis S., Orczyk W., Zalewski W., Nadolska-Orczyk A. 2011. The RNA-mediated silencing of one of the Pin genes in allohexaploid wheat simultaneously decreases the expression of the other, and increases grain hardness. *J. Exp. Bot.* 62: 4025 — 4036. DOI:10.1093/jxb/err103.
- Gasparis S. 2012. Analiza genów *Pina* i *Pinb* determinujących twardość ziarna u heksaploidalnej pszenicy i ich ortologów u pszenżyta. Praca doktorska. IHAR — PIB Radzików.
- Gautier M.-F., Aleman M.-E., Guirao A., Marion D., Joudrier P. 1994. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol. Biol.* 25: 43 — 57.
- Gautier M.-F., Cosson P., Guirao A., Alary R., Joudrier P. 2000. Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid *Triticum species*. *Plant Sci.* 153: 81 — 91.
- Gazza L., Conti S., Taddei F., Pogna N. E. 2006. Molecular characterization of puroindolines and their encoding genes in *Aegilops ventricosa*. *Mol. Breed.* 17: 191 — 200.
- Gazza L., Nocente F., Ng P. K. W., Pogna N. E. 2005. Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivars lacking puroindoline a. *Theor. Appl. Genet.* 110: 470 — 478.
- Giroux M. J., Morris C. F. 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 M. J., Morris C. F. 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.
- Glenn G. M., Saunders R. M. 1990. Physical and structural properties of wheat endosperm associated with grain texture. *Cereal Chem.* 67: 176 — 182.
- Greenblatt G. A., Bettge A. D., Morris C. F. 1995. The relationship among endosperm texture, friabilin occurrence, and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chem.* 72: 172 — 176.
- Greenwell P., Schofield J. D. 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chem.* 63: 379 — 380.
- Hogg A. C., Sripo T., Beecher B., Martin J. M., Giroux M. J. 2004. Wheat puroindolines interact to form friabilin and control wheat grain hardness. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1089 — 1097.
- Hogg A. C., Beecher B., Martin J. M., Meyer F. D., Talbert L. E., Lanning S., Giroux M. J. 2005. Hard wheat milling and bread baking traits affected by the seed-specific overexpression of puroindolines. *Crop Sci.* 45: 871 — 878.
- Igrejas G., Gaborit T., Oury F-X., Chiron H., Marion D., Branlard G. 2001. Genetic and environmental effects on puroindoline-a and puroindoline-b content and their relationship to technological properties in French bread wheats. *J. Cereal Sci.* 34: 37 — 47.
- Ikeda TM, Ohnishi N, Nagamine T, Oda S, Hisatomi T, Yano H. 2005. Identification of new puroindoline genotypes and their relationship to flour texture among wheat cultivars. *J. Cereal Sci.* 41: 1 — 6.
- Jing W., Demcoe A. R, Vogel H. J. 2003. Conformation of a bactericidal domain of puroindoline a: structure and mechanism of action of a 13-residue antimicrobial peptide. *J. Bacteriol* 185: 4938 — 4947.
- Jolly C. J, Rahman S., Kortt A. A., Higgins T. J. V. 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.
- Kooijman M., Orsel R., Hessing M., Hamer J. R, Bekkers A. C. A. P. A. 1997. Spectroscopic characterisation of the lipid-binding properties of wheat puroindolines. *J. Cereal Sci.* 26: 145 — 159.
- Krishnamurthy K., Giroux M. J. 2001. Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness. *Nat. Biotechnol.* 19: 162 — 166.
- Krishnamurthy K., Balconi C., Sherwood J. E, Giroux M. J. 2001. Wheat Puroindolines Enhance Fungal Disease Resistance in Transgenic Rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1255 — 1260.
- Law C. N., Young C. F., Brown J. W. S., Snape J. W., Worland J. W. 1978. The study of grain protein control in wheat using whole chromosome substitution lines. In: *Seed Protein Improvement by Nuclear Techniques*, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria: 483 — 502.
- Le Bihan T., Blochet J. E., Desormeaux A., Marion D., Pezolet M. 1996. Determination of the secondary structure and conformation of puroindolines by infrared and Raman spectroscopy. *Biochemistry* 35: 12712 — 12722.
- Li G., He Z., Pena R J., Xia X., Lillemo M., Qixin S. 2006. Identification of novel secaloindoline-a and secaloindoline-b alleles in CIMMYT hexaploid triticales lines. *J. Cereal Sci.* 43: 378 — 386.
- Li W., Li H., Gill B. S. 2008. Recurrent deletions of puroindoline genes at the grain hardness *locus* in four independent lineages of polyploid wheat. *Plant Physiol.* 146: 200 — 212.
- Lillemo M., Morris C. F. 2000. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1100 — 1107.
- Lillemo M., Simeone M. C., Morris C. F. 2002. Analysis of puroindoline a and b sequences from *Triticum aestivum* cv. “Penawawa” and related diploid taxa. *Euphytica* 126: 321 — 331.
- Luo L., Zhang J., Yang G., Li Y., Kexiu L., He G. 2008. Expression of puroindoline a enhances leaf rust resistance in transgenic tetraploid wheat. *Mol. Biol. Rep.* 35: 195 — 200.
- Martin J., Meyer F., Smidansky E., Wanjugi H., Blechl A., Giroux M. J. 2006. Complementation of the Pina (null) allele with the wild type Pina sequence restores a soft phenotype in transgenic wheat. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1563 — 1570.
- Massa AN, Morris CF. 2006. Molecular evolution of the puroindoline-a, puroindoline-b, and grain softness protein-1 genes in the tribe *Triticeae*. *J. Mol. Evol.* 63: 526 — 536.

- McIntosh R. A., Devos K. M., Dubcovsky J., Rogers W. J., Morris C. F., Appels R., Anderson O. D. 2005. Catalogue of gene symbols for wheat: 2005 supplement. <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/wgc/2005upd.html>.
- Morris C.F. 1992. Impact of blending hard and soft white wheats on milling and baking quality. *Cereal Foods World* 37: 643 — 648.
- Morris C. F. 2002. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol. Biol.* 48: 633 — 647.
- Morris C.F., Greenblatt G. A., Bettge A. D., Malkawi H. I. 1994. Isolation and characterization of multiple forms of friabilin. *J. Cereal Sci.* 21: 167 — 174.
- Nadolska-Orczyk A, Gasparis S, Orczyk W. 2009. The determinants of grain texture in cereals. *J. Appl. Genet* 50: 185 — 197.
- 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.
- Oda S., Schofield J. D., 1997. Characterization of friabilin polypeptides. *J. Cereal Sci.* 26: 29 — 36.
- Palumbo D, Iannaccone M, Porta A, Capparelli R. 2010. Experimental antibacterial therapy with puroindolines, lactoferrin and lysozyme in *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Microbes Infect.* 12: 538 — 545.
- Rahman S., Jolly C. J., Skerritt J. H., Walloscheck A. 1994. Cloning of a wheat 15 kDa grain softness protein (GSP). GSP is a mixture of puroindoline-like polypeptides. *Eur. J. Biochem.* 223: 917 — 925.
- Ramirez A., Perez G.T., Ribotta P. D., Leon A. E. 2003. The occurrence of friabilins in triticale and their relationship with grain hardness and baking quality. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7176 — 7181.
- Simeone M. C., Lafiandra D. 2005. Isolation and characterization of friabilin genes in rye. *J. Cereal Sci.* 41: 115 — 122.
- Symes K. J. 1965. The inheritance of grain hardness in wheat as measured by particle size index. *Aust. J. Agric. Res.* 16: 113 — 123.
- Tranquilli G, Heaton J, Chicaiza O, Dubcovsky J. 2002. Substitutions and deletions of genes related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture. *Crop Sci.* 42: 1812 — 1817.
- Turnbull K. M., Gaborit T., Marion D., Rahman S. 2000. Variation in puroindoline polypeptides in Australian wheat cultivars in relation to grain hardness. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 153 — 158.
- Turnbull K. M., Marion D., Gaborit T., Appels R., Rahman S. 2003. Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm. *Planta* 216: 699 — 706.
- Wall M. L., Wheeler H. L., Huebsch M. P., Smith J. C., Figeys D., Altossar I. 2010. The tryptophan-rich domain of puroindoline is directly associated with the starch granule surface as judged by tryptic shaving and mass spectrometry. *J. Cereal Sci.* 52: 115 — 120.
- Wanjugi H. W., Hogg A. C., Martin J. M., Giroux M. J. 2007. The role of puroindoline a and b individually and in combination on grain hardness and starch association. *Crop Sci.* 47: 67 — 76.
- Wiley P. R., Tosi P., Evrard A., Lovergrove A., Jones H. D., Shewry P. R. 2007. Promoter analysis and immunolocalisation show that puroindoline genes are exclusively expressed in starchy endosperm cells of wheat grain. *Plant Mol. Biol.* 64: 125 — 136.
- Williams P. C., Sobering D. C. 1986. Attempts at standardization of hardness testing of wheat. I. The grinding/sieving (particle size index) method. *Cereal Foods World* 31: 359: 362 — 364.
- Yau W.M., Wimley W. C., Gawrisch K., White S. H. 1998. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* 37: 14713 — 14718.