

ORIGINAL PAPER

## Изследване на запасните ендоспермови белтъци в *Aegilops tauschii* (2n=14, DD) чрез SDS-PAGE и A-PAGE електрофореза

Соня Донева<sup>1</sup> • Надя Даскалова<sup>2</sup> • Дияна Йорданова<sup>1</sup> •  
Пенко Спецов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево, България

<sup>2</sup>Технически университет-Варна, България

<sup>3</sup>Аксаково, 9154, област Варна, България

Автор за кореспонденция: Соня Донева; E-mail: sonya\_doneva@yahoo.com

## Investigation of storage proteins in *Aegilops tauschii* (2n=14, DD) through SDS-PAGE and A-PAGE electrophoresis

Sonya Doneva<sup>1</sup> • Nadya Daskalova<sup>2</sup> • Diyana Yordanova<sup>1</sup> •  
Penko Spetsov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dobrudzha Agricultural Institute, General Toshevo, Bulgaria

<sup>2</sup>Technical University - Varna, Bulgaria

<sup>3</sup>Aksakovo, 9154, Varna region, Bulgaria

Corresponding Author: Sonya Doneva; E-mail: sonya\_doneva@yahoo.com

Received: October 2018 / Accepted: February 2019 /

Published: March 2019 © Author(s)

### Abstract

Doneva, S., Daskalova, N., Yordanova, D. & Spetsov, P. (2019). Investigation of storage proteins in *Aegilops tauschii* (2n=14, DD) through SDS-PAGE and A-PAGE electrophoresis. *Field Crops Studies*, XII(1), 129-140.

Nine *Aegilops tauschii* accessions, D genome donor to *Triticum aestivum*, are subjected to this study. Five x-type subunits (null, 1t, 2.1t, 4t, 5t) with slower mobility and six y-type proteins (10t, 10.1t, 10.2t, 10.3t, 12t, 12.3t) with faster mobility were identified through SDS-PAGE procedure. They formed seven configurations of high molecular weight glutenins which were not found in the bread wheat. The biochemical analysis showed greater amount of low molecular weight glutenins

in seeds of the wild progenitor than in common wheat. Six accessions possessed proteins coded by allele 'a', and three - by 'c' located in *Glu-D3* locus of *Triticum aestivum*. A-PAGE electrophoresis resulted in high level of genetic polymorphism in *Gli-Dt1* and *Gli-Dt2* loci among the analysed samples. Some proteins of No199 and No219 represented high molecular  $\omega$ -gliadins with different electrophoretic mobility than the same proteins in standard wheats. No212, No213 and No227 were distinguished from others through the absence of several slow mobile  $\omega$ -gliadins which are typical for bread wheat. This investigation confirmed that the wild diploid relative *Aegilops tauschii* seemed as a valuable resource of specific genes for breeding of high quality grain.

**Key words:** A-PAGE, *Aegilops tauschii*, D genome, gliadins, HMW glutenins, LMW glutenins, SDS-PAGE, *Triticum aestivum*

## Въведение

През последните години в областта на отдалечената хибридизация при хлебната пшеница е постигнат значителен напредък, особено за подобряване на нейното качество и устойчивост на стресови фактори. Въпреки това търсенето и характеризирането на нови генни източници е една от основните стратегии на съвременните селекционни програми.

Многобройни проучвания определят диплоидния вид *Aegilops tauschii* ( $2n=14$ , DD), който е донорът на D-генома в хексаплоидната пшеница, като важен генетичен ресурс за нейното подобряване. Досега в този вид са открити редица гени за устойчивост и толерантност към абиотичен и биотичен стрес, както и glutенинови и gliадинови алели, свързани с качеството. Чрез създаването на синтетични хексаплоидни пшеници, които са своеобразен „мост” между дивите и културните форми, се извършва интрогресия на генетичен материал от диплоидния вид в съвременната хлебна пшеница (Hsam et al., 2001; Mujeeb-Kazi and Van Ginkel, 2004; Zhang et al., 2009; Wang et al., 2012; Kalia, 2015; Doneva, 2017). Получените нови пшенични линии са с подобрени хлебопекарни характеристики в сравнение с *T. aestivum*.

Най-важен за крайните технологични показатели на брашното е glutенът, който е основният пшеничен ендоспермов протеин (Branlard et. al., 2001, Rasheed et al., 2012<sup>a</sup>, Rasheed et al., 2012<sup>b</sup>). Той е съставен от две проламинови групи – glutенини и gliадини. Glutенините включват високомолекулни (ВМГ) и нискомолекулни glutенинови (НМГ) субединици. *Aegilops tauschii* съдържа една или две ВМГ фракции, които са кодирани от locus *Glu-D1*, разположен в дългото рамо на хромозома 1D. Гените, кодиращи НМГ фракции са локализиращи в locus *Glu-D3*, намиращ се в дисталния край на късото рамо на същата хромозома. Gliадините се контролират от два локуса: *Gli-D1* и

*Gli-D2*, разположени в късите рамена на хромозоми 1D и 6D, съответно.

Основна цел на настоящото изследване е да се проучи алелното вариране на запасните ендоспермови белтъци в девет образеца на вида *Aegilops tauschii*. Изследванията по отношение на ВМГ, НМГ и глиадините имат значение за по-пълната селекционна характеристика на диплоидния вид във връзка с използването му в съвременните селекционни програми за подобряване на качеството в обикновената пшеница.

## Материали и методи

### 1. Материали

Обект на изследване са 9 образеца от вида *Aegilops tauschii* (Табл. 1).

Таблица 1. Произход и геномна формула на изследваните образци от *Aegilops tauschii*

Table 1. Origin and genome formula of *Aegilops tauschii* accessions in the study

Образец, № Sample, No	Геномна формула Genome formula	Произход на семената Seed origin
144, 199, 204, 205, 212, 213, 218, 219, 227	2n=14, DD	Гатерслебен, Германия/ Gatersleben, Germany

Сортовете обикновена пшеница, използвани като стандарти в електрофоретичните методи са представени в Таблица 2.

Таблица 2. Характерен признак и произход на стандартните сортове пшеница

Table 2. Typical trait and origin of standard wheat varieties

Стандарт Standard	Характерен признак Typical trait	Произход Origin
Безостая 1/Bezostaya 1	Зимна, обикновена пшеница Winter, common wheat	Русия/Russia
Cheyenne	Зимна, обикновена пшеница	Япония/Japan
Hope	Зимна, обикновена пшеница	Япония/Japan
Chinese Spring	Пролетна, обикновена пшеница Spring, common wheat	Китай/China

## 2. Методи

Анализът е осъществен чрез електрофореза на единични зърна. Те се стриват на фино брашно, след предварително отстраняване на зародишите им с помощта на скалпел. Първо се екстрахират глиадините, а утайката след тази екстракция се използва за анализ на глутенините.

### *Екстракция и електрофореза (A-PAGE) на глиадини*

Глиадините са екстрахирани със 70% етилов алкохол, а самото разделяне на белтъчните фракции е извършено с едномерна кисела вертикална електрофореза (A-PAGE) по Khan et al. (1983) с известни модификации, направени в лабораторията по биохимия на зърнено-житните култури на ДЗИ – Генерал Тошево. Електрофорезата е осъществена на 8% разделящ гел, а дебелината на гелната плака е 2 mm при постоянна сила на тока от 60 mA, която след 1 час се увеличава на 120 mA. Продължителността на електрофорезата при тези условия е около 5 часа при постоянна температура от 10 °C. След това гелове се фиксират и оцветяват с 0.15 % кумаси брилянт блу (СВВ) R250, 20 % етанол и 12 % трихлороцетна киселина за 24 часа. Следва обезцветяване с дестилирана вода и сканиране.

### *Екстракция и електрофореза (SDS-PAGE) на глутенини*

Екстракцията на високомолекулните глутенини е осъществена по метода на Singh et al. (1991). Към всяка стрита на брашно проба се добавя 0.50 ml 50% пропанол, за да се отстранят албумините и глобулините. Следва екстрахиране на глутенините, като първо към пробата се добавя 0.1 ml 50% (v/v) пропанол, 0.08 M Tris – HCl (pH 8.0), съдържащ 1% (w/v) прясно добавен дитиотреитол (DTT). След инкубиране за 1 час при 65°C към всяка проба се добавя 0.1 ml 50% (v/v) пропанол, съдържащ 1.4% (v/v) прясно добавен 4–винилпиридин (VP). По този начин се извършва алкилиране на SH–групите в пробите. Следва инкубация за 1 час при 65°C и центрофугиране за 10 минути при 12000 g. 0.2 ml от всеки супернатант се прехвърля в нова епендорфка и към него се добавят 0.2 ml от разтвор, съдържащ 2% SDS, 0.08 M Tris – HCl (pH 8.0), 40% глицерол и 0.02% бромфенол блу. Пробите се разбъркват, инкубират се за 1 час при 65 °C, центрофугират се при 12000 g за 10 минути, след което могат да се използват за SDS–PAGE анализ.

С помощта на тази екстракционна процедура, която се осъществява на четири етапа, се постига максимално отстраняване на остатъчните глиадини, които съвпадат по молекулна маса с нискомолекулните глутенини и се оказват пречка за точното им идентифициране. Още по-ясна електрофореграма се получава след допълнително алкилиране на белтъчните молекули преди да бъдат обработени със SDS.

Основното предимство на SDS-PAGE електрофорезата е, че тя дава възможност за едновременно разделяне на високо- и нискомолекулните глутенини. Извършва се при постоянна сила на тока от 20 mA на гел при стайна температура за 18 – 20 часа. Оцветяването на геловите се осъществява с 1% разтвор на кумаси брилянт блу (СВВ) R 250 в оцетна киселина, метанол и вода в съотношение (1:5:4) за една нощ. Обезцветяването на гелните плаки се извършва с разтвор: оцетна киселина, метанол, дестилирана вода (1:2:7). Обезцветяващият разтвор се сменя многократно до изчистване на фона, след което гелните плаки се сканират. Електрофорезата се осъществява на 8% и 12% разделящ гел, на вертикален апарат по метода на Laemmli (1970).

#### *Методи за идентификация на запасните белтъци*

Високомолекулните глутенинови алели в *Glu-D1* локуса на диплоидните образци се идентифицират по William et al. (1993). Отчитането се прави спрямо алелите от *Glu-D1* локуса на стандартните сортове обикновена пшеница, които са подредени и номерирани в съответствие с номенклатурата на Payne and Lawrence (1983).

Нискомолекулните алели и субединици в *Glu-D3* локуса се отчитат по Gupta and Shepherd (1988, 1990). Използван е комбиниран метод за идентифициране на ниско-молекулните глутенини и глиадините в обикновената пшеница (Jackson et al., 1996), и каталог за идентифициране на глиадиновите белтъци в обикновената пшеница (Metakovsky et al., 1991).

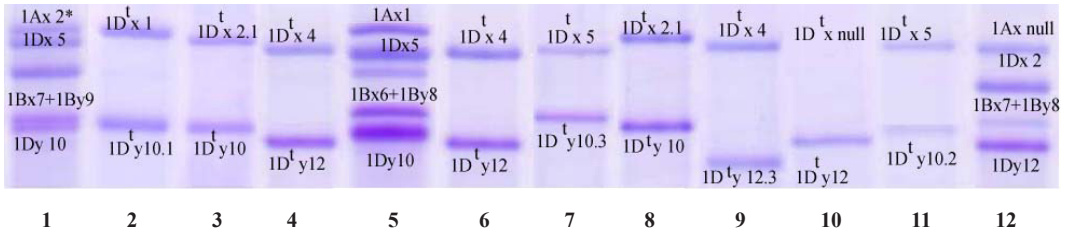
## Резултати

Ясно са определени пет х-тип ВМГ субединици, в това число и срещаната се с много ниска честота при дивия вид, субединица 'null' (Gianibelli et al., 2001; Yan et al., 2003<sup>b</sup>). Тези фракции притежават по-високо молекулно тегло и в зависимост от електрофоретичната си подвижност се подреждат в следната последователност: null, 1<sup>t</sup>, 2.1<sup>t</sup>, 4<sup>t</sup>, 5<sup>t</sup> (Фигура 1). Установените шест у-тип ВМГ субединици са с по-ниско молекулно тегло и по-висока електрофоретична подвижност, и са експресирани както следва: 10.3<sup>t</sup>, 10.2<sup>t</sup>, 10.1<sup>t</sup>, 10<sup>t</sup>, 12<sup>t</sup>, 12.3<sup>t</sup>.

Експресираните х- и у- субединици формират седем ВМГ комбинации, срещани се с различна честота в *Glu-D* локуса на анализирания образци (Фиг. 1). Анализът показва, че с най-висока честота (22.22%) се срещат фракционните двойки 2.1<sup>t</sup>+10<sup>t</sup> и 4<sup>t</sup>+12<sup>t</sup>, докато комбинациите 1<sup>t</sup>+10.1<sup>t</sup>, 5<sup>t</sup>+10.3<sup>t</sup>, 4<sup>t</sup>+12.3<sup>t</sup>, 5<sup>t</sup>+10.2<sup>t</sup> и null+12<sup>t</sup> са установени в единични образци от диплоидния вид.

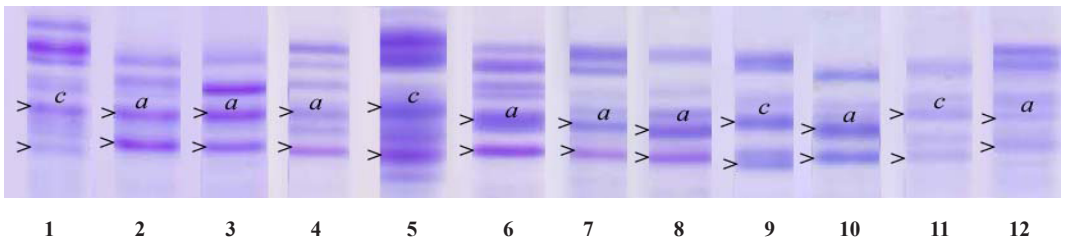
Чрез SDS-PAGE електрофорезата е идентифициран и нискомолекулния алелен състав на образците. Въпреки установените различия с хлебната пшеница, анализът показва, че шест от анализирания образци *Ae. tauschii*

(№ 144, 199, 204, 205, 212 и 219) притежават НМГ бендове на нивото на субединиците, кодирани от алел 'а', а в три образца (№ 213, 218 и 227), са експресирани фракции, съответстващи на алел 'с' от *Glu-D3* локуса на обикновената пшеница (Фигура 2).



Фигура 1. Фракционен състав на ВМГ на *Ae. tauschii* чрез 12% SDS-PAGE: 1: Безостая 1(стандарт), 2: 144, 3: 199, 4: 204, 5: Hope (стандарт), 6: 205, 7: 212, 8: 213, 9: 218, 10: 219, 11: 227, 12: К. пролетна (стандарт).

Figure 1. HMW glutenins composition of *Ae. tauschii* through 12% SDS-PAGE: Bezostaya 1(standard), 2: 144, 3: 199, 4: 204, 5: Hope (standard); 6: 205, 7: 212, 8: 213, 9: 218, 10: 219, 11: 227, 12: C. Spring (standard).

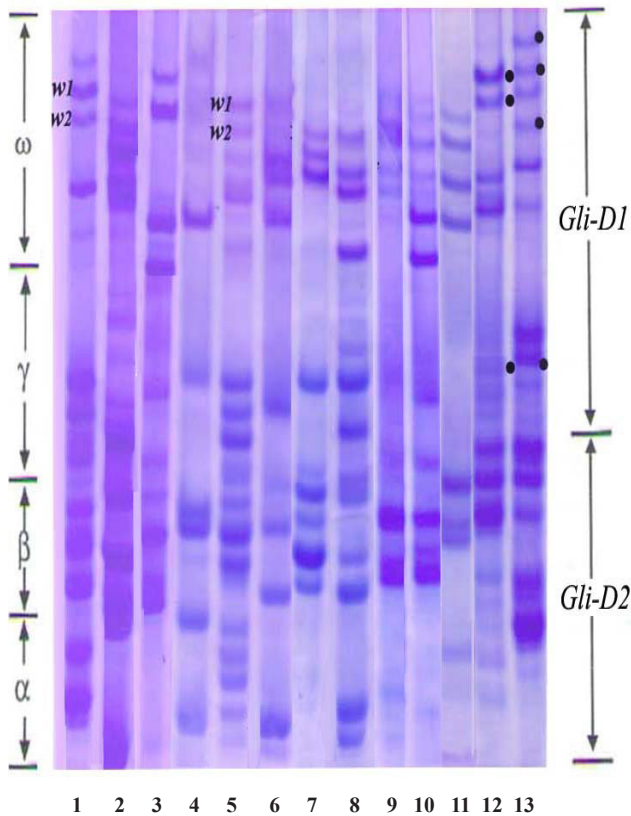


Фигура 2. Фракционен състав на НМГ в *Glu-D3* на *Ae. tauschii* чрез 12% SDS-PAGE: 1: Безостая 1(стандарт), 2: 144, 3: 199, 4: 204, 5: Hope (стандарт), 6: 205, 7: 212, 8: 213, 9: 218, 10: 219, 11: 227, 12: К. пролетна (стандарт).

Figure 2. LMW glutenins composition in *Glu-D3* of *Ae. tauschii* through 12% SDS-PAGE: Bezostaya 1(standard), 2: 144, 3: 199, 4: 204, 5: Hope (standard); 6: 205, 7: 212, 8: 213, 9: 218, 10: 219, 11: 227, 12: C. Spring (standard).

Идентифицирането на глиадиновите запасни ендоспермови белтъци е осъществено чрез А-PAGE електрофореза. Три от изследваните образци - № 144, 205, 218 притежават два бавноподвижни  $\omega$ -глиадинови бенда ( $\omega_1$  и  $\omega_2$ , Фиг. 3) в *Gli-D1* локуса, типични за глиадиновите спектри на всички хексаплоиди. Тези два компонента са един от двата основни протеинови типа в хлебната пшеница, известен като 'Chinese Spring' (CS)–тип на  $\omega$ -глиадините, който се кодира от *Gli-D1d* алела в стандарта Chinese Spring (субединиците, кодирани от алел *Gli-D1d* са означени с точки, Фиг. 3). От установените 12

глиадинови алела в *Gli-D1* локуса на хлебната пшеница, седем кодират тези два  $\omega$ -глиадинови бенда (Yan et al., 2003<sup>a</sup>). Глиадиновият спектър на образец №204 е подобен на другия основен глиадинов тип, известен като ‘Cheyenne’ (CNN) тип на  $\omega$ -глиадините, който се кодира от *Gli-D11* алела в обикновената пшеница (субединиците, кодирани от алел *Gli-D11* са означени с точки, Фиг. 3). Останалите образци не могат да бъдат отнесени към нито един от двата основни глиадинови типа. В глиадиновите спектри на два от тях (№199 и 219) са експресирани високомолекулни бендове в зоната на  $\omega$ -глиадините, които са с различна електрофоретична подвижност от тази на стандартите пшеница, докато при №212, 213 и 227 липсват редица бавноподвижни  $\omega$ -глиадини, типични за белтъчния състав на *T. aestivum* (Фиг. 3).



Фигура 3. А-PAGE електрофореза на глиадини: 1: Безостая 1 (стандарт), 2: 144, 3: 199, 4: 204, 5: Норе (стандарт), 6: 205, 7: 212, 8: 213, 9: 218, 10: 219, 11: 227, 12: К. пролетна (стандарт), 13: Cheyenne (стандарт).

Figure 3. A-PAGE electrophoresis of gliadins: 1: Bezostaya 1 (standard), 2: 144, 3: 199, 4: 204, 5: Hope (standard), 6: 205, 7: 212; 8: 213, 9: 218, 10: 219, 11: 227, 12: Chinese Spring (standard), 13: Cheyenne (standard).

*Gli-D2* блоковете обхващат глиадинови компоненти, намиращи се в  $\beta$ - и  $\alpha$ - зоните. В спектрите на деветте образца са идентифицирани различен брой интензивно експресирани  $\beta$ -глиадинови компоненти. За разлика от тях установените  $\alpha$ - глиадинови фракции са много по-малко на брой. Те са по-добре експресирани в профилите на №144, 204, 205, 213 и 218, докато при останалите образци са установени като минорни бендове, или напълно липсват (Фигура 3). Въпреки съществените различия между глиадиновите спектри на дивия вид и хлебната пшеница, в изследваните образци от *Aegilops tauschii* са идентифицирани редица глиадинови субединици - една  $\omega$ -, две  $\gamma$ - и две  $\alpha$ -, които са характерни както за диплоидната, така и за хексаплоидната пшеница.

## Обсъждане

Чрез проведената SDS-PAGE електрофореза са идентифицирани високомолекулярния и нискомолекулярния алелен състав на анализирания образци от вида *Aegilops tauschii*. Установените ВМГ фракции 2.1', 10.3', 10.2', 10.1' и 12.3' се срещат само в *Glu-D1* локуса на диплоидния вид, което се потвърждава и от резултатите на други проучвания (Lagudah and Halloran, 1988; Gianibelli et al., 2001; Pflüger et al., 2001<sup>a</sup>; Yueming et al., 2003), докато х-тип субединиците null, 1', 4', 5' и у-тип субединиците 10' и 12' са характерни и за спектъра на обикновената пшеница. Редица изследвания обаче доказват, че въпреки сходството в електрофоретичната подвижност, някои ВМГ субединици от *Ae. tauschii* са кодирани от други гени, което причинява разлика в размера и заряда на протеините (Zang et al., 2009; Wang et al., 2012), а в някои от случаите и в аминокиселинната последователност на фракциите (Yan et al., 2008).

Нито една от установените седем ВМГ конфигурации (Фигура 1) не е типична за вида *T. aestivum*, което е предпоставка за бъдещи проучвания във връзка с приложението им в селекцията за подобряване на хлебопекарните качества на обикновената пшеница.

НМГ са необходим компонент на качеството, въпреки че ефектът им е много по-слабо изразен в сравнение с този на високомолекулярните глутенини (Todorov, 2006). В настоящото изследване са потвърдени резултатите от проучването на Pflüger et al. (2001<sup>b</sup>), като е отчетено значително вариране по отношение на броя и относителната електрофоретична подвижност на НМГ в *Glu-D3* ликуса на диплоидния вид в сравнение с *T. aestivum*.

Чрез А-PAGE електрофореза е регистрирано високо ниво на генетичен полиморфизъм от една страна между анализирания образци *Aegilops tauschii* (William et al., 1993, Yan et al., 2003<sup>a</sup>, Li et al., 2010) и от друга, между



този диплоиден вид и обикновената пшеница, при която са установени 12 глиадинови алела в *Gli-D1* и 19 – в *Gli-D2* локуса (Metakovsky, 1991). В резултат на това създадената номенклатура за глиадиновите алели на хексаплоидната пшеница е приложима за класификацията на ограничен брой алели в дивия вид.

Все още съставът на нискомолекулните белтъци и на глиадините в диплоидния прародител са слабо проучени. Последните изследвания (Pflüger et al. 2001<sup>b</sup>; Yan et al., 2003<sup>a</sup>; Doneva et al., 2018) показват, че новоустановените нискомолекулни глутенинови и глиадинови алели в *Aegilops tauschii* оказват положителен ефект върху силата на глутена и подобно на ВМГ са обект на трансфер от дивия вид в хлебната пшеница.

## Изводи

1. Изследваните образци от *Aegilops tauschii* притежават високомолекулни белтъци (фракции 2.1<sup>t</sup>, 10.3<sup>t</sup>, 10.2<sup>t</sup>, 10.1<sup>t</sup> и 12.3<sup>t</sup>), които липсват в обикновената пшеница. Субединиците формират седем ВМГ конфигурации, които следва да се използват с предимство в селекцията за качество на глутена.

2. Дивият вид показва високо ниво на полиморфизъм по отношение на състава на нискомолекулните глутенини и глиадините. Някои форми като №199, №212, №213, №219 и №227 са перспективни за създаване на нови синтетични пшеници (*T. turgidum* x *Ae. tauschii*, 2n=42, ВВА<sup>u</sup>A<sup>u</sup>D<sup>t</sup>) и потенциалното им използване като изходен селекционен материал.

## Литература

### References

- Branlard, G., Dardevet, M., Saccomano, R., Lagoutte, F. & Gourdon, J. (2001). Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica*, 119, 59-67.
- Doneva, C. (2017). Characterization of synthetic wheats for seed proteins regarding their potential use as initial materials in breeding. PhD Thesis, SSA, Sofia, Bulgaria (Bg).
- Doneva, S., Daskalova, N. & Spetsov, P. (2018). Transfer of novel storage proteins from a synthetic hexaploid line into bread wheat. *Zemdirbyste-Agriculture*, 105(2), 113-122.
- Gianibelli, M.C., Gupta, R.B., Lafiandra, D., Margiotta, B. & MacRitchie, F. (2001). Polymorphism of high molecular weight glutenin subunits in *Triticum tauschii*: Characterisation by chromatography and electrophoretic methods. *Journal of Cereal Science*, 33, 39-52.
- Gupta, R.B. & Shepherd, K.W. (1988). Low-molecular glutenin subunits in wheat: their variation, inheritance and association with bread-making quality. In:

- Proceedings of 7th International Wheat Genetics Symposium, Cambridge, UK, 13-19 July, 1988, 943-949.
- Gupta, R.B. & Shepherd K.W. (1990). Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theoretical and Applied Genetics*, 80, 65-74.
- Hsam, S.L.K., Kieffer, R. & Zeller, F.J. (2001). Significance of *Aegilops tauschii* glutenin genes on breadmaking properties of wheat. *Cereal Chemistry*, 78(5), 521-525.
- Jackson, E.A., Morel, M.H., Sontag-Strohm, T., Branlard, G., Metakovsky, E.V. & Redaelli R. (1996). Proposal for combining the classification system of alleles of *Gli-1* and *Gli-3* loci in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetics and Breeding*. 50, 321-336.
- Kalia, B. (2015). Mining the *Aegilops tauschii* gene pool: evaluation, introgression and molecular characterization of adult plant resistance to leaf rust and seedling resistance to tan spot in synthetic hexaploid wheat. Ph.D. thesis, Kansas State University, Manhattan, USA
- Khan, K., McDonald, E. & Banasik, O.J. (1983). Polyacrylamide gel electrophoresis of gliadin proteins for wheat variety. Identification-procedural modifications and observations. *Cereal Chemistry*, 60(2), 178-181.
- Laemmli, U.K. (1970). Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lagudah, E.S. & Halloran, G.M. (1988). Phylogenetic relationships of *Triticum tauschii* the D genome donor to hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 75, 592-598.
- Li, G., Zhang, T., Wie, P., Jia, J. & Yang, Z. (2010). Sequence analysis of  $\alpha$ -gliadin genes from *Aegilops tauschii* native to China. *Asian Journal of Agricultural Sciences*, 2(4), 128-135.
- Metakovsky, E.V. (1991). Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *Journal of Genetics and Breeding*, 45, 325-344.
- Mujeeb-Kazi, A. & Van Ginkel, M. (2004). Wild wheat relatives help boost genetic diversity. CIMMYT News, Mexico.
- Payne, P.I. & Lawrence, G.J. (1983). Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunit in hexaploid wheat. *Cereal Research Communications*, 11(1), 29-35.
- Pflüger, L.A., D'Ovidio, R.D., Margiotta, B. & Pena, R. (2001<sup>a</sup>). Characterisation of high- and low-molecular weight glutenin subunits associated to the D-genome of *Aegilops tauschii* in a collection of synthetic hexaploid wheats. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(4), 634-647.

- Pflüger, L.A., Martin, L.M. & Alvaez, J.B. (2001<sup>b</sup>). Variation in the HMW and LMW glutenin subunits from Spanish accessions of emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum* Schrank). *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 767-772.
- Rasheed, A., Mahmood, T., Gul-Kazi, A., Ghafoor, A. & Mujeeb-Kazi, A. (2012<sup>a</sup>). Allelic variation and composition of HMW-GS in advanced lines derived from D-genome synthetic hexaploid/bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 15(1), 1-7.
- Rasheed, A., Safdar, T., Gul-Kazi, A., Mahmood, T., Akram, Z. & Mujeeb-Kazi, A. (2012<sup>b</sup>). Characterization of HMW-GS and evaluation of their diversity in morphologically elite synthetic hexaploid wheats. *Breeding Science*, 62, 365-370.
- Singh, N. K., Shepher, K.W & Cornish, G.B. (1991). A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenins. *Journal of Cereal Science*, 14, 203-208.
- Todorov, I. (2006). Investigation of seed wheat proteins and their use as genetic markers in wheat breeding. PhD Thesis, NCAS, Sofia, Bulgaria (Bg).
- Wang, K., An, X.L., Pan, L.P., Dong, K., Gao, L.Y., Wang, S.L., Xie, Z.Z., Zhang, Z., Appels, R., Ma, W. & Yan, Y.M. (2012). Molecular characterization of HMW-GS *IDx3'* and *IDx4'* genes from *Aegilops tauschii* and their potential value for wheat quality improvement. *Hereditas*, 149, 41-49.
- William, M.D.H.M., Peña, R.J. & Mujeeb-Kazi, A. (1993). Seed protein and isozyme variations in *Triticum tauschii* (*Aegilops squarrosa*). *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 257-263.
- Yan, Z.H., Guo, Z.F., Liu, D.C., Dai, S.F., Wei, Y.M. & Zheng, Y.L. (2008). Characterization of HMW-GS genes *Dx5'* and *Dy12'* from *Aegilops tauschii* accession with subunit combination  $Dx5^t + Dy12^t$ . *Cereal Research Communications*, 36(3), 477-487.
- Yan, Y.M., Hsam, S.L.K., Yu, J.Z., Jiang, Y. & Zeller, F.J. (2003<sup>a</sup>). Genetic polymorphisms at *Gli-Dt* gliadin loci as revealed by acid polyacrylamide gel and capillary electrophoresis. *Plant Breeding*, 122, 120-124.
- Yan, Y., Hsam, S.L.K., Yu, J., Jiang, Y. & Zeller, F.J. (2003<sup>b</sup>). HMW and LMW glutenin alleles among putative tetraploid and hexaploid European spelt wheat (*Triticum spelta* L.) progenitors. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1321-1330.
- Yueming, Y., Hsam, S.L.K., Jianzhong, Y., Jiang, Y. & Zeller, F.J. (2003). Allelic variation of the HMW glutenin subunits in *Aegilops tauschii* accessions detected by sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE), acid polyacrylamide gel (A-PAGE) and capillary electrophoresis. *Euphytica*, 130, 377-385.

---

Zhang, Y., An, X., Li, X., Chen, S., Gao, L., Wang, K., Wang, S. & Yan, Y. (2009). Isolation and expression of a new high molecular weight glutenin subunit gene at the *Glu-d-1-2* locus from *Aegilops tauschii*. *Cereal Research Communications*, 37(3), 449-457.