

Effet de la résistance génétique à la cécidomyie sur la composition et la variabilité allélique des sous unités gluténines chez le blé dur

Siham Ouriniche^{1,2}, Mona Taghouti³, Abderraouf Hilali¹, Nasserlhaq Nsarellah², and Aziz Baidani¹

¹Laboratoire d'Agro-Alimentaire et Santé, Université Hassan 1er Faculté des Sciences et Techniques, Settat, Maroc

²Laboratoire d'Amélioration Génétique des plantes, Institut National de la Recherche Agronomique, Settat, Maroc

³Laboratoire de Technologie Agro-Alimentaire et Qualité, Institut National de la Recherche Agronomique, Rabat, Maroc

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Durum wheat is an important crop in North Africa and Morocco. Hessian fly is the most important insect pest of wheat in the dryland areas in Morocco. Breeding wheat for genetic resistance to pests is the most sustainable strategy. The objective of this study is to assess the genetic diversity of quality criteria in a recombinant population segregated for resistance to Hessian fly and to verify the effects of the presence of H.fly resistance genes on these criteria. Grains of 180 recombinant inbred lines derived from hybrid (Cando-cross-H25 / CI115 // CM829 / BZAIZ-AHF) were analyzed for composition of high molecular weight-glutenin subunits and low molecular weight-glutenin subunits (HMW-GS and LMW-GS). The reaction of these lines to Hessian fly being previously known, these results were compared between H. fly resistant and susceptible lines. Electrophoretic analysis revealed six different bands. The various combinations of these bands gave eight allelic forms encoded by Glu B1 locus. Two allelic classes were observed for low molecular weight-glutenin subunits, they are LMW-SG-1 and LWM-SG-2. The protein composition of this collection presents a great variability that will be useful to breeders by allowing choosing the useful alleles and broadening the genetic base. The characteristics studied were found similar between classes of H. fly resistant and susceptible lines.

KEYWORDS: Glutenin, SDS-PAGE, allelic variability, durum wheat, genetic resistance, Hessian fly.

RESUME: Le blé dur est une culture importante en Afrique du Nord et au Maroc. La cécidomyie est l'un des principaux ravageurs du blé dur dans la plupart des zones arides et semi-arides. La résistance génétique est en cours d'être étudiée et développée. L'objectif de cette étude est d'évaluer, la diversité génétique des critères de qualité dans une population recombinante ségréguée pour la résistance à la cécidomyie et de vérifier les effets de la présence de gènes de résistance à la cécidomyie sur ces mêmes critères. Les grains de 180 lignées recombinantes issues de l'hybride (Cando-cross-H25/CI115//CM829/BZAIZ-AHF) ont été analysés pour la composition en sous unités de gluténines de haut et de faible poids moléculaire (SG-HPM et SG-FPM). La réaction de ces lignées à la cécidomyie étant préalablement connue, ces résultats ont été comparés entre les lignées sensibles et résistantes à la cécidomyie. L'analyse électrophorétique a permis de dénombrer six bandes différentes. Les diverses combinaisons de ces bandes ont donné huit formes alléliques, du locus Glu B1. Deux classes alléliques ont été observées pour les sous unités gluténines de faible poids moléculaires, celles-ci sont SG-FPM-1 et SG-FPM-2. La composition protéique de cette collection présente une grande variabilité qui sera utile aux améliorateurs en permettant de choisir les allèles utiles et en élargissant la base génétique. Les caractéristiques étudiées se sont révélées similaires entre les classes de lignées résistantes et sensibles à la cécidomyie.

MOTS-CLEFS: Gluténines, SDS-PAGE, variabilité allélique, blé dur, résistance génétique, cécidomyie.

1 INTRODUCTION

Le blé dur est une culture importante au Maroc. La cécidomyie est l'un des principaux insectes ravageurs du blé dans les zones arides et semi-arides et la résistance génétique est l'approche indiquée pour le control. Les études génétiques sur la résistance génétique à cet insecte ne font que commencer. Dans le processus de l'amélioration génétique des performances agronomiques, l'attention doit être gardée pour la qualité technologique. L'amélioration de la qualité technologique et nutritionnelle du blé nécessite le développement de recherches dans les domaines de la sélection variétale [11]. Au Maroc, le blé dur est principalement consommé sous forme de semoule et de pâtes alimentaires. Il est aussi utilisé dans la fabrication du pain [3]. L'aptitude des semoules à fournir des pâtes de qualité dépend de leurs compositions en protéines [18]. Les gluténines représentent 40 à 50% des protéines de réserve du blé [15]. Elles sont présentes dans le grain mature sous forme d'agrégats de tailles variables qui sont extrêmement importants dans la définition des propriétés technologiques des blés [20].

L'élasticité des gluténines dépend de la nature des sous-unités entrant dans sa composition [9]. Elles sont séparées en deux sous-groupes : les sous unités gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM) dont le poids moléculaire est compris entre 30 et 60 kDa et celles de haut poids moléculaire SG-HPM dont le poids moléculaire varie entre 80 et 120 kDa [17], [20].

Le polymorphisme des gluténines est contrôlé par des gènes codant pour les SG-HPM, dans le cas du blé, ces gènes sont situés sur le bras long des chromosomes A1 et B1, qui sont liés aux loci Glu-A1 et Glu-B1. Chacun de ces loci code pour une sous-unité de type-x et de type-y. Les loci Glu-A3 et Glu-B3 sont situés sur le bras court des chromosomes 1 et sont les loci majeurs des SG-FPM [4], [16], [25].

L'observation du polymorphisme des sous unités des gluténines est utilisée comme complément dans l'identification variétale. Ces protéines constituent des marqueurs biochimiques, qui peuvent fournir des informations sur l'évolution de la diversité des blés au cours des cycles successifs de la création variétale.

Cette étude est menée dans le cadre du développement et de la valorisation des ressources phytogénétiques de blé dur par l'analyse du polymorphisme des marqueurs biochimiques (sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaire) et de l'étude de l'association génétique entre les gènes de résistance à la cécidomyie avec ces déterminants génétiques de la qualité du grain. L'objectif de cette étude est d'évaluer les critères de qualité du grain chez une collection de lignées recombinantes de blé dur ségrégant pour la résistance génétique à la cécidomyie.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL ET ESSAIS AU CHAMP

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué d'une collection de 180 lignées recombinantes de blé dur issues d'un croisement entre des variétés de blé dur (Cando-cross-H25/ CI115//CM829/ BZAIZ-AHF) possédant la résistance à la cécidomyie et des variétés adaptées aux conditions pédoclimatiques des zones arides et semi-arides. La population est issue de 4 parents (hybride double) et devrait donc comprendre plus de deux allèles par locus.

Cette population a été fournie par le centre international des recherches dans les zones arides (ICARDA) et par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA du Maroc), et est destinée aux études d'associations génétiques impliquant la résistance génétique à la cécidomyie avec plusieurs caractères du blé dur.

Ces lignées ont été précédemment soumises à une infestation par la mouche de Hesse et l'évaluation de la réponse a été faite pour grouper les lignées en résistantes et sensibles. Les deux groupes ont été soumis à une analyse des fréquences des sous unités gluténines de haut et de faible poids moléculaires.

2.2 ANALYSE BIOCHIMIQUE

2.2.1 EXTRACTION DES GLUTÉNINES

La méthode d'extraction utilisée est la technique de séparation des protéines, selon leur solubilité dans trois solutions de bases décrite par [24]. L'extraction s'est faite à partir de 20 mg de la mouture mélangée à 1 ml d'une solution d'extraction contenant 50% du 1-propanol (v.v). Puis, le mélange est homogénéisé intermédiairement toutes les dix minutes, et incubé à température ambiante durant 30 minutes, suivi d'une centrifugation à 10 000 rpm pendant 5 minutes, afin d'éliminer le surnageant par aspiration. Ce premier rinçage du culot est suivi par un deuxième rinçage par l'ajout de 0.5

ml de la solution 50% de 1-propanol dans le but de s'assurer de l'élimination complète des gliadines. A cette étape, le culot ne contient que des gluténines dont l'extraction consiste en une réduction suivie d'une alkylation. La réduction des gluténines a été faite par l'ajout de 0,1ml de la solution contenant 50% du 1-propanol, de 0.08M Tris HCl (pH=8.0) et 1% (p/v) de Dithiotreitol. Puis, le mélange est vortexé et incubé à température ambiante pendant 30 minutes, suivi d'une centrifugation à 10000 rpm durant 5 minutes. L'alkylation des protéines consiste à ajouter 0,1 ml de la solution de base contenant le 4-vinyl-pyridine (1,4% (v/v)). Puis, le mélange est ainsi incubé à 65°C pendant 15 minutes et centrifugé à 10000 rpm pendant 2 minutes. Un aliquote de 0,1ml de surnageant est transféré dans un autre tube contenant 0,1 ml d'une solution constituée de 2% SDS, 40% glycérol, 0.02% Bleu de Bromophénol et 0.08M de Tris HCl (pH=8.0). Finalement, le mélange est bien agité et incubé à une température de 65°C durant 15 minutes pour la formation du complexe SDS-gluténines réduites et alkyles. Les échantillons sont donc prêts pour une séparation des SG-HPM et des SG-FPM par SDS-PAGE.

2.2.2 LA SEPARATION DES PROTEINES PAR SDS-PAGE

La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par [10] modifiée par [24]. Le support d'électrophorèse est formé de deux gels, un gel de séparation (14%) constitué d'acrylamide, de N_N' Mèthylen_Bis-Acrylamide, de 1,5M Tris HCL (pH= 8,8) et de SDS 10%, La polymérisation de ces constituants est catalysée par Ammonium Persulfate 10% (APS) et le TEMED, qui sont ajoutés en derniers. Et un autre gel de concentration (4%) dont ses constituants sont ceux du gel de séparation avec une différence au niveau des Tris HCL qui a un pH de 6,8.

Une fois le dépôt des extraits effectué, le gel est soumis à une tension constante de 100 V pendant environ 18h. Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode et sont séparées selon leur encombrement moléculaire. La migration est arrêtée lorsque le colorant (Bleu de Bromophénol) quitte le gel.

2.2.3 FIXATION ET COLORATION

Après la sortie du front de migration (coloré en bleu), la migration est arrêtée. Les gels sont démoulés et récupérés dans des bacs en plastique puis recouverts avec une solution de coloration constituée d'un fixateur des protéines, le TCA (Trichloracétique acide) à 10% et d'un colorant, le bleu de Coomassie R 250. Les gels sont maintenus en agitation pendant 24 heures pour éviter le dépôt du colorant. Après, ils sont décolorés dans de l'eau et seront prêts à la lecture d'après la nomenclature établie par [12] adoptée pour les gluténines de haut poids moléculaire et pour les sous unités gluténines de faible poids moléculaire.

2.3 ANALYSE STATISTIQUE

Après la lecture des sous unités gluténines de haut et de faible poids moléculaire, Les fréquences alléliques ont été calculées à l'aide d'un logiciel statistique approprié SPSS et les fréquences entre les deux groupes ont été calculées par le test Ki carré impliquant les fréquences attendues des formes alléliques et des deux classes, résistante et sensible.

3 RÉSULTATS

Pour l'ensemble de 180 lignées recombinantes de blé dur ségrégant pour la résistance à la mouche de Hesse (RILs), 15 gels d'électrophorèse ont été effectués. Les variétés Erdent, Cham 1 et Fanfarron ont été utilisées comme témoins pour chacun des gels.

3.1 LA DIVERSITE ALLELIQUE DES SOUS UNITES DE GLUTENINES POUR LA TOTALITE DES GROUPES

L'analyse des diagrammes électrophorétiques nous a permis de distinguer six types de bandes de mobilités différentes (6, 8, 9, 16, 7 et 20), Fig.1. Ces bandes recouvrent les sous unités à haut poids moléculaire contrôlées par le chromosome B (Tableau 1).

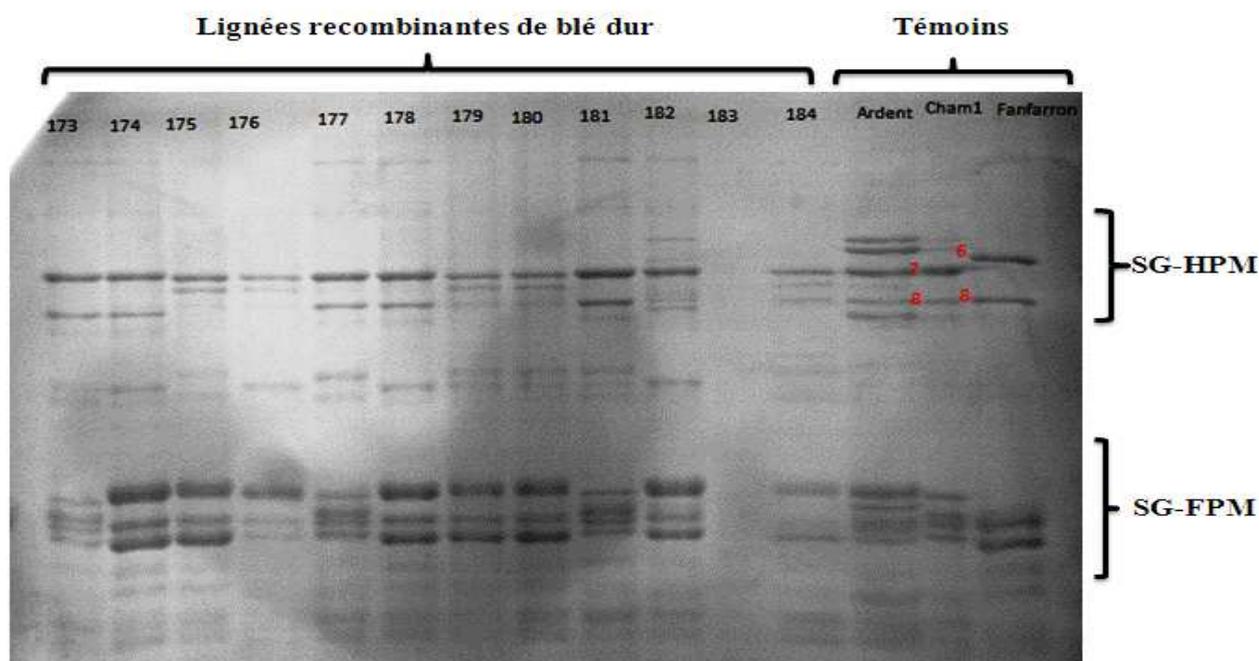


Fig.1. SDS-PAGE de quelques lignées recombinantes de blé dur

Les résultats obtenus montrent que les gluténines des RILs (Recombinant Inbred Lines) de blé dur présentent un grand polymorphisme.

Au niveau du locus Glu B1, huit formes alléliques différentes ont été observées pour les sous unités de haut poids moléculaires : (6+8), (6+8,9), (6+9), (7+8), (7+8,9), (7+8,16), (7+8,20) et (7+9) décrites précédemment par [12] , la forme allélique « Nulle » a caractérisé le locus Glu A1. Deux classes alléliques ont été observées pour les sous unités gluténines à faible poids moléculaire : FPM-1 et FPM-2.

Les fréquences des diagrammes des sous unités de gluténines de haut et de faible poids moléculaires pour l'ensemble des trois groupes sont présentées dans le tableau 1.

L'allèle le plus fréquent au niveau du Glu B1 est l'allèle (7+8) avec un pourcentage de 62,2 % suivi par l'allèle (7+9) avec 14,4%, puis viennent les deux allèles (7+8,9) et l'allèle (6+8) avec des fréquences respectives de 8,9 et 8,3 %. Tandis que les allèles (7+8,20), (6+8,9), (6+9) et (7+8,16) sont les moins exprimés dans notre collection avec des fréquences respectives de 3,3% , 1,7% et 0,6% (Fig.2).

Les deux types des sous unités gluténines de faible poids moléculaire exprimés dans cette collection sont SG-FPM-1 et SG-FPM -2 avec des fréquences de 28,3% et de 71,7% respectivement (Fig.2).

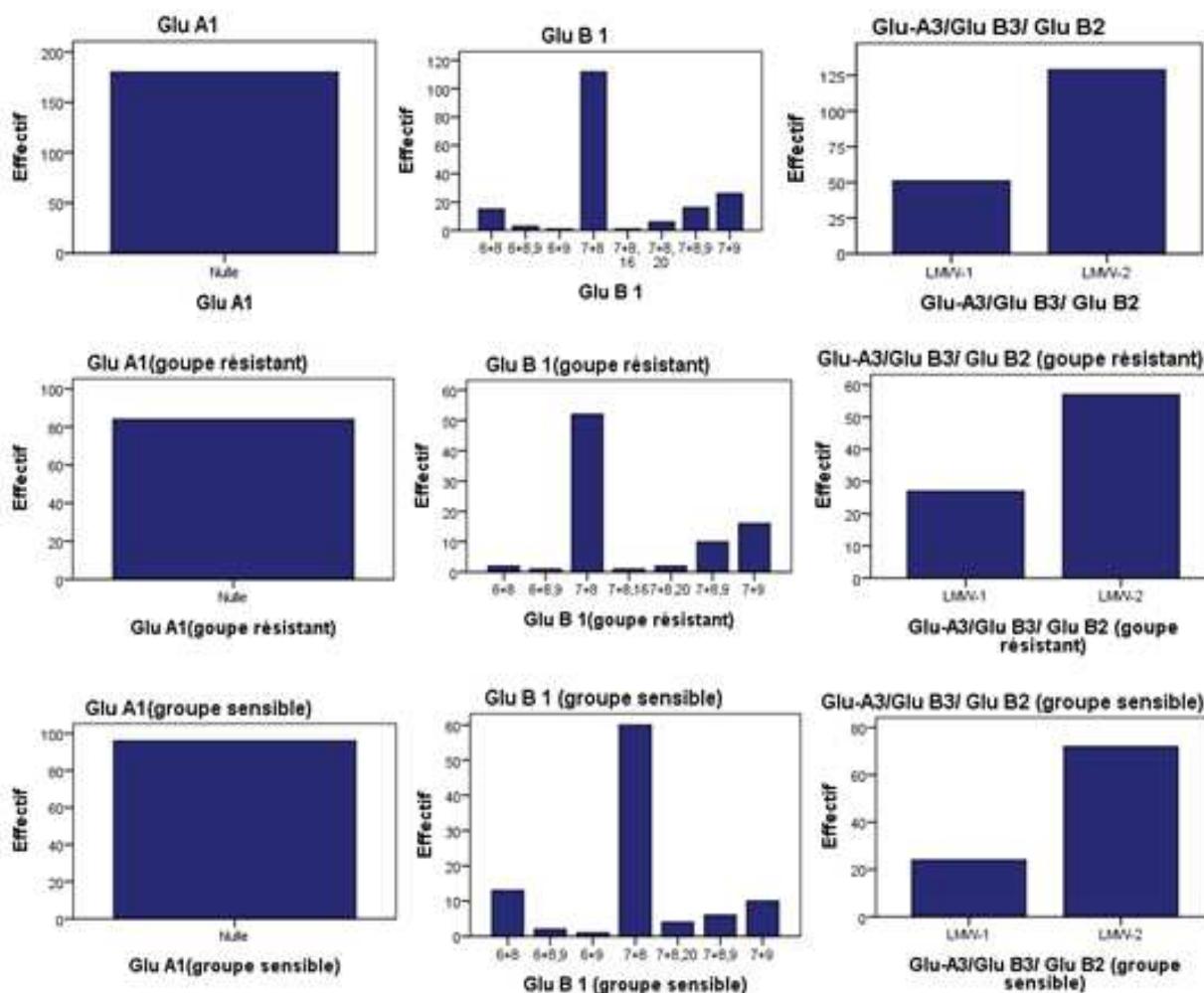


Fig. 2. Distribution des fréquences des sous unités de gluténines de haut et de faible poids moléculaires de l'ensemble des trois groupes

Tableau 1 : Les fréquences des diagrammes des sous unités de haut et de faible poids moléculaires des trois groupes 'résistant et sensible', 'résistant' et le groupe sensible

locus	allèle	Totalité des groupes		Groupe résistant		Groupe sensible	
		effectif	%	effectif	%	effectif	%
Glu A1	Nulle	180	100	84	100	96	100
Glu B1	6+8	15	8,3	2	2,4	13	13,5
	6+8,9	3	1,7	1	1,2	2	2,1
	6+9	1	0,6	-	-	1	1,0
	7+8	112	62,2	52	61,9	60	62,5
	7+8,16	1	0,6	1	1,2	-	-
	7+8,20	6	3,3	2	2,4	4	4,2
	7+8,9	16	8,9	10	11,9	6	6,3
	7+9	26	14,4	16	19,0	10	10,4
Glu-A3/Glu B3/ Glu B2	FPM-1	51	28,3	27	32,1	24	25,0
	FPM -2	129	71,7	57	67,9	72	75,0

3.2 LA DIVERSITE ALLELIQUE DES SOUS UNITES DE GLUTENINES POUR LE GROUPE RESISTANT

La variabilité allélique est aussi importante pour le groupe des lignées résistantes au niveau du chromosome B1 avec sept formes alléliques. La forme allélique la plus dominante est l'allèle (7+8) avec une fréquence de 61,9% suivie par l'allèle (7+9) avec un pourcentage de 19,0% puis vient l'allèle (7+8,9) avec une fréquence de 11,9% (Tableau 1). Les autres allèles sont présents mais avec de faibles fréquences (Fig.2).

En ce qui concerne les sous unités gluténines de faible poids moléculaires des deux types alléliques FPM -1 et FPM -2 ont été exprimés chez ce groupe de lignées avec des fréquences qui sont respectivement de l'ordre de 32,1% et de 67,9% (Fig. 2).

3.3 LA DIVERSITE ALLELIQUE DES SOUS UNITES DE GLUTENINES POUR LE GROUPE SENSIBLE

Pour le groupe des lignées sensibles, les résultats obtenus révèlent aussi que le locus Glu-B1 présente une importante variation allélique avec un total de sept allèles identifiés. L'allèle le plus fréquent est l'allèle (7+8) trouvé dans 62,5 % de la collection du groupe sensible, suivi par l'allèle (6+8) avec un pourcentage de 13,5 %, puis l'allèle (7+9) avec une fréquence de 10,4 % (tableau 1). Les allèles (7+8,9), (7+8,20), (6+8,9) et (6+9) sont exprimés dans ce groupe avec des fréquences respectives de 6,3%, 4,2%, 2,1% et 1%. Cependant, la forme allélique (7+8,16), absent chez le groupe sensible, apparait chez le groupe résistant avec une faible fréquence de 1,2% (Fig.2). Les formes alléliques de faible poids moléculaire FPM-1 et FPM-2 associées aux loci Glu-A3/Glu B3/ Glu B2 présentent respectivement des pourcentages de 25% et 75% (Fig.2).

3.4 L'ASSOCIATION DE LA COMPOSITION EN SOUS UNITES DE GLUTENINES AVEC LA RESISTANCE A LA CECIDOMYIE

Les données présentées dans la première partie concernent les deux groupes de lignées (résistantes et sensibles à la cécidomyie). En terme de génotype, ces lignées présentent le résultat de la ségrégation aléatoire de tous les allèles présent dans les génotypes issues du double croisement et sont destinées à des études d'association des caractères, des gènes et ou des gènes avec marqueurs moléculaires. Le tableau 1 présente les données par groupe de lignées et par caractéristique génétique liée à la composition en protéines (locus et forme allélique). Les données indiquent que pour le locus Glu A1, il n'y a pas de polymorphisme : on ne peut pas statuer sur le statut d'association avec la résistance à la cécidomyie. Pour le locus Glu B1, deux des huit formes alléliques observées sont phénotypiquement associés avec un locus de la résistance ou de la sensibilité à la cécidomyie. La forme allélique (7+8, 16) semble être associée avec la résistance génétique alors que la forme allélique 6+9 semble être associée avec la sensibilité. Cependant les fréquences absolues de ces deux formes ne sont que de 1/180 et ne peuvent être retenues pour tirer une conclusion quant à l'association significative entre les deux caractéristiques. Pour les loci Glu-A3 / Glu-B3 / Glu-B2, les résultats montrent une indépendance des formes alléliques et les loci de la résistance à la cécidomyie.

4 DISCUSSION

Les différentes formes alléliques de notre collection de RILs de blé dur étaient analysées au niveau des locus Glu A1, Glu B1 et Glu A3/GluB3/GluB2. Pour les sous unités gluténines de haut poids moléculaires, les résultats ont montré que toutes les lignées étudiées possèdent la sous unité nulle au niveau de locus Glu A1. Ce résultat concorde avec celui trouvé par [21] qui ont étudié le polymorphisme des SG-HPM d'une collection constituée de 144 espèces sauvages et cultivées, diploïdes et tétraploïdes, y compris 25 accessions de *Triticum diccocum* et 13 *Triticum durum*, et dans cette étude, toutes les lignées *Triticum durum* montrent l'absence complète des sous unités codées par le locus Glu-A1. Cependant, huit formes alléliques ont été détectées au niveau du locus Glu B1 qui a montré une variabilité allélique très importante des sous unités gluténines de haut poids moléculaire pour chacun des trois groupes : résistant, sensible et la totalité des groupes. En effet, six types de bandes protéiques différentes sont répertoriés, il s'agit des sous unités 6, 7, 8, 9, 16 et 20. Le polymorphisme des sous-unités de gluténines de haut poids moléculaire a aussi été détecté chez un ensemble de blés provenant d'une large collection mondiale [19]. La connaissance de ce polymorphisme peut être utile comme complément à l'identification variétale [2]. De plus, certaines études ont montré que les SG-HPM influent directement sur la qualité de la pâte en panification et sont considérées comme responsables pour 45-70% de la variation de la performance boulangère des blés européens [5], [18]. Aussi, d'autres auteurs ont souligné que l'héritage des gènes de gluténines et la présence de différentes formes alléliques associées aux chromosomes B1 ont des effets sur la qualité de la pâte [8], [13], [14], [18], [22].

Les formes alléliques de haut poids moléculaire (6+8), (7+8) et (7+9) étaient les plus communes et les plus fréquentes par rapport aux sous-unités gluténines 16 et 20 au niveau de chacun des trois groupes. De plus, [1], [23], [7] ont rapporté que

les génotypes de blé dur portant la sous unité gluténines de haut poids moléculaire 20 exposent généralement des propriétés de la pâte plus faibles et une qualité de cuisson inférieure à celles exprimant les sous unités gluténines de haut poids moléculaires 6+8 et 7+8 [1],[23],[7].

Concernant les sous unités gluténines de faible poids moléculaire GS-FPM codé au niveau des locus Glu-A3, B3 et Glu-Glu-B2, les résultats obtenus ont montré que 129 sur les 180 lignées analysées possèdent la sous unité FPM -2. Tandis que, 51 lignées ont exprimé la sous unités gluténines de faible poids moléculaire de type 1 (FPM-1). La présence des sous unités gluténines de faible poids moléculaire de type 2 (FPM -2) chez certaines lignées serait à l'origine d'une qualité supérieure comparée aux lignées possédant FPM-1 [6].

Pour l'analyse des associations génétiques entre les loci de la composition protéique et ceux de la résistance à la cécidomyie, les résultats indiquent que le locus Glu A1 ne présente pas de polymorphisme. Pour le locus Glu B1, deux des huit formes alléliques observées semblent être phénotypiquement associées avec un locus de la résistance ou de la sensibilité à la cécidomyie (7+8,16 et 6+9), mais la fréquence absolue de ces formes est réduite et ne peut offrir de conclusions sûres. Pour les loci Glu-A3 / Glu-B3 / Glu-B2, Les résultats montrent une indépendance des formes alléliques des loci de la résistance à la cécidomyie.

5 CONCLUSION

Cette étude a mis en évidence une bonne diversité alléliques des sous unités gluténines de haut et de faible poids moléculaires et des allèles impliquées dans une collection de 180 lignées recombinantes de blé dur.

L'analyse électrophorétique a permis de dénombrer six bandes différentes. Les diverses combinaisons de ces bandes ont donné huit formes alléliques du locus Glu B1. Sur les onze formes alléliques appartenant aux trois loci étudiés, aucune association avec le caractère de la résistance ou la sensibilité à la cécidomyie ne semble être démontrée.

REFERENCES

- [1] K. Ammar, W.E Kronstad, C.F Morris, "Breadmaking quality of selected durum wheat genotypes and its relationship with high molecular weight glutenin subunits allelic variation and gluten protein polymeric composition", *Cereal Chem*, 77: 230-236, 2000.
- [2] J.C Autran, "Recent data on the biochemical basis of durum wheat quality" 257-273, In Charalambous G. & Inglett G. : "The quality of foods and beverages", vol. 1. Acad. Press, pp: 443, 1981.
- [3] A. Belaid, N. Nsarellah, A. Laamari, M. Nachit, A. Amri, "Assessing the economic impact of durum wheat research in Morocco. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria", pp. 50, 2005.
- [4] J.A Beitz, K.W Shepherd, J.S Wall, "Cereal single-kernel analysis of glutenin: use in wheat genetics and breeding", *Cereal Chemistry*, 52:513-532,1975.
- [5] G. Branlard, D.A Le Blanc, "Les sous-unités glutenines de haut poids moléculaire des blés tendres et des blés durs cultivés en France". *Agronomie*, 5 (6) : 467-477, 1985.
- [6] R. D'Ovidio, "Single-seed PCR of LMW glutenin genes to distinguish between durum wheat cultivars with good and poor technological properties", *Plant Molecular Biology*, 22: 1173-1176, 1993.
- [7] P.R Shewry, S.M Gilbert, A.W.J Savage, A.S Tatham, Y.F Wan, P.S Belton, N. Wellner, R. D'Ovidio, F. Békés, N.G Halford, "Sequence and properties of HMW subunit 1Bx20 from pasta wheat (*Triticum durum*) which is associated with poor end use properties", *Theor. Appl. Genet.*, 106:744-750, 2003.
- [8] L.R Joppa, L. Khan, N.D Williams, "Chromosomal location of genes for gliadin polypeptides in durum wheat *Triticum turgidum*", *Theor. Appl. Genet.*, 64:289-293, 1983.
- [9] B.S Khatkar, R.J Fido, A.S Tatham, J.D Schofield, "Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality", *J Cereal Sci.*, 35:299-306, 2002.
- [10] U.K Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- [11] V.B.T Lammerts, P.C Struik, E. Jacobsen, "Ecological concepts in organic farming and their consequences for an organic crop ideotype". *Neth. J. Agric. Sc.*, 50: 1-26, 2002.
- [12] P.I Payne, G.J Lawrence, "Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high-molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat", *Cer. Res. Commun.*, 11: 29-35, 1983.
- [13] M.C Martinez, M. Ruitz, G.M Carrillo, "New B low Mr glutenin subunit alleles at the Glu-A3, Glu-B3 and Glu-B2 loci and their relationship with gluten strength in durum wheat", *Journal of Cereal science*, 40 :101-107, 2004.

- [14] M.T Nieto-Taladriz, M. Ruitz, M.C Martinez, J.F Vazquez, J.M Carrillo, "Variation and classification of B-low molecular weight glutenin subunit alleles in durum wheat", *Theoretical and Applied Genetics*, 95:1155-1160,1997.
- [15] T.B Osborne, "Proteins of the wheat kernel". Publ. No. 84.Carnegie Inst.: Washington DC, 1907 .
- [16] P.I Payne, L .M Holt, E.A Jackson, C.N Law, A.B Damania "Wheat storageProteins : their genetics and their potential for manipulation by plantBreeding", *Phil. Trans. Roy. Soc.B,Bioloical sciences*, 304 : 1120,1984.
- [17] P.I Payne, K.G Corfield, "Subunit composition of wheatglutenin protein isolated by gel filtration in a dissociating medium",*Planta*, 145 :83-88, 1979.
- [18] P.I Payne, "Genetic of wheat storage proteins and the effect of allelic Variation on bread-making quality". *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38 : 141 -153, 1987.
- [19] P.L Payne, L.M Holt, C.W. Law, "Structural and geneti-cal studies on the high molecular weight subunits of wheat glutenin", *Theor. Appl. Genet.*, 63: 129-138 , 1982.
- [20] C.W Wrigley, "Giant proteins with flour power". *Nature* 381:738-739, 1996.
- [21] H.S Randhawa, H.S Dhaliwal, N.K Singh, "Diversity for HMW glutenin composition and the origin of polyploidy wheats" *Ceral Research Communications*, Vol. 25 N° 1, 77-84,1997.
- [22] M. Ruiz, J.M Carillo, "Linkage relationships between prolamin genes on chromosome 1 A and 1 B in durum wheat" *Theor. Appl. Genet.*, 87: 353-360, 1993.
- [23] H.D Sapirstein, P. David, K.R Preston, J.E Dexter, "Durum wheat breadmaking quality: effects of gluten strength, protein composition, semolina particle size and fermentation time". *J. Cereal Sci.*, 45: 150-161, 2007.
- [24] N.K Singh, K.W Shepherd, G.B Cornish, "A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin",*Journal of Cereal Science* 14: 203-208, 1991.
- [25] P.R Shewry, A.S Tatham, J. Forde, M. Kreis, B.J Miflin, "The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment". *Journal of Cereal Science*, 4 :97-106, 1986.