

Poprawa jakości glutenu pszenicznego celem inżynierii genetycznej

Ewa Filip, Stanisława Maria Rogalska

Katedra Biologii Komórki, Wydział Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

Wheat gluten quality improvement – target of genetic engineering

Summary

Gluten is a very big natural polymer produced in wheat (*Triticum aestivum* L) grains. Its quality depends on high-molecular-weight (HMW) of glutenin subunits which belong to wheat prolamins. This paper reviews literature data on properties of gluten, understanding the control of HMW glutenin genes, structure of their products and producing of wheat transgenic lines.

Key words:

gluten, HMW-glutenin subunits, *Glu-1* loci, transgenic lines, *Triticum aestivum* L.

1. Powstawanie glutenu

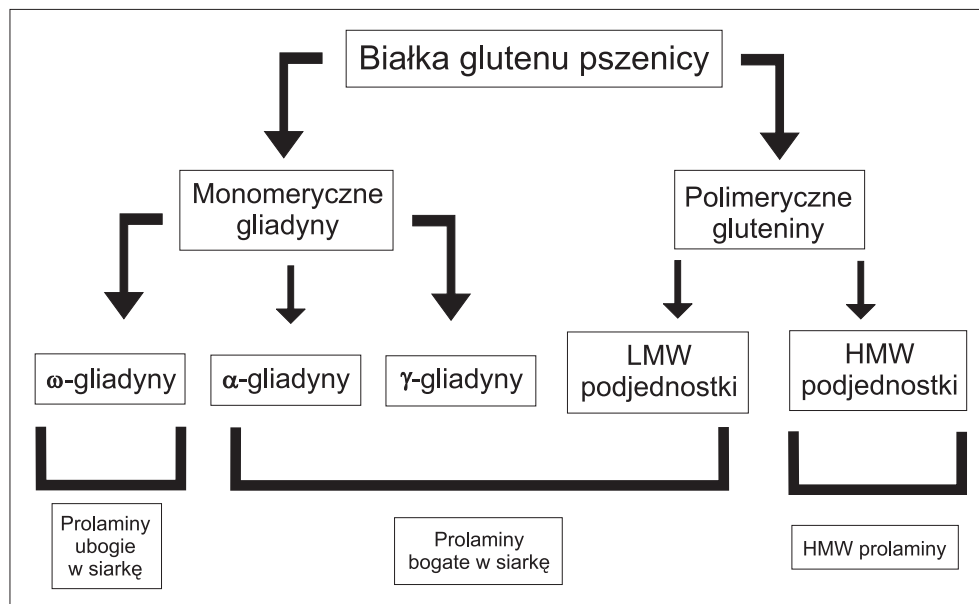
Białka zapasowe w ziarniakach pszenicy (*Triticum aestivum* L) determinują jakość wypiekową mąki poprzez formowanie w cieście elastycznej sieci zwanej glutenem. Ze względu na swoją ważność w jakości wypiekanego ciasta, białka glutenowe są przedmiotem rozległych badań w ciągu 260. lat od kiedy zostały po raz pierwszy odkryte i wyizolowane. Dotyczą one struktury i właściwości glutenu, a wyniki ich są podstawą do genetycznej manipulacji i ulepszenia jakości glutenu. Gluten jest naturalnym, dużym polimerem, posiadającym dwie podstawowe cechy: ewolucyjną konserwatywność i wysoki stopień polimorfizmu. Pierwsza cecha wynika z faktu, że geny kodujące gluten wykazują wysoki stopień konserwatywności. Druga wynika stąd, że zmiany w strukturze glutenu są determinowane przez wystąpienie nowych formacji genów, które go kodują (1). Gluten jest mieszaniną

Adres do korespondencji

Stanisława Maria
Rogalska,
Katedra Biologii Komórki,
Wydział Nauk
Przyrodniczych,
Uniwersytet Szczeciński,
ul. Wąska 13,
71-415 Szczecin;
e-mail:
ewafilip@univ.szczecin.pl

biotechnologia

3 (82) 143–152 2008



Rys. Tradycyjna klasyfikacja białek glutenowych (4).

co najmniej 50. białek (rys.). W różnych genotypach pszenicy istnieje duża zmienność komponentów białkowych glutenu (polimorfizm) (2).

Gluten może być wyizolowany z ciasta przez delikatne wypłukiwanie skrobi pod bieżącą wodą. Zostaje wtedy masa białkowa zatrzymująca swoją lepkość i elastyczność. Sucha masa glutenu składa się w 75% z białek, a pozostałe składniki to skrobia i lipidy. Olbrzymia większość białek glutenu należy do prolamin, które rozpuszczają się w wodnych roztworach alkoholu (60-70%). Niektóre z nich w stanie natywnym nie rozpuszczają się w alkoholu, gdyż występują jako polimery stabilizowane przez mostki disiarczkowe. Można zatem podzielić prolaminy na monomeryczne gliadyny i polimeryczne gluteniny (3). Białka te syntetyzowane w bielmie skrobiowym są kierowane do lumen siateczki śródplazmatycznej-ER, gdzie są zwijane i łączone przez międzycząsteczkowe mostki disiarczkowe w olbrzymie agregaty (4). Polimery te są odkładane wewnątrz lumen ER w pęcherzyki ER tworzące ciała białkowe. Gliadyny są kierowane do Aparatu Golgiego i potem do wakuoli, gdzie formuje się depozyt białkowy (5). Pojedyncze polipeptydy są syntetyzowane na rybosomach ER i przechodzą przez translokon do lumen, tam tracą swoją sekwencję sygnałną i podlegają odpowiedniej modyfikacji. W czasie dojrzewania białek wydzielniczych dodawane są specyficzne cysteiny, które tworzą mostki disiarczkowe, łączące ze sobą kowalencyjnie różne polipeptydy. Za tworzenie się mostków disiarczkowych i izomerację tych białek odpowiada enzym proteinowa izomeraza disiarczkowa-PDI (6). PDI jest długotrwałym i obficie występującym białkiem w ER zdolnym do katalizowania oksy-

dacji SH-disiarczkowej, redukcji i izomeryzacji. Izomerazy disiarczkowe białkowe tworzą rodzinę, która ulokowana jest w ER. Wykazano też, że enzym ten odpowiada za właściwą formację ciał białkowych (7). Nie tylko właściwości białek i ich geny są obiektami zainteresowań badaczy i przemysłu, ale też czynniki wpływające na ich właściwe ukształtowanie i rozmieszczenie, takie jak molekularne chaperony, tioredoksyny-TR i izomerazy disiarczkowe, gdyż katalizują one proces fałdowania białek, a zatem od ich sprawności zależy jakość glutenu. Podczas późniejszych stadiów dojrzewania ziarna komórki endospermy skrobiowej ulegają destrukcji i zamierają, a ciała białkowe łączą się i tworzą ciągłą macierz otaczającą ziarna skrobi i inne organelle i błony. W wyniku tego poszczególne komórki mąki pszenicznej zawierają sieć białek gluteninowych, które łączą się w czasie mieszania ciasta (6). Jest ciekawe, że gluteniny nie mają sekwencji sygnałnych zatrzymujących je w ER. Podaje się, że są one preferencyjnie tam zatrzymywane wskutek przekształcania w polimery o wysokiej masie cząsteczkowej (8). Biologiczną rolą glutenu jest dostarczanie węgla, azotu i siarki kiełkującym nasionom, a jego lepkość i elastyczność jest, jak się wydaje, całkowicie przypadkową konsekwencją sekwencji aminokwasów i ich interakcji (9).

2. Charakterystyka strukturalna HMW-GS (podjednostek gluteninowych o wysokiej masie molekularnej)

Fracja prolamin o wysokiej masie molekularnej-HMM lub HMW jest ilościowo mała, ale decyduje o elastyczności i lepkości glutenu pszenicznego (10). Stąd też w ciągu ostatnich 25. lat główny nacisk w badaniach położono na strukturę i właściwości tych białek oraz na ich uwarunkowania genetyczne (3). Za pomocą elektroforezy SDS-PAGE wyróżniono dwa różne typy HMM: -x i -y. Typ -x wolniej porusza się i ma większą masę molekularną niż typ y (11). Podjednostki gluteninowe są bogate w prolinę, glicynę i kwas glutaminowy, a ubogie w lizynę. Mają niepowtarzalne terminalne domeny -N i -C, które ograniczają obszar centralny, powtarzalny, który decyduje o elastyczności białka (12). W końcach N i C mają aminokwasy z ładunkiem elektrycznym i zawierają wszystkie albo większość cystein obecnych w podjednostce. Domeny N-końcowe mogą mieć różną długość, mogą mieć od 81 do 89 aminokwasów w typie x i 104 aminokwasy w typie y. Różnice te wynikają z delecji dwóch cystein w typie x, co w konsekwencji daje 3 cysteiny w N-końcu w typie x i 5 cystein w typie y. Badania strukturalne i molekularne pokazują, że ta domena jest globularna z jedną lub więcej alfa-helis (10,13,14) Domeny terminalne C we wszystkich podjednostkach zawierają 42 aminokwasy z pojedynczą cysteiną w pozycji 13 i mogą mieć strukturę dwóch helis alfa-helikalnych (15). Domena centralna zawiera heksa- i nonapeptydowe powtórki, które są następujące w typie y-PGQGQQ i GYYPTSLQQ: ProGlyGlnGlyGlnGln. W typie x występują powtórzenia motywów trój-, heksa- i nonaaminokwasowych jak następuje: GQQ, PGQGQQ i GYYPTSPQQ: GlyGlnGln, ProGlyGlnGlyGlnGln oraz GlyTyrTyrProThrSerProGlnGln (16). Glutamina wykazuje

konserwatywność pozycji w stosunku do innych aminokwasów. W heksapeptydzie występuje zawsze w pozycji 3, 5 i 6, w nonapeptydzie w pozycji 8 i 9 i w 2 i 3 w tripeptydzie. Seryna też jest konserwatywnie związana z pozycją 6 nonapeptydów. Pozycje 1 i 4 heksapeptydów oraz pozycja 7 nonapeptydów są mało konserwatywne. Pewne różnice pod tym względem są obserwowane pomiędzy typami x i y. Najwięcej substytucji występuje na skutek zmian w pojedynczym nukleotydzie w obszarze kodującym (3). Powtórzenia heksa- i nonapeptydowe tworzą około 90% domeny powtarzalnej (17,4). Wymienione motywy są powtórzone od około 490. do 700. razy (3). W centralnej domenie powtarzalnej jest struktura regularna, spiralna, a obszary terminalne mają strukturę alfa-helikálną (18,19). Glutamina występująca w dużych ilościach ma zdolność do tworzenia wewnątrz- i międzycząsteczkowych połączeń wodorowych co warunkuje elastyczność glutenu (20). W czasie mieszania ciasta niektóre z tych połączone pękają na skutek rozciągania i powstają ruchome obszary nie połączone („pętle”) i połączone („łańcuchy”). Pod wpływem stresu – rozciągania, „pętle” rozciągają się, ale po ustaniu stresu powracają do pierwotnej formy (9).

3. Dwie ważne cechy glutenin HMW-GS

Dwie ważne cechy glutenin HMW-GS opisują je jako najważniejsze elastomery glutenu, a mianowicie są to: liczba i rozmieszczenie połączeń disiarczkowych i właściwości domen powtarzalnych.

Na podstawie analizy połączeń disiarczkowych za pomocą enzymu rozkładającego frakcję gluteninową ujawniono liczne międzyłańcuchowe i wewnątrzłańcuchowe mostki disiarczkowe w HMW (podjednostki gluteninowe o wysokiej masie molekularnej) (21). W typie x w końcu N występuje jedno połączenie disiarczkowe międzyłańcuchowe, a w typie y 2 równoległe mostki między N końcami: mostek łączący podjednostki typu y i LMW (podjednostki gluteninowe o niskiej masie molekularnej) oraz mostek łączący typy y i x w sposób „głowa-ogon” (ang. *head-to-tail*). To ostatnie połączenie wskazuje na istnienie dimerów x – y w glutenie (22,23). Łańcuchy gluteninowe połączone S-S stanowią elastyczny „kręgosłup” glutenu. Niemniej jednak ważne są też połączenia wodorowe, nie kowalencyjne, które wpływają na elastycznolepkie właściwości glutenu (24). Od zawartości białek HMW w ziarniakach pszenicy i ich wzajemnych połączeń zależy jakość wypiekowa mąki pszenicznej.

4. Geny kodujące HMW-GS

Podjednostki HMW w pszenicy heksaploidalnej są kodowane przez geny – *Glu-1* ulokowane na długich ramionach chromosomów 1A, 1B i 1D – *Glu-1A*, *Glu-1B*, *Glu-1D*. Każdy locus zawiera dwa geny sprzężone kodujące różne typy HMW: x i y (11). Dlatego też locus *Glu-1* prezentuje allelizm wielokrotny. Payne i Lawrenc

w swoich badaniach (22) pokazują, że w locus *Glu-1A* i *1B* jest po 11 alleli, a w *Glu-1D* jest 6 alleli. W innych badaniach ukazuje się wzrost zidentyfikowanych alleli w poszczególnych loci (25). Teoretycznie pszenica chlebowa powinna zawierać 6 różnych podjednostek HMW kodowanych przez te geny. Jednak ze względu na wyciszenie niektórych z nich w odmianach pszenicy najczęściej występują 3-5 podjednostek HMW (*T. durum* zawiera 1-3 podjednostki). Z tego względu wszystkie pszenice heksaploidalne zawierają podjednostki *1Bx*, *1Dx* i *1Dy*, czasami są też *1By* i *1Ax*. Podaje się, że allel kodujący podjednostkę *1Ay* jest zawsze wyłączony w genomie heksaploidalnej pszenicy, a *Ax* jest czynny bardzo rzadko (9,26). Kiedy badano ten gen w różnych odmianach pszenicy stwierdzono, że w niektórych z nich w genie był wstawiony retrotranspozon *WIS-2*, a w drugim cichym genie był kodon „stop” w ramce odczytu (1). Na podstawie dokładniejszych badań wykazano, że w obu genach były insercje retrotranspozonów *WIS-1*, *WIS-2* z różną liczbą powtórek w obszarze centralnym tych elementów. Zastosowanie sztucznych chromosomów – BAC do badania genów gluteninowych pozwoliło na porównanie ich w trzech genomach pszenicy. Porównanie sekwencji flankujących DNA 3 ortologicznych i paralogicznych typów x i y HMW genów gluteninowych wskazuje na ich dywergencję wewnątrz 1200 pz w 5' końcu kodonów startu i około 200 pz przy końcu 3' kodonów stop. Ustalono, że 5 kompletnych genów HMW ma krótkie wstawki retrotranspozonowe w jednym lub dwóch z trzech typów x ortologicznych obszarów promotorowych (1). Porównywano też geny *Dx2* i *Bx7*, które różniły się na skutek insercji delecji. Niektóre z tych zdarzeń prawdopodobnie wystąpiły wskutek akcji elementów ruchomych. Anderson i wsp. (27) zastosowali BAC zawierający klon z *Triticum tauschii*, dawcy genomu D pszenicy heksaploidalnej, do badania locus *Glu-1*. Po zsekwencjonowaniu okazało się, że są tam obecne dwa geny kodujące HMW-GS typu x i y. Okazało się, że geny te występują w tej samej orientacji i są oddzielone 51 489 pz, a obszar DNA rozdzielający je składa się ze zbioru retrotranspozonów o 31 000 pz. Drugi zbiór retrotranspozonów liczący 32 000 pz występuje po obszarze genu kodującego typ x. Każdy gen gluteninowy znajduje się w obszarze unikatywnej sekwencji DNA, gdzie oprócz niego są dwie powtórki bogate w leucynę – LRR/kinazy i dwa hipotetyczne geny podobne do genów ryżowych w bezpośrednim obszarze genów gluteninowych. Porównanie sekwencji ortologicznych obszarów *Glu-1* pomiędzy trzema homoeologicznymi genomami pszenicy ujawniło mikrokolinearność w obszarach genowych i rozbieżność sekwencyjną w obszarach międzygenowych (28).

W większości pszenic o bardzo dobrej jakości wypiekowej mąki jest obecny komplet alleli *Glu-D1d* nazwany 1Dx5 + 1Dy10, który jest markerem dobrej wypiekowości mąki pszenicznej. W pszenicach o słabej wypiekowości mąki najczęściej jest obecny *Glu-D1a*, nazywany 1Dx2 + 1Dy12 (29-32). W badaniach wielu innych odmian pszenicy chlebowej wykazano istnienie innych kombinacji allelicznych. Znaleziono cztery nowe kombinacje w locus *Glu-D1*, a mianowicie: a(2+12), b(3+12), c(4+12) i d(5+10) (31). W badanych 76. polskich odmianach pszenicy za pomocą

Multiplex PCR stwierdzono występowanie następujących kombinacji allelicznych w locus *Glu-1*: *1Ax2** i *1Axnull*, *1Bx6*, *1Bx7*, *1Bx17*, *1Dx2*, *1Dx5* i *1Dx10* kodujących HMW podjednostki gluteninowe (33).

5. Manipulacja składem podjednostek HMW w pszenicy transgenicznej

Geny prolaminowe w plamieniu *Triticeae* (pszenica, jęczmień i żyto) mogą być podzielone na trzy rodziny wielogenowe, które kodują: prolaminy ubogie w siarkę, prolaminy bogate w siarkę i prolaminy o wysokiej masie molekularnej (HMW) (34). Wszystkie geny należące do tych rodzin znacznie różnią się od siebie sekwencją nukleotydową, ale mają wspólną cechę, a mianowicie nie mają intronów. Ich ekspresja jest kontrolowana w skoordynowany sposób na poziomie transkrypcji (35,36). Podlegają ekspresji tkankowospecyficznej, są aktywne tylko w endospermie skrobiowej (37). Geny kodujące prolaminy bogate i ubogie w siarkę mają wspólną sekwencję zgodną:

5'-TGACATGTAAAGTGAATAAGATGAGTCATG, ulokowaną w około 300 pz w górę od punktu startu transkrypcji. Nazwana została elementem – 300 albo boksem prolaminowym lub elementem endospermy. Rola regulacyjna dla tego boxu została ustalona (38,39). Ma on dwa konserwatywne motywy sekwencyjne: TGTAAGT i G(A/G)TGAGTCAT, a obszar między nimi jest zmienny. Pierwszy motyw nazwany został motywem E, a drugi GCN4 (GLM), albo motywem N (38,39). Motyw N jest obecny w odwrotnej orientacji w promotorach genów prolamin bogatych w S i ubogich w S (2). W promotorach genów HMW prolaminowy box nie jest obecny (2). Zamiast niego promotory genów HMW zawierają główny element regulatorowy (40) ulokowany w 38 pz z consensusem: 5'-GTTTTGCAAA GCTCCAATTG CTCCTTGCTT ATCCAGCT. To położenie jest konserwatywne we wszystkich promotorach genów HMW, rozpoczyna się od pozycji -185 do -189 pz (2). Geny prolamin HMW podlegają transkrypcji na wyższym poziomie niż inne geny prolaminowe. Zatem nie zaskakuje, że wyższe poziomy ekspresji genów HMW uzyskano po wprowadzeniu dodatkowych kopii genów kodujących podjednostki HMW do pszenicy (41,42).

Należy podkreślić, że uzyskano znaczną poprawę w jakości wypiekowej mąki pszenicznej poprzez ulepszenie właściwości glutenu na drodze konwencjonalnych metod hodowlanych. Z uwagi na to, że geny kodujące podjednostki gluteninowe HMW są bardzo silnie sprzężone, nie można operować pojedynczymi genami i dalsze ulepszanie sposobami konwencjonalnymi nie obiecuje sukcesu. W tym przypadku jedyną drogą ulepszania jakości glutenu jest inżynieria genetyczna. Jednym z jej sposobów jest otrzymywanie roślin transgenicznych. Pierwszą pszenicę transgeniczną z wprowadzonym dodatkowym genem *1Ax1* otrzymał profesor Vasil ze współpracownikami z Uniwersytetu w Gainesville w 1992 r. W roku 1996 wprowadzili ten gen do odmiany uprawnej pszenicy Bobwhite, która miała o 61% więcej HMW glutenin i była pierwszą formą pszenicy, u której czynnych było 6 genów

HMW. Mąka z tej pszenicy miała wspaniałą jakość wypiekową, a chleb wypieczony z niej miał znakomitą objętość (43). Altpeter i wsp. (41) wprowadzili gen *1Ax1* do pszenicy chlebowej o niezbyt dobrej jakości wypiekowej za pomocą wstrzeliwania do niedojrzałych zarodków hodowanych *in vitro*. Otrzymano 21 linii transformowanych z których 20 linii wykazywało ekspresję selekcyjnego genu *bar* dla *1Ax1*. Ilość białek *1Ax1* produkowanych przez różne linie transgeniczne wahała się od 0,6 do 2,3% całkowitej ilości białek, dając wzrost do 71% ogólnej zawartości glutenin HMW. Rośliny transgeniczne były normalnie płodne i wykazywały segregację Mendelowską transgenów. Ekspresja transgenu *1Ax1* HMW utrzymywała się stabilnie do pokolenia R3. Innym przykładem transformowania pszenicy jest wprowadzanie genów kodujących podjednostki HMW *1Ax1*, *1Dx5*, ten ostatni występuje zawsze w parze z *1Dy10* do linii izogenicznych z różną ekspresją genów kodujących podjednostki gluteninowe HMW (3). Otrzymane dwie linie transgeniczne L88-31 i L88-6 analizowano pod względem właściwości glutenu. W badaniach reologicznych wykazano, że ekspresja transgenu *1Dx5* spowodowała wzrost elastyczności glutenu, natomiast wpływ transgenu *1Ax1* był niewielki. Wynik uzyskany z transgenem *1Dx5* był podobny do wyniku traktowania glutenu transglutaminazą w celu wprowadzenia międzylańcuchowych połączeń lizylo-glutamyłowych (44). Z ekspresją transgenu *1Dx5* związany był znaczny wzrost ilości podjednostek gluteninowych, od 18 do 30% całej ilości białek mąki, odpowiednio w liniach L88-31 i L88-6. Białka *1Dx5* różnią się od innych podjednostek białkowych dodatkową cysteiną wewnątrz powtarzalnego obszaru i może być ona odpowiedzialna za formację polimerów w liniach transgenicznych. Stosowanie transformacji pszenicy wymaga testowania odpowiednich promotorów, które byłyby sprawne w środowisku komórek pszenicy i specyficznym w endospermie (34). Badano przydatność promotora genu *Glu-1D-1* z pszenicy *Triticum aestivum* odmiana Cheyenne o sekwencji z pozycji od – 1191 pz do – 650 pz, dodanego do sekwencji genu. Na podstawie analizy obszaru promotora ujawniono obecność dodatkowej kopii sekwencji pierwotnego enhancera i sekwencji elementu regulatora obecnej w innych genach białek zapasowych pszenicy. Skonstruowano gen chimeryczny składający się z obszaru flankującego 5' genu *Glu-1D-1* z pozycji od – 1191 do +58, kodującego obszaru genu *Uida* (*Gus*) i genu terminatora syntazy nopolinowej (*Nos*). Ten gen został wprowadzony do odmiany Ofanto (*Triticum durum*) przez bombardowanie kwiatostanów. Otrzymano dwie transgeniczne linie wykazujące ekspresję genu *Gus* w ziarniakach w ciągu 10-12 dni po zapyleniu. W histochemicznej analizie homozygotycznych nasion T2 wykazano, że ekspresja genu ograniczyła się tylko do skrobiowej części endospermy i nie było ekspresji w warstwie aleuronowej. W wyniku analizy *Western blotting* stwierdzono ekspresję transgenu wrazającą się produkcją odpowiedniego białka HMW. Niestety nie podano charakterystyki tego białka. Inne transformacje pszenicy dotyczyły genów *Glu-1*, *By14* i *Glu-1By15*, które wprowadzono do chińskich odmian pszenicy za pomocą metody łagiewkowej (łagiewka pyłkowa). Uzyskano 45 linii transgenicznych, 3 z nich wykazywały ekspresję *1By15* (45). Z badań wynika, że geny kodujące

podjednostki HMW gluteninowe są uruchamiane po około 8 dniach po zapyleniu i transkrypcja ich zanika po upływie 36-38 dni po zapyleniu (46). Aby dokładnie zbadać jak zachowują się transgeny wprowadzono do odmiany pszenicy Federal geny podjednostek *1Ax1* i *1Dx5* razem z ich obszarami promotorowymi. Dwie z otrzymanych linii transgenicznych zawierających około 20 kopii (linia E) i 50 kopii (linia F) transgenów miała te geny wyciszone co spowodowało znaczne obniżenie produktów tych genów w porównaniu do formy kontrolnej (47). W dalszych badaniach tych linii wykazano, że loci transgeniczne były widoczne jako skondensowane obszary genomu w tkankach, w których nie są one aktywne transkrypcyjnie. Natomiast w endospermie dekondukcja chromatyny następowała razem ze startem transkrypcji w 8 dni po zapyleniu. Wykazano, że większość transgenów była aktywna i kończyła się wraz ze śmiercią komórki. Stwierdzono również, że transkrypt zanika z cytoplazmy po czternastu dniach po zapyleniu i równocześnie znaleziono siRNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*). Ze względu na to, że poziom transkryptu pozostawał wysoki w punktach transkrypcji, a w cytoplazmie nie, wywnioskowano, że głównym wyciszeniem transgenów jest wyciszenie potranskrypcyjne kierowane przez siRNA (48). Bregitzer i wsp. (49) podają, że w czasie procesu transformacji mogą wystąpić zmiany epigenetyczne powodujące utratę wielu cech agrotechnicznych. Z tego względu założono dwuletnie doświadczenie polowe, z udziałem licznych transformantów, modyfikowanych kopiami natywnych lub modyfikowanych genów kodujących HMW-GS, formy kontrolnej Bobwhite, linii zawierających tylko selektywny gen *bar* i linie segreganty z null allelami w celu określenia cech plonotwórczych i plonowania tych form. Okazało się, że linie transgeniczne jako grupa, w porównaniu do Bobwhite wykazywała tendencję do uzyskiwania niższych wartości mierzonych cech. Jednak większość poszczególnych linii nie wykazywała istotnych różnic w plonowaniu w porównaniu do kontroli. Linie null i z genem *bar* plonowały na poziomie Bobwhite. Wyniki te wskazują, że stosowanie metod inżynierii genetycznej do ulepszenia glutenu pszenicy może prowadzić do wytworzenia konkurencyjnych agronomicznie linii używanych jako odmiany lub formy wyjściowe do programu hodowlanego.

Literatura

1. Dekova T., (2005), General and Applied Genetics, Supplement, 19, 3, 11-18.
2. Shewry P. R., Tatham A. S., Halford N. G., (1999), *The prolamins of the Triticeae*, in: *Seed Proteins*, Eds. Shewry P. R., Casey R., Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands, 35-78.
3. Shewry P. R., Halford N. G., Belton P. S., Tatham A. S., (2002), Phil. Trans. R. Soc., Lond, B, 357, 133-142.
4. Shewry P. R., Tatham A. S., (1997), J. Cereal Sci., 25, 201-227.
5. Rubin R. H., Levanoy G., Galili G., (1992), Plant Physiol., 99, 718-724.
6. Schwaller M., Wilkinson B., Gilbert H. F., (2003), J. Biol. Chem., 278, 7154-7159.
7. Ciaffi M., Tanzarella O. A., Porceddu E., (2006), Wheat Information Service, Memorial Issue, 100, 61-75.

8. Galili G., (1997), *The prolamin storage proteins of wheat and its relatives*, in: *Advances in cellular and molecular biology of plants. Cellular and molecular biology of plant seed development*, Eds. Larkins B. A., Vasil I. K., Kluwer, Dordrecht, the Netherlands, 221-256.
9. Anjum F. M., Khan M. R., Din A., Seed M., Pasha I., Arshad M. U., (2007), *Journal of Food Science*, vol., 72(3), 56-63.
10. Tatham A. S., Mifflin B. J., Shewry P. R., (1985), *Cereal Chem.*, 62, 405-442.
11. Shewry P. R., Tatham A. S., Barro F., Lazzeri P., (2006), *Biotechnology*, 13, 1185-1190.
12. Ganibelli M. C., Larroque O. R., McRitche F., Wrigley C. W., (2001), *Cereal Chem.*, 78(6), 635-646.
13. Tatham A. S., Shewry P. R., Mifflin B. J., (1984), *FEBS Lett.*, 177, 205-208.
14. van Dijk A., van Swieten E., Kruize I. T., Robillard G. T., (1998), *J. Cereal Sci.*, 28, 115-126.
15. Bekkers A. C., van Dijk A., deBoef E., van Swieten E., Robillard G., Hamer R. J., (1996), in: *Gluten 96-Proc.*, 6th Int. *Wheat Gluten Workshop*, Sydney, North Meklbourne, Royal Australian Chemical Institute, 190-194.
16. Tatham A. S., Shewry P. R., Belton P. S., (1990b), *Structural studies of cereal prolamins including wheat gluten*, in: Ed. Pomeranz Y., *Advances in cereal science and technology*, St. Paul Minn., American Assn. of Cereal Chemistry, vol., 10.
17. Anderson O. D., Greene F. C., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 77, 689-700.
18. Miles M. J., Carr H. J., McMaster T. C., l'Anson K. J., Belton P. S., Morris V. J., Field J. M., Shewry P. R., Tatham A. S., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 68-71.
19. Shewry P. R., Tatham A. S., Lazzeri P., (1997), *J. Sci. Food Agric.*, 73, 397-406.
20. Belton P. S., Colquhoun I. J., Field J. M., Grant A., Shewry P. R., Tatham A. S., (1994a), *J. Cereal Sci.*, 19, 115-21.
21. Kohler P., Keck B., Muller S., Wieser H., (1994), *Disulphide bonds in wheat gluten*, in: *Wheat kernel proteins, molecular and functional aspects*, Viterbo, Italy, Univ. of Tuscia, 45-54.
22. Payne P. I., Lawrence G. J., (1983), *Cereal Res. Commun.*, 11, 29-35.
23. Tao H. P., Adelsteins A. E., Kasadra D. D., (1992), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1159, 13.
24. Gilbert S. M., Wellner N., Belton P. S., Greenfield J. A., Siligardi G., Shewry P. R., Tatham A. S., (2000), *Biochim. Biophys. Acta*, 1479, 135-146.
25. Yang Z. J., Li G. R., Feng J., (2005), *Hereditas*, 142, 80-85.
26. Anderson O. D., Greene F. C., Yip R. E., Halford N. G., Shewry P. R., Malpica-Romero J. M., (1989), *Nucleid Acid Res.*, 17, 461-462.
27. Anderson O. D., Rausch C., Moullet O., Lagudah E. S., (2003), *Funct. Integr. Genomics*, 3, 56-68.
28. Gu Y. Q., Salse J., Coleman-Derr D., Dupin A., Crossman C., Lazo G. R., Huo N., Belcram H., Ravel C., Charmet G., Charles M., Anderson O. D., Chalhoub B., (2006), *Genetics*, 174, 1493-1504.
29. Payne P. I., Nightingale M. A., Krattiger A. F., Holt L. M., (1987), *J. Sci. Food Agric.*, 40, 51-65.
30. Odenbach W., Mahgoub E. L. S., (1988), in: Eds. Miller T. E., Koebner R. M. D., *Proc. 7th Int. Wheat genetics Symp.* Cambridge, England, 987-991.
31. Rogers W. J., Payne P. I., Hardiner K., (1989), *Plant Breeding*, 103, 89-100.
32. Varghese J. P., Struss D., Kazman M. E., (1996), *Plant Breeding*, 115, 451-454.
33. Moczulski M., Salmanowicz B. P., (2003), *J. Appl. Genet.*, 44(4), 459-471.
34. Lamacchia C., Shewry P. R., Di Fonzo N., Forsyth J. L., Harris N., Lazzeri P. A., Napier J. A., Halford N. G., Barcelo P., (2001), *Journal Exp. Bot.*, vol. 52, 355, 245-250.
35. Bartels D., Thompson R. D., (1986), *Plant Science*, 46, 117-125.
36. Sorensen M. B., Cameron-Mills V., Brandt A., (1989), *Molecular and Gen. Genet.*, 217, 195-201.
37. Duffus C. M., Cochrane M. P., (1992), in: Ed. Shewry P. R., *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*, Wallingford: CAB International, 291-317.
38. Muller M., Knudsen S., (1993), *The Plant Journal*, 4, 343-355.
39. Hammond-Kosack M. C. U., Holdsworth M. J., Bevan M. W., (1993), *The EMBO Journal*, 12, 545-554.
40. Thomas M. S., Flavell R. B., (1990), *The Plant Cell*, 2, 1171-1180.
41. Altpeter F., Vasil V., Srivastava V., Stoger E., Vasil I. K., (1996), *Plant Cell Reports*, 16, 12-17.
42. Barro F., Rooke L., Bekes F., Gras P., Tatham A. S., Fido R., Lazzeri P., Shewry P. R., Barcelo P., (1997), *Nature Biotechnology*, 15, 1295-1299.

43. Vasil I. K., (1999), *Molecular improvement of cereal crops*, Dordrecht, Kluwer Academic Publ.
44. Popineau Y., Deshayes G., Lefebvre J., Fido R., Tatham A. S., Shewry P. R., (2001), *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 395-401.
45. Xu T., Zhang X., Dong Y., (2006), *Agricultural Sciences in China*, vol. 5, 1,725-735.
46. Altenbach S. B., Kothari K. M., Lieu D., (2002), *Cereal Chem.*, 79, 279-285.
47. Alvarez M. L., Guelman S., Halford N. G., Lustig S., Reggiardo M. L., Ryabushkina N., Shewry P. R., Stein J., Vallejos R. H., (2000), *Theor. Appl. Genet.*, 100, 319-327.
48. Wegel E., Vallejos H. R., Christou P., Stöger E., Shaw P., (2005), *Journal of Cell Science*, 118, 1021-1031.
49. Bregitzer P. P., Fiedler D. I., Blechl A. E., Lin J. W., Sebesta P. G., Fernandez de Soto J., Chicaiza O., Dubcovsky J., (2006), *Crop Sci.*, 46, 1553-1563.