

JACEK WAGAZakład Oceny Jakości i Metod Hodowli Zbóż
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Kraków

Katalog bloków białek gliadynowych polskich odmian i rodów pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)

Catalogue of gliadin protein blocks occurring in Polish common wheat cultivars and strains (*Triticum aestivum* L.)

W pracy przedstawiono nową, wersję katalogu białek gliadynowych, który obejmuje 38 bloków, z czego osiem warunkuje chromosom 1A, sześć warunkuje chromosom 1B, trzy — chromosom 1D, czternaście — chromosom 6A, cztery — chromosom 6B oraz trzy — chromosom 6D. Polimorfizm wybranych frakcji gliadyn w populacjach mieszańcowych F₂, uzyskanych z trzech kombinacji krzyżowań, analizowano metodą elektroforezy na żelu poliakryloamidowym w środowisku kwaśnym (A PAGE). Liczebność, z jaką określone grupy białek występowały u badanych mieszańców porównywano z teoretycznie oczekiwanym stosunkiem rozszczepień 1:2:1 i testowano za pomocą χ^2 . Analizowano też białka gliadynowe odmian i rodów pszenicy ozimej wybranych z kolekcji roboczej HR Strzelce sp. z o.o., u których stwierdzono obecność nowych frakcji, podobnych do bloków zidentyfikowanych na podstawie analizy genetycznej. Identyfikowano je porównując obrazy elektroforetyczne badanych form do odmian wzorcowych. Katalog opracowano głównie z myślą o jego wykorzystaniu w analizie materiałów hodowlanych wytwarzanych przez polskich hodowców, dlatego też obejmuje on przede wszystkim bloki białek gliadynowych najczęściej spotykane wśród polskich odmian i rodów pszenicy ozimej.

Słowa kluczowe: analiza elektroforetyczna A PAGE, bloki białek gliadynowych

Based on the acid polyacrylamide gel electrophoresis (A PAGE) a new version of catalogue of gliadin protein blocks was worked out. The catalogue contains jointly 38 blocks. Eight, six, three, fourteen, four and three of them are coded by the chromosomes 1A, 1B, 1D, 6A, 6B and 6D, respectively. New blocks included to the catalogue were verified using genetic analysis of F₂ hybrid genotypes. The observed frequencies of the analyzed gliadin components were compared with theoretically expected segregation ratio 1:2:1 for two allelic variants of one gliadin coding gene, and tested by the χ^2 test. Other new blocks (mainly coded by the chromosome 6A) observed in cultivars and strains selected from the collection of Plant Breeding Strzelce Sp. z o.o. were identified by comparison of their components with components of the blocks identified earlier. The new catalogue describes mainly gliadins commonly occurring in Polish cultivars and lines of winter wheat. It is recommended for analysis of breeding materials developed and investigated by Polish wheat breeders.

Key words: electrophoretic analysis, A PAGE, gliadin protein blocks

WSTĘP

W ostatnich latach analiza elektroforetyczna białek gliadynowych znalazła szerokie zastosowanie w pracach nad wytwarzaniem nowych odmian pszenicy (Bushuk, 1998). Standardowa metoda rozdziału gliadyn — elektroforeza na żelu poliakryloamidowym (A PAGE) — została zaakceptowana przez hodowców jako metoda wspomagająca tradycyjną selekcję. Spośród licznych jej zalet na szczególną uwagę zasługuje znaczna wydajność, dokładność i powtarzalność wyników. Szeroki wachlarz zastosowań A PAGE obejmuje między innymi ocenę podobieństwa i wyrównania genetycznego odmian i rodów pszenicy, identyfikację homozygot, heterozygot i rekombinantów w populacjach mieszańcowych czy analizę sprzężenia genów.

Białka gliadynowe są ważnym elementem strukturalnym glutenu, a zmienność ich budowy fizykochemicznej ma wpływ na właściwości wypiekowe mąki (Wrigley i in., 1982). Dzięki temu niektóre frakcje zidentyfikowane na podstawie elektroforezy, mogą być wykorzystane jako markery biochemiczne w selekcji form wysokojakościowych. Należy podkreślić, iż większość opisanych aplikacji znajduje zastosowanie na najwcześniejszych etapach hodowli, poczynając od pokolenia F_2 włącznie.

Skuteczność wykorzystania obrazów elektroforetycznych zależy w dużym stopniu od sposobu ich interpretacji. W pracach nad określeniem tożsamości badane genotypy porównywane są ze sobą celem stwierdzenia podobieństwa specyficznych frakcji białkowych (Javornik i in., 1989). Wydaje się jednak, iż bardziej efektywną metodą jest analiza bloków białkowych oparta na genetycznych podstawach dziedziczenia gliadyn. Wiadomo, iż *loci* warunkujące ich syntezę zlokalizowane są na chromosomach: 1A, 1B, 1D, 6A, 6B i 6D (Sozinov i Poperella, 1980). Każdy *locus* składa się z kilku silnie sprzężonych genów i tworzy serię alleli wielokrotnych (Sozinov, 1985). Pojedyncze geny (tzw. *minor loci*) zlokalizowane w sąsiedztwie głównych skupień genowych dodatkowo poszerzają zakres zmienności (Pogna i in., 1993). Grupa prążków obrazu elektroforetycznego warunkowana przez pojedynczy allel tworzy blok białkowy. Celem identyfikacji nowych bloków wykonywane są kombinacje krzyżowań odmian różniących się pod względem wybranych fragmentów obrazu elektroforetycznego gliadyn. Stwierdzenie, czy analizowane prążki stanowią jeden blok, czy też są komponentami różnych bloków jest możliwe na podstawie wyników analizy rozszczepienia genów w pokoleniu F_2 .

Zidentyfikowane bloki gromadzone są w katalogach. Największą ich liczbę (ponad 100) opisuje katalog Metakowskiego (Metakovsky, 1991). Możliwość bezpośredniego wykorzystania tego katalogu w pracach badawczych i hodowlanych utrudnia jednakże kilka czynników, między innymi brak dostępności odmian wzorcowych użytych przez autora, nieznaczne różnice metodyczne mające wpływ na lokalizację prążków czy też obecność specyficznych frakcji białkowych obserwowanych w populacjach odmian i rodów pochodzących z różnych krajów. W ZOJiMHZ IHAR w Krakowie podjęto prace nad utworzeniem własnego katalogu, który uwzględniłby specyfikę polskich materiałów hodowlanych (Waga, 2000). Pierwotna jego wersja została opracowana na podstawie analizy porównawczej obrazów elektroforetycznych gliadyn licznych form pszenicy ze

schematami Metakowskiego. Nie była ona jednak poparta analizą dziedziczenia białek. Dlatego też zidentyfikowane grupy prążków mogły, ale nie musiały stanowić bloków białkowych.

Celem niniejszego opracowania było udoskonalenie istniejącego katalogu gliadyn polegające m.in. na tym, że wprowadzone do niego bloki zidentyfikowano i klasyfikowano na podstawie wyników analizy mieszańców F_2 . W pracy wykorzystano również metodę porównawczą, jednakże wzorcem stanowiącym punkt odniesienia były bloki zidentyfikowane wcześniej. Opracowany katalog będzie wykorzystany do charakterystyki polskich odmian i rodów, jak również w pracach nad określeniem związku genetycznego gliadyn z cechami jakościowymi pszenicy.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Przedmiotem badań były:

- populacje mieszańcowe F_2 uzyskane z trzech kombinacji krzyżowań: sptv-1 × Flair, kbh-sp 1 × sth 9055, kbh-sp 1 × Mironowska 808. Dla każdej kombinacji analizowano po około 140 ziarniaków. Linie sptv 1 oraz kbh-sp 1 zostały wytworzone w ZOJiMHZ IHAR w Krakowie. Sptv-1 jest mieszańcem uzyskanym z kombinacji Elena × Oberkummler Rotkorn (odmiana orkisz — *Tr. aestivum* ssp. *spelta*), natomiast kbh-sp 1 jest jednym z dwóch biotypów gliadynowych odmiany Oberkummler Rotkorn.
- odmiany i rody pszenicy ozimej pochodzące z kolekcji roboczej firmy Hodowla Roślin Strzelce sp. z o.o. Analizowano po 50 ziarniaków dla każdego z dziewiętnastu genotypów wybranych do badań.

Analizy elektroforetyczne

Białka gliadynowe analizowano metodą elektroforezy na żelu poliakryloamidowym w środowisku kwaśnym buforu mleczanowo-glinowego (Metakovsky i Novoselskaya, 1991). Białka ekstrahowano z pojedynczych ziarniaków 70% alkoholem etylowym przez około 20 godzin, a następnie wirowano 12 minut przy 10000 x g. Ekstrakty zagęszczone nasyconym roztworem sacharozy nanoszono do studzienek uformowanych w żelu o całkowitym stężeniu monomerów T = 8% oraz stężeniu crosslinkera (metylenbisakrylamidu) C = 0,29%. Rozdział białek prowadzono w komorach elektroforetycznych Desaga przez 5 godzin przy U = 500V, po czym żele barwiono w roztworze komasyny G 250 przez około 12 godzin, odbarwiano w wodzie i fotografowano.

Analiza statystyczna i opracowanie katalogu

Mieszańce F_2 każdej kombinacji krzyżowań dzielono na trzy grupy pod względem zróżnicowania określonych fragmentów obrazu elektroforetycznego gliadyn. Dwie spośród nich obejmowały genotypy zawierające prążki charakterystyczne dla poszczególnych rodziców natomiast do grupy trzeciej zaliczono osobniki zawierające prążki obu rodziców łącznie. Założono, iż w pierwszym przypadku analizowane genotypy stanowią homozygoty, natomiast w drugim heterozygoty pod względem genów warunkujących białka gliadynowe. W sytuacji, gdy specyfika kombinacji prążków uniemożliwiała

odróżnienie jednego z dwóch typów homozygoty od heterozygoty, oba genotypy łączono razem.

Liczebność osobników w utworzonych grupach mieszańców porównywano z teoretycznie oczekiwanym stosunkiem rozszczepień 1:2:1 lub 3:1 dla dwóch allelicznych wariantów jednego genu, a zgodność częstotliwości obserwowanych i oczekiwanych testowano na podstawie χ^2 (Brites i Carrillo, 2000). Stosunek 3:1 w badaniach nad dziedziczeniem białek zapasowych pszenicy nie jest powiązany z dominowaniem genu, lecz wynika ze wspomnianego wcześniej połączenia klasy heterozygot (liczebność 2) z jedną z dwóch klas homozygot (liczebność 1) i był rozpatrywany w przypadku jednej kombinacji - kbh-sp 1 \times Mironowska 808.

Graficzny schemat zidentyfikowanych bloków białek gliadynowych opracowano przy użyciu programu Excell 2003. Dla prążków warunkowanych chromosomem 6A, których kombinacje analizowano po raz pierwszy, obliczano wartości współczynnika Rm według wzoru opisanego w jednej z wcześniejszych prac (Waga, 2000). Współczynnik Rm ułatwia prawidłowe usytuowanie poszczególnych frakcji białkowych na schemacie graficznym bloku.

WYNIKI I DYSKUSJA

Identyfikacja gliadyn warunkowanych chromosomem 1A na podstawie analizy potomstwa kombinacji sptv-1 \times Flair

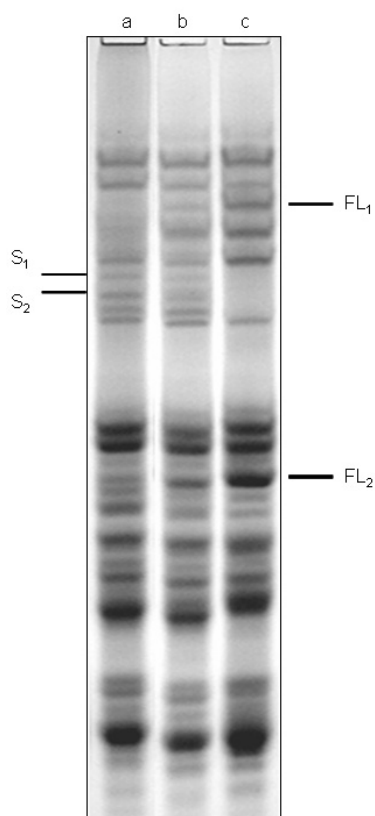
Mieszańce pokolenia F₂ uzyskane z kombinacji sptv-1 \times Flair analizowano pod kątem zróżnicowania wybranych frakcji białkowych należących do grup γ - i ω -gliadyn (rys. 1). Komponent mateczny zawierał parę prążków oznaczonych symbolami S₁ oraz S₂, stosunkowo często obserwowaną wśród polskich odmian i rodów pszenicy ozimej. Z kolei odmiana Flair zawierała dwa specyficzne prążki oznaczone symbolami FL₁ i FL₂. Pierwszy z nich był zlokalizowany w bliskim sąsiedztwie cięższych frakcji ω -gliadyn natomiast drugi, intensywnie wybarwiony prążek, obserwowano nieco poniżej pary prążków centralnych. Taka lokalizacja białek na obrazie elektroforetycznym sugeruje, iż są one warunkowane chromosomem 1A. Celem analizy genetycznej było stwierdzenie, czy obserwowane we wcześniejszych badaniach pary prążków FL₁ i FL₂ oraz S₁ i S₂ stanowią bloki białkowe, oraz czy bloki te są allelicznymi wariantami białkowymi genu zlokalizowanego na chromosomie 1A.

Mieszańce F₂ podzielono na trzy klasy osobników, zawierających:

- prążki S₁ i S₂
- prążki S₁ i S₂ oraz FL₁ i FL₂ łącznie
- prążki FL₁ i FL₂

Przyjęto hipotezę, iż:

- genotypy należące do grupy pierwszej stanowią homozygoty pod względem genu w *locus Gli A1*, w którym allel kodujący gliadyny jest typowy dla linii sptv-1
- genotypy należące do grupy drugiej są heterozygotami.
- genotypy należące do grupy trzeciej są homozygotami pod względem genu w *locus Gli A1*, w którym allel kodujący gliadyny jest typowy dla odmiany Flair.



Rys. 1. Wzorce białek gliadynowych obserwowane u mieszańców pokolenia F₂ kombinacji sptv 1 × Flair: a. typ sptv 1, b. heterozygota pod względem locus *Gli A1*, c. typ Flair. Frakcje białkowe warunkowane chromosomem 1A zaznaczono z prawej i lewej obrazu elektroforetycznego
Fig. 1. Gliadin patterns of hybrid genotypes observed in F₂ generation obtained from the cross combination sptv 1 × Flair: a. type sptv 1, b. heterozygote in locus *Gli A1*, c type Flair. Gliadin fractions coded by the chromosome 1A are marked on the right and left hand side of the electrophoregram

Celem weryfikacji przyjętej hipotezy testowano zgodność liczebności genotypów w trzech utworzonych klasach mieszańców z teoretycznie oczekiwanym stosunkiem rozszczepień dla jednej pary allelicznych genów (1:2:1) na podstawie χ^2 (tab. 1). Wynik testu pozwala uznać hipotezę zerową o braku różnic pomiędzy teoretycznie oczekiwaną i obserwowaną liczebnością genotypów w grupach i przyjąć jako prawdziwe stwierdzenie, iż dwie pary prążków: FL₁ i FL₂ oraz S₁ i S₂ stanowią dwa bloki białkowe kodowane dwoma allelicznymi wariantami genu na chromosomie 1A. Zgodnie z przyjętymi wcześniej oznaczeniami blok typowy dla linii sptv-1 oznaczono symbolem *Gli A1-1*, natomiast blok charakterystyczny dla odmiany Flair oznaczono symbolem *Gli A1-7*. Biorąc pod uwagę, iż wszystkie genotypy, w których obserwowano prążki FL₁ i FL₂ zawierały dodatkowo jeden słabo wybarwiony prążek, zlokalizowany nieco poniżej FL₂ uznano, iż wchodzi on również w skład bloku *Gli A1-7*.

Tabela 1

Test χ^2 dla gliadyn FL₁ i FL₂ oraz S₁ i S₂ w potomstwie F₂ kombinacji sptv 1 × Flair
The χ^2 test for gliadins FL₁, FL₂, S₁ and S₂ in F₂ hybrid genotypes coming from the combination sptv 1 × Flair

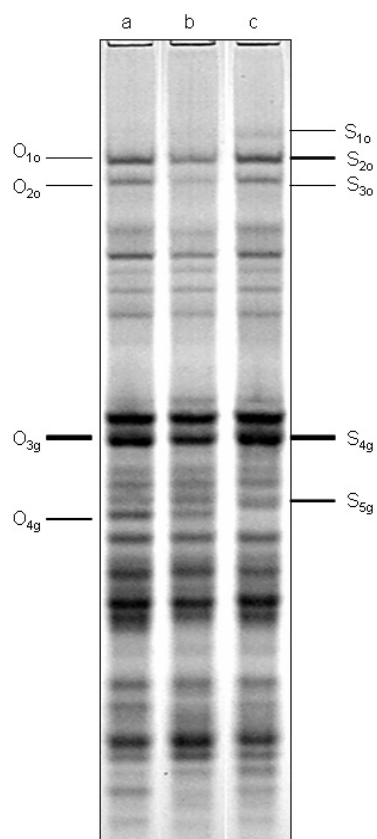
Grupy genotypów Groups of genotypes	Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszerzeń Segregation ratio	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
1	S ₁ +S ₂	1	35,5	43	4,818	0,1-0,05
2	(S ₁ +S ₂) + (FL ₁ +FL ₂)	2	71	74		
3	FL ₁ +FL ₂	1	35,5	25		

Identyfikacja gliadyn warunkowanych chromosomami 1D i 6A na podstawie analizy potomstwa kombinacji kbh-sp 1 × STH 9055

Komponenty rodzicielskie, podobnie jak w pierwszej kombinacji krzyżowań, różniły się w strefie γ - i wolno migrujących ω -gliadyn (tzw. frakcje ω -5) (rys. 2). Gliadyny z grupy ω -5 są na ogół warunkowane chromosomem 1D (*locus Gli D1*), co można stwierdzić przez porównanie ich z obrazem bloków białkowych warunkowanych chromosomem 1D w katalogu Metakowskiego, jak również przez analogię z wynikami badań innych autorów (Metakovsky, 1991; Sozinov i Poperella, 1980). Niektóre komponenty tych bloków są jednak zlokalizowane nie tylko w strefie ω , ale także w strefie γ -gliadyn. Celem niniejszego doświadczenia było między innymi stwierdzenie, które spośród obserwowanych γ gliadyn wchodzi w skład bloku kodowanego chromosomem 1D. W przypadku linii kbh-sp 1 analizowano prążki oznaczone symbolami O_{1o}, O_{2o}, O_{3g} i O_{4g} natomiast dla rodu STH 9055 wybrano prążki oznaczone symbolami S_{1o}, S_{2o}, S_{3o}, S_{4g} i S_{5g}. Litery „o” i „g” obok numerów prążków oznaczają ich lokalizację w strefach ω i γ -gliadyn. Analizując mieszańce F₂ pod względem obecności lub braku wymienionych frakcji gliadyn całą badaną populację mieszańców podzielono na trzy grupy osobników, zawierających:

- prążki O_{1o}, O_{2o}, O_{3g} i O_{4g}
- prążki O_{1o}, O_{2o}, O_{3g} i O_{4g} oraz S_{1o}, S_{2o}, S_{3o}, S_{4g} i S_{5g}
- prążki S_{1o}, S_{2o}, S_{3o}, S_{4g} i S_{5g}.

Następnie przyjęto hipotezę, iż genotypy w grupach pierwszej i trzeciej stanowią homozygoty typu kbh-sp1 oraz STH 9055 natomiast grupa druga obejmuje heterozygoty. Biorąc pod uwagę, iż prążki O_{1o} i O_{2o} są zlokalizowane identycznie jak S_{2o} i S_{3o}, za cechę różnicującą uznano obecność lub brak prążków S_{1o}, S_{5g} i O_{4g}.



Rys. 2. Wzorce białek gliadynowych obserwowane u mieszańców pokolenia F₂ kombinacji kbh-sp 1 × STH 9055: a. typ kbh-sp 1, b. heterozygota pod względem locus *Gli D1*, c. typ STH 9055. Frakcje białkowe warunkowane chromosomem 1D zaznaczono z prawej i lewej obrazu elektroforetycznego
Fig. 2. Gliadin patterns of hybrid genotypes observed in F₂ generation obtained from the cross combination kbh-sp 1 × STH 9055: a. type kbh-sp 1, b. heterozygote in locus *Gli D1*, c. typ STH 9055. Gliadin fractions coded by the chromosome 1D are marked on the right and left side of the electrophoregram

Celem weryfikacji założonej hipotezy analizowano zgodność obserwowanych liczebności w poszczególnych grupach mieszańców z teoretycznie oczekiwanym stosunkiem rozszczepień 1:2:1 dla jednej pary allelicznych genów na podstawie testu χ^2 (tab. 2). Uzyskane wyniki dowodzą zgodności obserwowanych i oczekiwanych stosunków rozszczepień, co oznacza, że obie badane kombinacje gliadyn stanowią bloki warunkowane dwoma allelicznymi wariantami genu na chromosomie 1D, którym nadano symbole *Gli D1*-1.1 (blok typowy dla rodu STH 9055) oraz *Gli D1*-1.2 (blok typowy dla linii kbh-sp 1).

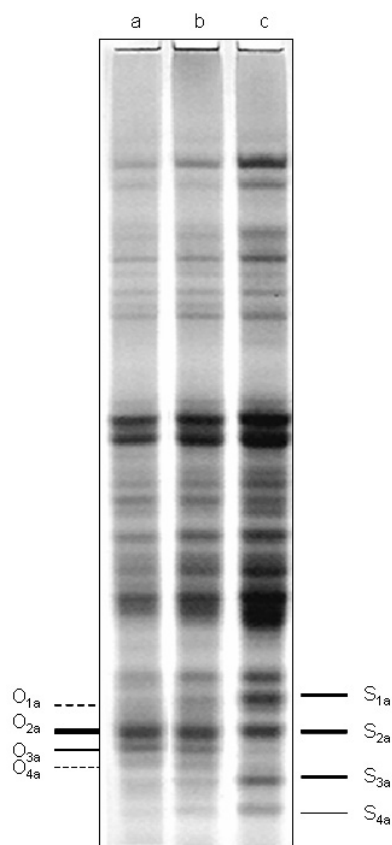
Tabela 2

Test χ^2 dla gliadyn O₁, O₂, O₃, O₄ oraz S₁, S₂, S₃, S₄, S₅ w potomstwie F₂ kombinacji kbh-sp 1 × STH 9055
The χ^2 test for gliadins O₁, O₂, O₃, O₄ and S₁, S₂, S₃, S₄, S₅ in F₂ hybrid genotypes coming from the combination kbh-sp 1 × STH 9055

Grupy genotypów Groups of genotypes	Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczępień Segregation ratio	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
1	O ₁ +O ₂ +O ₃ +O ₄	1	36,75	41		
2	(O ₁ +O ₂ +O ₃ +O ₄)+(S ₁ +S ₂ +S ₃ +S ₄ +S ₅)	2	73,5	63	3,055	0,3-0,2
3	S ₁ +S ₂ +S ₃ +S ₄ +S ₅	1	36,73	43		

Biorąc pod uwagę, iż linię kbh-sp 1 uzyskano drogą selekcji biotypów gliadynowych z heterogenicznej formy orkisz Oberkummler Rotkorn można przyjąć, iż prążek O_{4g}, którego pozycja na obrazie elektroforetycznym wyraźnie różni się od prążka S_{5g} (O_{4g} znajduje się poniżej S_{5g}) jest cechą specyficzną orkisz ułatwiającą identyfikację jego mieszańców z pszenicą zwyczajną.

Linia kbh-sp1 oraz ród STH 9055 różniły się także pod względem prążków należących do α -gliadyn. Z wcześniejszych badań nad dziedziczeniem białek zapasowych pszenicy wynika, iż w tej części obrazu elektroforetycznego zlokalizowane są głównie frakcje warunkowane przez *locus* na chromosomie 6A, oraz pojedyncze frakcje warunkowane chromosomem 6D (Metakovsky, 1991; Sozinov, 1985; Sozinov i Poperella, 1980). Obserwowane zróżnicowanie α -gliadyn u mieszańców F₂ obu form rodzicielskich stanowiło punkt wyjścia dla stwierdzenia, które białka tworzą bloki warunkowane chromosomem 6A. Zarówno w przypadku linii kbh-sp 1 jak i rodu STH 9055 rozpatrywano po cztery prążki, które oznaczono symbolami: O_{1a}, O_{2a}, O_{3a}, O_{4a} (linia kbh-sp1) oraz S_{1a}, S_{2a}, S_{3a} i S_{4a} (rodu STH 9055) (rys. 3). Litera „a” w indeksie dolnym obok numeru prążka oznacza jego lokalizację w strefie α -gliadyn. Spośród ośmiu wymienionych prążków, dwie pary: O_{1a} i S_{1a} oraz S_{2a} i O_{3a} były identyczne u obu rodziców, pozostałe były specyficzne dla badanych genotypów i stanowiły element różnicujący zarówno formy rodzicielskie, jak i genotypy mieszańcowe. U mieszańców F₂ wyróżniono trzy grupy genotypów zawierających α -gliadyny: typowe dla linii kbh-sp1, typowe dla rodu STH 9055 oraz stanowiące sumę prążków obu komponentów rodzicielskich. Przyjęto hipotezę, iż genotypy w tych grupach stanowią odpowiednio homozygoty typu kbh-sp1, homozygoty typu STH 9055 oraz heterozygoty pod względem allelicznych wariantów genu na chromosomie 6A (*locus Gli A2*). Na podstawie testu χ^2 stwierdzono, iż zgodność liczebności obserwowanych i teoretycznie oczekiwanych ze stosunkiem rozszczępień 1:2:1 jest wysoce prawdopodobna (P = 0,95-0,90). Dowodzi to, iż obie rozpatrywane kombinacje prążków stanowią bloki białkowe. Oznaczono je symbolami *Gli A2-1* (blok charakterystyczny dla linii kbh-sp 1) oraz *Gli A2-2* (blok charakterystyczny dla rodu STH 9055) (tab. 3).



Rys. 3. Wzorce białek gliadynowych obserwowane u mieszańców pokolenia F₂ kombinacji kbh-sp 1 × STH 9055: a. typ kbh-sp 1, b. heterozygota pod względem locus *Gli A2*, c. typ STH 9055. Frakcje białkowe warunkowane chromosomem 6A zaznaczono z prawej i lewej obrazu elektroforetycznego
 Fig. 3. Gliadin patterns of hybrid genotypes observed in F₂ generation obtained from the cross combination kbh-sp 1 × STH 9055: a. type kbh-sp 1, b. heterozygote in locus *Gli D1*, c. type STH 9055. Gliadin fractions coded by the chromosome 6A are marked on the right and left side of the electrophoregram

Tabela 3

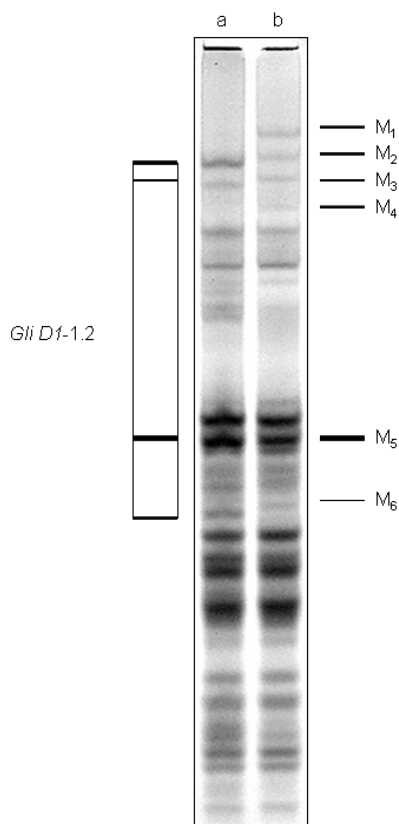
Test χ^2 dla gliadyn O₁, O₂, O₃, O₄ oraz S₁, S₂, S₃, S₄ w potomstwie F₂ kombinacji kbh-sp 1 × STH 9055
 The χ^2 test for gliadins O₁, O₂, O₃, O₄ and S₁, S₂, S₃, S₄ in F₂ hybrid genotypes coming from the combination kbh-sp 1 × STH 9055

Grupy genotypów Groups of genotypes	Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepień Segregation ratio	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
1	O ₁ +O ₂ +O ₃ +O ₄	1	36,75	35	0,183	0,95-0,9
2	(O ₁ +O ₂ +O ₃ +O ₄)+(S ₁ +S ₂ +S ₃ +S ₄)	2	73,5	76		
3	S ₁ +S ₂ +S ₃ +S ₄	1	36,75	36		

Identyfikacja gliadyn warunkowanych chromosomem 1D na podstawie analizy potomstwa kombinacji kbh-sp 1 × Mironowska 808

Blok *Gli D1-1.2* w linii kbh-sp1, wykorzystano jako wzorzec do identyfikacji specyficznej grupy prążków ω-gliadyn obserwowanych u odmiany Mironowska 808. Opisane w niniejszym akapicie doświadczenie stanowi przykład analizy gliadyn, w której oznaczony blok białkowy stanowi punkt odniesienia dla identyfikacji nowych bloków.

Jak ustalono wcześniej *Gli D1-1.2* składa się z czterech frakcji: dwóch prążków w strefie ω-gliadyn, jednego prążka centralnego oraz jednego prążka położonego nieco niżej w stosunku do prążka centralnego. W przypadku odmiany Mironowska 808 zwrócono szczególną uwagę na sześć prążków oznaczonych symbolami M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ i M₆, spośród których cztery (M₁–M₄) były zlokalizowane w strefie ω-gliadyn, jeden należał do pary prążków centralnych (M₅), a jeden znajdował się poniżej prążka centralnego (M₆) (rys. 4).



Rys. 4. Wzorce białek gliadynowych obserwowane u mieszańców F₂ kombinacji kbh-sp 1 × Mironowska 808: a. typ kbh-sp 1, b. typ Mironowska 808. Frakcje białkowe warunkowane chromosomem 1D zaznaczono z prawej i lewej obrazu elektroforetycznego

Fig. 4. Gliadin patterns of hybrid genotypes observed in F₂ generation obtained from the cross combination kbh-sp 1 × Mironowska 808: a. type kbh-sp 1, b.type Mironowska 808. Gliadin fractions coded by the chromosome 1D are marked on the right and left side of the electrophoregram

- W omawianym przypadku rozpatrywano dwie klasy genotypów:
 — Zawierających blok *Gli DI-1.2* (homozygota typu kbh-sp1),
 — Zawierających sumę prążków wchodzących w skład bloku *Gli DI-1.2* oraz prążków M_1, M_2, M_3, M_4, M_5 i M_6 (homozygoty typu Mironowska 808 oraz heterozygoty).

Zgodność liczebności obserwowanych z teoretycznie oczekiwanymi na podstawie stosunku rozszczepień 3:1 stwierdzono na podstawie χ^2 (tab. 4). Wynik testu dowodzi, iż sześć rozpatrywanych prążków odmiany Mironowska 808 stanowi blok białkowy kodowany genem na chromosomie *ID*, który jest allelicznym wariantem genu warunkującego blok *Gli DI-1.2*. Nowy blok, typowy dla odmiany Mironowska 808, oznaczono symbolem *Gli DI-2*.

Tabela 4

Test χ^2 dla gliadyn $M_1, M_2, M_3, M_4, M_5, M_6$ oraz bloku *Gli DI-1.2* w potomstwie F_2 kombinacji kbh-sp 1 \times Mironowska 808
The χ^2 test for gliadins $M_1, M_2, M_3, M_4, M_5, M_6$ and *Gli DI-1.2* block in F_2 hybrid genotypes coming from the combination kbh-sp 1 \times Mironowska 808

Grupy genotypów Groups of genotypes	Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepień Segregation ratio	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
1	<i>Gli DI-1.2</i>	1	29	34	1,149	0,3-0,2
2	<i>Gli DI-1.2</i> + ($M_1+M_2+M_3+M_4+M_5+M_6$)	3	87	82		

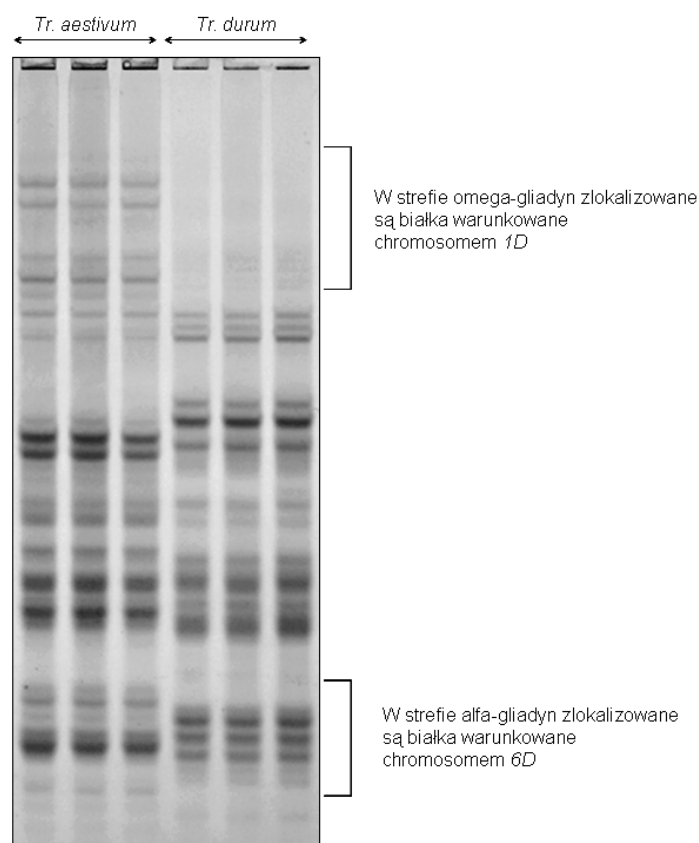
Porównując *Gli DI-1.2* oraz *Gli DI-2* należy zwrócić uwagę, iż tylko jeden prążek (prążek centralny) jest wspólny dla obu wymienionych bloków — zajmuje on identyczną pozycję na obrazie elektroforetycznym wszystkich analizowanych genotypów. Pozostałe prążki różnią się między sobą i jako frakcje specyficzne w znacznym stopniu ułatwiają identyfikację mieszańców rozpatrywanych form pszenicy oraz ich mieszańców.

Z kolei porównując blok *Gli DI-1.1* rodu STH 9055 z blokiem *Gli DI-2* należy zwrócić uwagę na obecność wspólnego prążka w strefie γ -gliadyn ($M_6 = S_{5g}$). Cecha ta odróżnia oba wymienione bloki od typowego dla analizowanej linii orkiszu bloku *Gli DI-1.2*. Tak więc niewielkie przesunięcie względem siebie dwóch prążków może znacznie ułatwić identyfikację mieszańców orkiszu.

Porównanie białek gliadynowych pszenicy twardej i zwyczajnej

We wczesnych pracach nad dziedziczeniem gliadyn badano linie aneuploidalne odmiany Chinese spring (głównie serie nulli-tetrasomików), których obrazy elektroforetyczne porównywano z formami euploidalnymi zawierającymi pełny zestaw chromosomów (Sozinov, 1985). Różnice ilustrujące obecność lub brak poszczególnych prążków (bądź grup prążków) obserwowane u form euploidalnych i aneuploidalnych wskazywały, które z 42 chromosomów pszenicy heksaploidalnej zawierają geny warunkujące syntezę białek gliadynowych.

W niniejszej pracy porównywano obrazy elektroforetyczne pszenicy twardej (tetraploidalnej) i pszenicy zwyczajnej (heksaploidalnej), co do pewnego stopnia stanowi analogię z badaniami zestawów linii aneuploidalnych Chinese Spring (rys. 5).



Rys. 5. Porównanie obrazów elektroforetycznych gliadyn (A PAGE) charakterystycznych dla pszenic heksaploidalnych (*Tr. aestivum*) i tetraploidalnych (*Tr. durum*). Klamrami zaznaczono strefy, w których zlokalizowane są białka warunkowane chromosomami 1D i 6D

Fig. 5. Comparison of gliadin electrophoregrams (A PAGE) typical for hexaploid (*Tr. aestivum*) and tetraploid (*Tr. durum*) wheat genotypes. The zones, where fractions coded by chromosomes 1D and 6D occur, are marked by the brackets

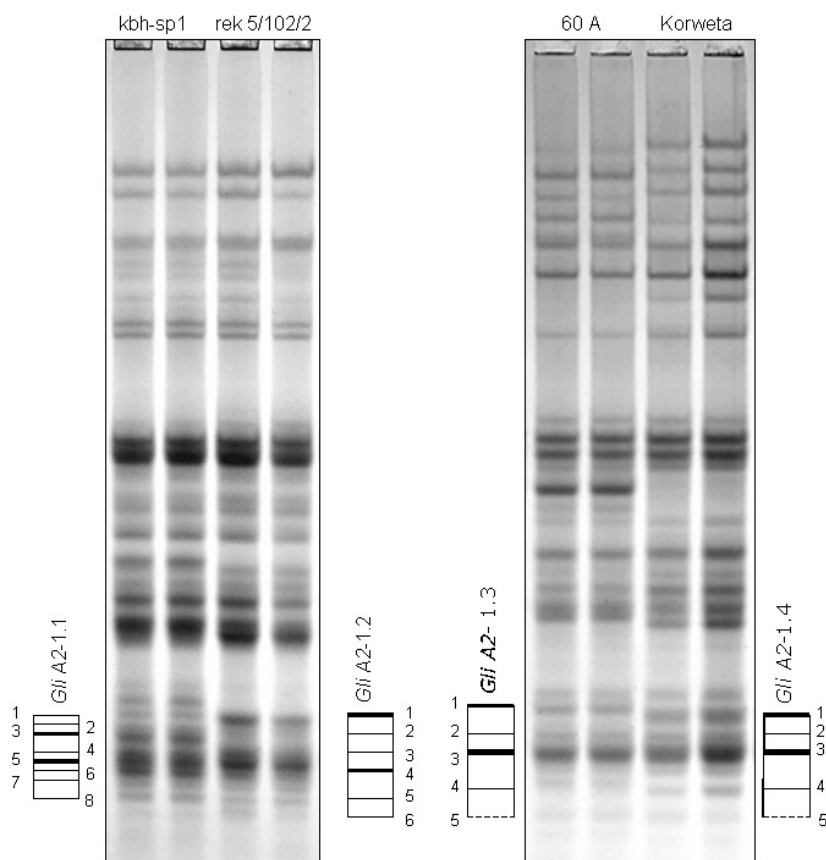
Pszenice twarde nie zawierają genomu *D*, a co za tym idzie dwóch chromosomów warunkujących gliadyny: 1D i 6D. Można oczekiwać, że analiza zróżnicowania obrazów elektroforetycznych form należących do obu gatunków pszenicy dostarczy istotnych informacji na temat lokalizacji genów warunkujących niektóre frakcje gliadyn na tych chromosomach.

Obraz elektroforetyczny obu gatunków ukazuje różnice, które można bezpośrednio powiązać z brakiem genomu *D*. Pusta przestrzeń w górnej strefie obrazu elektroforetycznego *Triticum durum* jednoznacznie świadczy o braku frakcji kodowanych chromosomem 1D. Taki wniosek wynika zarówno z analizy genetycznej opisanej w dwóch wcześniejszych akapitach, jak również z badań innych autorów. Natomiast charakterystyczny brak wolno migrującego prążka z grupy α -gliadyn stanowi ważną

informację. W tej strefie obrazu elektroforetycznego nakładają się prążki warunkowane chromosomami 6A i 6D, co komplikuje ich rozróżnienie. Obecność prążka u formy heksaploidalnej i jego brak u formy tetraploidalnej dowodzi, iż w rozpatrywanym przypadku, jest on warunkowany chromosomem 6D. Na tej podstawie wolno migrujący prążek z grupy α -gliadyn obserwowany na obrazach elektroforetycznych analizowanych w niniejszej pracy włączono do bloków z grupy chromosomu 6D.

Analiza kolekcji roboczej

Kolekcje odmian i rodów pszenicy stanowią populacje, w których można obserwować największe zróżnicowanie białek gliadynowych. W ubiegłych latach były one wielokrotnie analizowane w ZRZb IHAR w Krakowie, głównie z wykorzystaniem elektroforezy na żelu skrobiowym. Jednakże obrazy elektroforetyczne na żelu poliakryloamidowym zawierają inne kombinacje prążków i są trudniejsze do interpretacji.



Rys. 6. Cztery podrodziny bloków białek gliadynowych typu *Gli A2-1*
Fig. 6. Four subfamilies of gliadin protein blocks of the *Gli A2-1* type

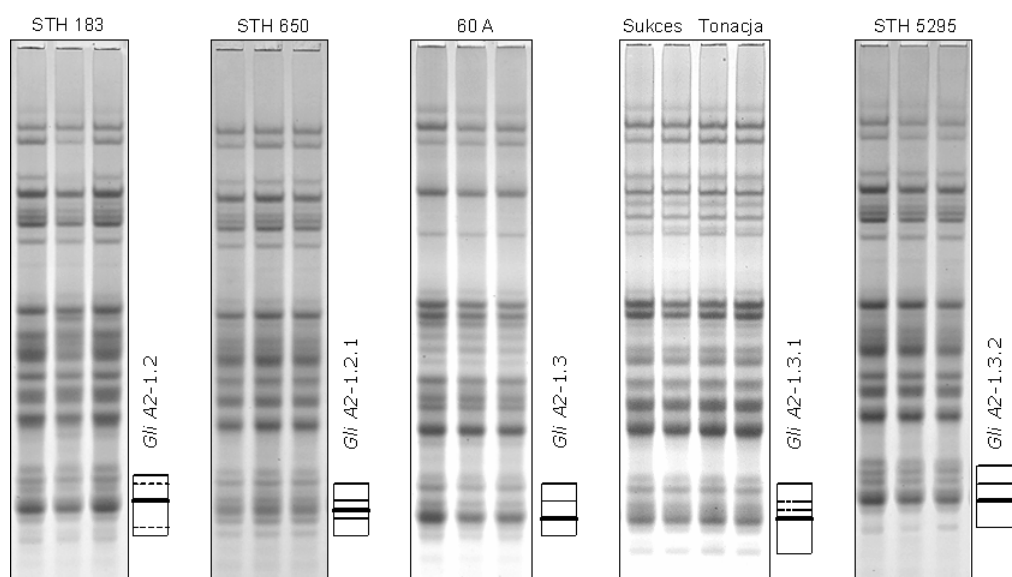
Dlatego do badań wybrano tylko dziewiętnaście odmian i rodów pszenicy ozimej pochodzących z kolekcji roboczej firmy Hodowla Roślin Strzelce sp. z o.o. Charakter ich

zróznicowania ułatwiał identyfikację bloków zlokalizowanych w strefie α , warunkowanych chromosomem 6A. Na podstawie wcześniej wykonanej analizy genetycznej zidentyfikowano dwa, znacznie różniące się między sobą, warianty białkowe: *Gli A2-1* oraz *Gli A2-2*. Obserwacja dziewiętnastu odmian i rodów wykazała, iż zawierają one kombinacje białek zbliżone do jednego bądź drugiego wzorca, co sugeruje występowanie dwóch rodzin bloków. Bloki należące do jednej rodziny wykazują szereg cech wspólnych natomiast różne rodziny różnią się między sobą w charakterystyczny sposób.

Analiza porównawcza odmian i rodów zawierających α -gliadyny zbliżone do *Gli A2-1* pozwoliła wyodrębnić cztery podrodziny. Wzorce elektroforetyczne typowe dla każdej z nich oznaczono symbolami: *Gli A2-1.1*, *Gli A2-1.2*, *Gli A2-1.3* oraz *Gli A2-1.4* (rys. 6). Z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, iż są one czterema allelicznymi wariantami genu w *locus Gli A2*. Wszystkie one mają zbliżony schemat budowy — tworzy je od dwóch do trzech intensywnie wybarwionych prążków, które są otoczone licznymi, znacznie słabiej wybarwionymi, frakcjami białkowymi. Prążki intensywnie wybarwione powstały prawdopodobnie przez nałożenie kilku (być może nawet kilkunastu) frakcji o identycznej masie cząsteczkowej i ładunku elektrycznym. Obserwowany efekt wizualny plamy o nieostrych konturach utrudnia jednoznaczną identyfikację tych bloków. Znaczna ilość białka w tej strefie może być też wynikiem podwyższonej ekspresji w *locus Gli A2*. Należy zwrócić uwagę, iż blok *Gli A2-1.3* różni się od bloków *Gli A2-1.1* oraz *Gli A2-1.2* brakiem prążka oznaczonego (w ich przypadku) numerem 2. Z kolei układ prążków w *Gli A2-1.3* jest identyczny jak w *Gli A2-1.4*, a cechą różnicującą oba bloki jest nieznaczne przesunięcie prążka nr 1 w kierunku frakcji szybciej migrujących. Rozpatrywane bloki obserwowano również wśród czterech form pochodzących z kolekcji ZOJiMHZ IHAR w Krakowie. Były to: linie kbh-sp 1 i 60A, ród LAD 480 oraz odmiana Korweta. Stanowią one formy homogeniczne pod względem składu frakcji gliadynowych i mogą być wykorzystane jako wzorce porównawcze do identyfikacji genotypów analizowanych w trakcie innych badań. W obrębie każdej z podrodzin typu *Gli A2-1.2*, *Gli A2-1.3* oraz *Gli A2-1.4* stwierdzono obecność od dwóch do trzech wariantów (rys. 7.1 i 7.2).

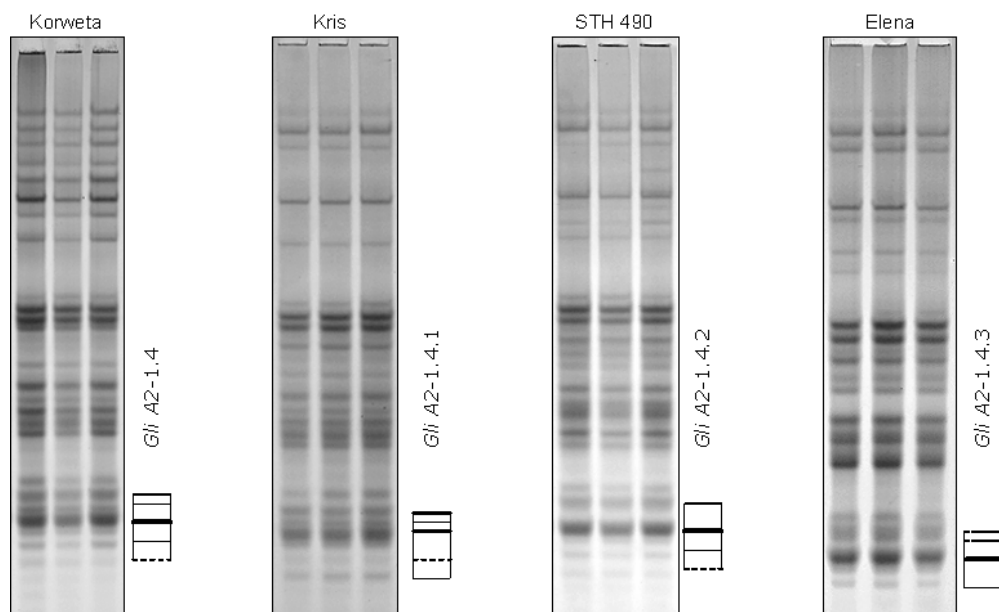
Wszystkie bloki białkowe zbliżone do *Gli A2-1* stanowią wzorzec elektroforetyczny tzw. A-gliadyny — grupy frakcji białkowych α -gliadyn kodowanych chromosomem 6A o specyficznych właściwościach fizykochemicznych (wykazują one skłonność do tworzenia struktur fibrylarnych w środowiskach o podwyższonej wartości pH) oraz o specyficznych właściwościach immunoreaktywnych (są to frakcje uznane za najbardziej toksyczne w przypadku osób chorych na celiakię) (Kasarda, 1980; De Ritis i in., 1988).

Odmiennej schemat budowy α -gliadyn stanowi blok *Gli A2-2*. Seria czterech wariantów białkowych w znacznym stopniu podobnych do *Gli A2-2* tworzy drugą rodzinę w obrębie chromosomu 6A (rys. 8). Ich frakcje są wyraźnie zarysowane i delikatniej wybarwione niż w przypadku rodziny *Gli A2-1*, co sugeruje obecność pojedynczych monomerów w obrębie przynajmniej niektórych spośród obserwowanych prążków.



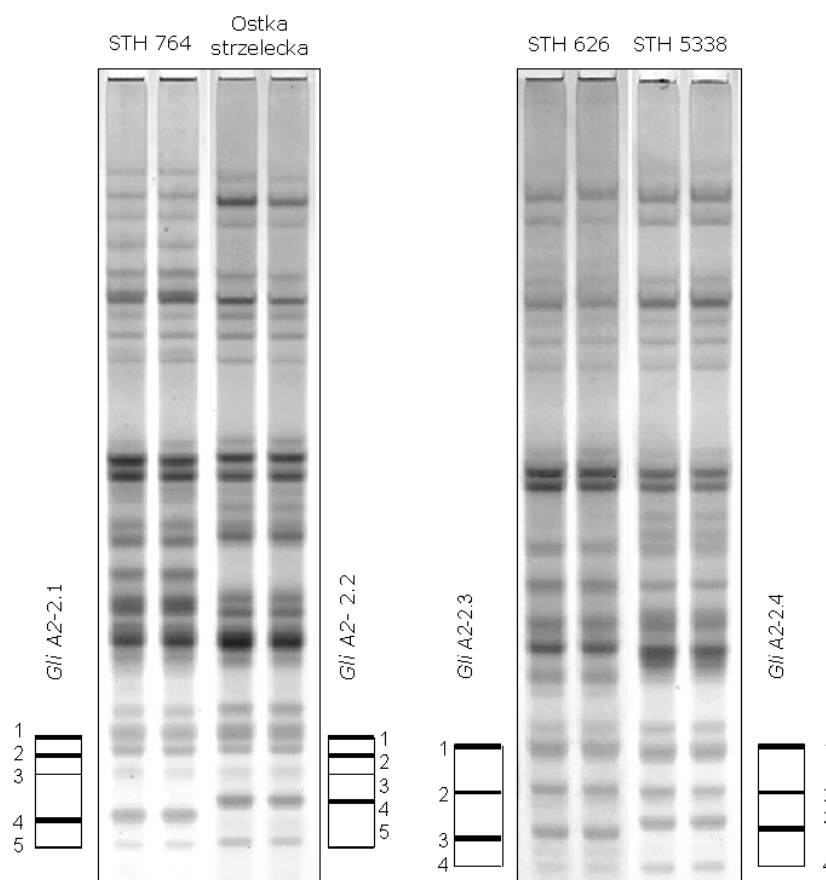
Rys. 7.1. Warianty białkowe obserwowane w obrębie podrodziny bloków gliadynowych typu *Gli* A2-1.2 oraz *Gli* A2-1.3

Fig. 7.1. Protein variants occurred among subfamilies of gliadin blocks of the types *Gli* A2-1.2 and *Gli* A2-1.3



Rys. 7.2. Warianty białkowe obserwowane w obrębie podrodziny bloków gliadynowych typu *Gli* A2-1.4

Fig. 7.2. Protein variants observed among subfamily of gliadin blocks of the type *Gli* A2-1.4



Rys. 8. Cztery podrodziny bloków białek gliadynowych typu *Gli A2-2*
Fig. 8. Four subfamilies of gliadin protein blocks of the type *Gli A2-2*

Nie nakładają się one na siebie, są znacznie oddalone i nie tworzą, tak charakterystycznych dla typu *Gli A2-1*, intensywnych plam. Dzięki temu ich obraz jest łatwiejszy do identyfikacji i do odróżnienia od wszystkich wariantów z rodziny *Gli A2-1*.

Cztery bloki grupy drugiej oznaczono symbolami: *Gli A2-2.1*, *Gli A2-2.2*, *Gli A2-2.3*, *Gli A2-2.4*. Zarówno w przypadku pierwszej (2.1 i 2.2), jak i drugiej pary (2.3 i 2.4) różnice w układzie prążków elektroforetycznych polegają na niewielkim, lecz dokładnie widocznym, przesunięciu frakcji oznaczonej numerem 3. Cztery formy pszenicy ozimej pochodzące z kolekcji ZOJiMHZ w Krakowie zawierające wymienione bloki stanowią linie czyste i mogą być wykorzystane jako wzorce elektroforetyczne do ich identyfikacji. Są to: ród STH 764 (wariant 2.1), odmiana Ostka strzelecka (wariant 2.2), rody: STH 626 (wariant 2.3) oraz STH 5338 (wariant 2.4).

Prążki wchodzące w skład bloków opisanych w niniejszym akapicie charakteryzowano na podstawie wskaźnika Rm, który umożliwił graficzne opracowanie ich schematu (tab. 5).

Wartości R_m dla prążków, które wchodzą w skład bloków gliadynowych warunkowanych chromosomem 6A

The R_m values for gliadin bands belonging to blocks coded by the chromosome 6A

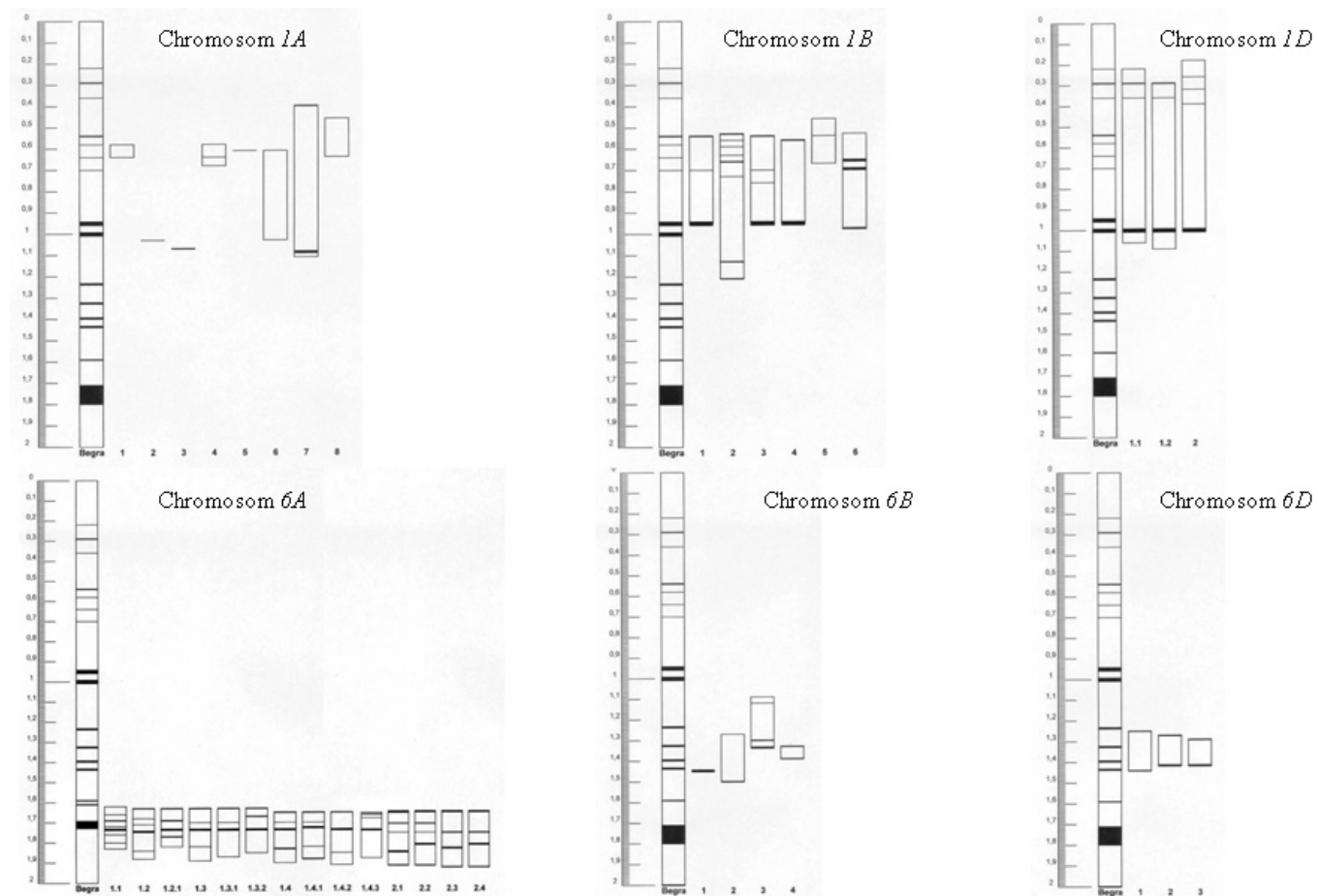
Blok gliadyn Gliadin block	Numer prążka Number of the band								Genotyp Genotype
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Gli A2-1.1	1.62	1.66	1.69	1.72	1.74	1.76	1.80	1.83	kbb-sp 1
Gli A2-1.2	1.63	1.68	1.71	1.75	1.84	1.88			sth 183
Gli A2-1.2.1	1.63	1.69	1.73	1.77	1.82				sth 650
Gli A2-1.3	1.63	1.70	1.74	1.82	1.89				60 A
Gli A2-1.3.1	1.64	1.70	1.75	1.87					Sukces, Tonacja
Gli A2-1.3.2	1.63	1.67	1.74	1.85					sth 5295
Gli A2-1.4	1.65	1.70	1.74	1.83	1.90				Korweta
Gli A2-1.4.1	1.65	1.70	1.72	1.82	1.88				Kris
Gli A2-1.4.2	1.66	1.75	1.85	1.91					sth 490
Gli A2-1.4.3	1.65	1.74	1.89						Elena
Gli A2-2.1	1.64	1.70	1.75	1.86	1.93				sth 764
Gli A2-2.2	1.64	1.70	1.75	1.82	1.93				Ostka strzelecka
Gli A2-2.3	1.64	1.75	1.84	1.94					sth 626
Gli A2-2.4	1.64	1.75	1.82	1.94					sth 5338

Katalog bloków białek gliadynowych

Zidentyfikowane bloki gliadyn w postaci schematów graficznych wprowadzono do katalogu, który aktualnie obejmuje 38 wariantów białkowych. Osiem spośród nich jest warunkowanych chromosomem 1A, sześć — chromosomem 1B, trzy — chromosomem 1D, czternaście — chromosomem 6A, cztery — chromosomem 6B i wreszcie trzy — chromosomem 6D (rys. 9). Katalog zawiera szereg nowych bloków, nieuwzględnionych w jego pierwotnej wersji (Waga, 2000). Zastosowana w badaniach analiza genetyczna mieszańców F₂ jest najbardziej wiarygodną metodą identyfikacji nowych bloków. Natomiast porównanie obrazów elektroforetycznych genotypów blisko spokrewnionych zwiększa jej dokładność.

Katalog w obecnej postaci może ułatwiać charakterystykę polskich odmian i rodów pszenicy pod względem białek gliadynowych. Na podstawie katalogu obraz elektroforetyczny genotypu można zapisać przy użyciu sześciu symboli liczbowych odpowiadających numerom katalogowym bloków. Uzyskany kod tworzy formułę elektroforetyczną odmiany lub rodu.

Analiza dziewiętnastu form z kolekcji roboczej HR Strzelce sp. z o.o. stanowi przykład ilustrujący możliwość praktycznego wykorzystania tej formy zapisu w badaniach struktury populacji pod względem genów białek gliadynowych (tab. 6). W badanej grupie odmian i rodów stwierdzono największe zróżnicowanie dla bloków warunkowanych chromosomem 6A (14 wariantów białkowych). Pozostałe chromosomy były reprezentowane przez trzy (w przypadku chromosomu 6D) do sześciu bloków (w przypadku chromosomu 1A).



Rys. 9. Katalog bloków białek gliadynowych. Z lewej strony każdego schematu zaznaczono skalę wartości Rm oraz schemat gliadyn odmiany wzorcowej Begra

Fig. 9. Catalogue of gliadin protein blocks. Rm values and gliadin bands of the cultivar Begra are given on the left side of each diagram

Tabela 6

Formuły elektroforetyczne wybranych form pszenicy ozimej z kolekcji roboczej HR Strzelce Sp. z o.o.
Electrophoretic formulas of winter wheat's chosen from the collection of HR Strzelce Sp. z o.o.

Odmiana/ Ród Cultivar/ Strain	<i>Gli A1</i>	<i>Gli B1</i>	<i>Gli D1</i>	<i>Gli A2</i>	<i>Gli B2</i>	<i>Gli D2</i>
60 A	7	1	1.1	1.3	xx	2.1
Elena	3	3	1.1	1.4.3	xx	3.1
Jawa	2	1	1.1	1.3	3	1.1
Korweta	6	1	2	1.4	xx	1.1
Kris	3	1	1.1	1.4.1	xx	1.1
Oberkummler Rotkorn (orkisz)	4	6	1.2	1.1	3	1.1
Ostka Strzelecka	1	1	1.1	2.2	xx	xx
Rywalka	1	1	1.1	2.2	xx	1.1
Soraja	1	3	2	2.1	xx	1.1
Sukces	1	1	1.1	1.3.1	xx	1.2
Tonacja	1	1	1.1	1.3.1	xx	1.2
STH 146	3	2	1.1	2.1	3	1.1
STH 183	2	2	1.1	1.2	xx	1.1
STH 490	1	1	1.1	1.4.2	xx	1.1
STH 5295/1	2	2	1.1	1.3.2	xx	3.1
STH 5338	1	1	1.1	2.4	xx	1.1
STH 626	1	1	1.1	2.3	xx	1.1
STH 650	2	2	1.1	2.1	xx	1.1
STH 764	1	1	2	2.1	xx	1.1

xx — Niezidentyfikowane bloki gliadyn

xx — Unidentified gliadin blocks

W pierwszej grupie homeologicznej zaobserwowano ilościową dominację bloków *Gli A1-1*, *Gli B1-1* oraz *Gli D1-1* nad pozostałymi blokami warunkowanymi przez chromosomy 1A, 1B i 1D. Co prawda liczebność badanej populacji jest zbyt mała by formułować ogólne wnioski na temat rozpowszechnienia różnych bloków gliadyn w skali kraju. Niemniej jednak pozwala ona stwierdzić — obserwowane już we wcześniejszych badaniach — znaczące ograniczenie liczebności bloków *Gli B1-4* oraz *Gli D1-2* (wyniki nie publikowane). Pierwszy z nich został całkowicie wyeliminowany natomiast drugi pojawił się zaledwie w trzech formach pszenicy. Zjawisko to ma charakter niekorzystny, gdyż oba bloki były powiązane z wysoką jakością technologiczną (Sozinov i Poparella, 1980; Waga i Węgrzyn, 2000). Obserwowano je między innymi u takich odmian jak Bezostna 1 czy Mironowska 808. Jest to typowy przykład zawężania puli genowej na skutek selekcji i stanowi sygnał do intensyfikacji badań nad poszukiwaniem nowych źródeł zmienności genetycznej dla potrzeb polskiej hodowli. Podobne zjawisko erozji genetycznej, potwierdzone wynikami analizy częstotliwości bloków gliadynowych, obserwowano również w innych krajach Europy (Metakovsky i Branlard, 1998). Za jedną z jego przyczyn uznano zbyt częste wykorzystywanie tych samych bądź genetycznie zbliżonych komponentów rodzicielskich w programach krzyżowań. Elektroforeza gliadyn (jak również innych polimorficznych białek pszenicy) może odegrać ważną rolę w poszukiwaniu nowych genów, wprowadzania ich do materiałów hodowlanych, jak również zapobieganiu ich eliminacji.

Innym zjawiskiem, na które warto zwrócić uwagę, jest występowanie w grupie gliadyn warunkowanych chromosomem 6A rodzin i podrodzin zbliżonych do siebie bloków białkowych. Powstały one na drodze rekombinacji wewnątrzgenowej w *locus Gli A2*. Ich obecność tłumaczy wyniki analizy polimorfizmu DNA. W badaniach z wykorzystaniem metody RFLP stwierdzono obecność ponad 150 genów warunkujących syntezę α -gliadyn (Anderson i in., 1997). I choć połowę z nich stanowią tzw. pseudogeny (warianty niekodujące bądź null allele) to i tak liczba wariantów kodujących jest większa niż w przypadku pozostałych grup białek gliadynowych.

Znacznego zróżnicowania można oczekiwać także wśród bloków warunkowanych chromosomami 6B i 6D. Niewielka ich liczba w katalogu wynika ze złożonej budowy fizykochemicznej, o czym wspomniano we wcześniejszej pracy (Waga, 2005). Identyfikacja nakładających się frakcji gliadyn w tej strefie obrazu elektroforetycznego wymaga szczegółowych badań w ramach specjalnie przygotowanego programu krzyżowań oraz z wykorzystaniem uzupełniających metod izolowania i oczyszczania białek.

Opracowany katalog będzie sukcesywnie poszerzany zarówno o bloki typowe dla polskich odmian i rodów pszenicy, jak również bloki specyficzne, występujące u form prymitywnych i w populacjach lokalnych. Można oczekiwać, iż szczegółowa charakterystyka komponentów gliadyn przyczyni się do zwiększenia efektywności metod hodowlanych wspomaganych przez elektroforetyczne markery białkowe.

LITERATURA

- Anderson O. D., Litts J. C., Greene F. C. 1997. The α -gliadin gene family. I. Characterization of ten new wheat α -gliadin gene clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and Southern analysis of the gene family. *Theor. Appl. Genet.* 95:50 — 58.
- Brites C., Carrillo J. M. 2000. Inheritance of gliadin and glutenin proteins in four durum wheat crosses. *Cereal Res. Commun.* 28/3:239 — 246.
- Bushuk W. 1998. Wheat breeding for end-product use. *Euphytica* 100: 137 — 145.
- De Ritis G., Auricchio G., Jones H. H., Lew E. J. L., Bernardin J. E., Kasarda D. D. 1988. *In vitro* (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in coeliac disease. *Gastroenterology* 94: 41 — 49.
- Javornik B. 1989. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoresis. *Podravka* (7) 1: 49.
- Kasarda D. D. 1980. Structure and properties of α -gliadins. *Ann. Technol. Agric.* 29: 151 — 173.
- Metakovsky E. V. 1991. Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet. Breed.* 45: 325 — 344.
- Metakovsky E. V., Novoselskaya A. Y. 1991. Gliadin allele identification in common wheat. I. Methodological aspects of the analysis of gliadin pattern by one-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *J. Genet. Breed.* 45: 317 — 324.
- Metakovsky E. V., Branlard G. 1998. Genetic diversity of French common wheat germplasm based on gliadin alleles. *Theor. Appl. Genet.* 96: 209 — 218.
- Pogna N. E., Metakovsky E. V., Redaelli R., Raineri F., Dachkevitch T. 1993. Recombination mapping of Gli-5, a new gliadin-coding *locus* on chromosomes 1A and 1B in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87: 113 — 121.
- Sozinov A. A., Poperella F. A. 1980. Genetic classification of prolamins and its use for plant breeding. *Ann. Techn. Agric.* 28: 229 — 245.
- Sozinov A. A. 1985. Polimorfizm bielkov i jego znaczenie w genetyce i selekcji. *Nauka*: 99 — 101.
- Waga J. 2000. Syntetyczna metoda klasyfikacji białek gliadynowych. *Biul. IHAR* 215: 35 — 60.

- Waga J., Węgrzyn S. 2000. Powiązanie wybranych frakcji białek gliadynowych ze zmiennością cech użytkowych odmian i rodów pszenicy ozimej. *Biul. IHAR* 215: 61 — 76.
- Waga J. 2005. Dziedziczenie wybranych frakcji białek gliadynowych u mieszańców orkisz z pszenicą zwyczajną. *Biul. IHAR* 236: 25 — 40.
- Wrigley C. W., Robinson P. J., Williams W. T. 1982. Associations between individual gliadin proteins and quality, agronomic and morphological attributes of wheat cultivars. *Aust. J. Agric. Res.* 33: 409 — 418.