국내 밀 품종의 글리아딘 및 *Spa* 유전자 평가

김지은¹ · 윤영미^{1,2} · 조성우¹ · 강천식² · 이종열³ · 박철수^{1*}

¹전북대학교 농업생명과학대학 작물생명과학과, ²국립식량과학원, ³국립농업과학원

Evaluation of Gliadin and Storage Protein Activator (*Spa*) in Korean Wheat Cultivars

Ji-Eun Kim¹, Young-Mi Yoon^{1,2}, Seong Woo Cho¹, Chon-Sik Kang², Jong-Yeol Lee³, and Chul Soo Park^{1*}

¹Department of Crop Science and Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

²National Institute of Crop Science, RDA, Wanju, 55365, Korea

³National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju, 55365, Korea

Abstract : Genetic variations of γ - ω -gliadin and *Spa* (storage protein activator) in 40 Korean wheat cultivars were evaluated to provide genetic information for improving end-use quality in wheat breeding programs. Korean wheat cultivars were classified into 13 patterns at the *Gli-1* locus based on the allelic variation using A-PAGE (acidic-polyacrylamide gel electrophoresis). Seven, five, and six alleles were identified at *Gli-A1*, *Gli-B1*, and *Gli-D1* loci, respectively. Allele-specific PCR markers for γ -gliadin corresponded to specific allele at *Gli-1* loci on A-PAGE, which *Gli-A1f*, *Gli-A1h* and *Gli-A1l* alleles corresponded to GliA1.2, *Gli-B1h* and *Gli-B1f* alleles corresponded to GliB1.2 and *Gli-D1f*, *Gli-D1m* and *Gli-D1o* alleles corresponded to GliD1.1. DNA markers for γ -45 and γ -42 also corresponded to the γ -gliadin patterns around 40kDa on A-PAGE, except in Sukang, Ol and Joongmo2003. However, allelic specific PCR markers for ω 5-gliadin did not correspond to that of A-PAGE. Three alleles were identified at *Spa-A1* locus, whereas there was no variation at *Spa-B1* and *Spa-D1* loci.

Keywords : Wheat, Gliadin, Storage Protein Activator (*Spa*), A-PAGE, Allelic variation.

서 언

글리아딘(Gliadin)은 70% 알코올에 용해되는 약 30-75KDa 분자량의 밀 저장 단백질로 단백질 내 상호 결합에 관여하는 단량체로 반죽 인장성(Viscosity)에 주로 관여하며, 가공 제품 적성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Barak et al. 2015). 분자량에 따라 글리아딘은 a-, b-, γ -와 ω -글리아딘으로 구분되며, a와 γ -글리아딘은 메티오닌(Methionine)과 시스테인(Cysteine) 함량이 높아 황을 많이 함유하는 S-rich 그룹과 분자량이 크고 극성 아미노산을 많이 함유하면서 메티오닌이나 시스테인 함량은 적은 ω -글리아딘은 S-poor 그룹으로 분류된다(Tatham et al. 2014, Barak et al. 2015). 전체 글리아딘 중에서 a와 b-글리아딘의 비율은 28~33%이고, γ -글리아딘은 23~31%

이며, ω -글리아딘은 7~13%이다(Barak et al. 2015). 글리아딘은 1번과 6번 염색체 상의 *Gli-1*과 *Gli-2* 유전자 좌에서 조절되며, 대부분의 γ 와 ω -글리아딘은 *Gli-1* 유전자 좌에서 a와 b-글리아딘과 일부 γ -글리아딘은 *Gli-2* 유전자 좌에서 조절된다(Qi et al. 2006, Barak et al. 2015). γ 와 ω -글리아딘은 *Gli-1* 유전자 좌에서 발현되기 때문에 1번 염색체에서 발현되는 저분자량 글루테닌과 매우 밀접하게 연관 되어 있다(Qi et al. 2006, Barak et al. 2015).

글리아딘이 가공적성에 미치는 영향에 대해서는 현재까지도 논란이 되고 있다. 일반적으로 S-poor 그룹인 ω -글리아딘은 글루텐의 점탄성(Viscoelasticity)을 방해하지만, S-rich 그룹인 a와 γ -글리아딘은 짝을 이루지 못한 홀수의 시스테인이 글루테닌과 이황화결합(Disulfide bond)을 형성해서 반죽 점탄성을 향상시키고 빵 용적을 높이는 효과가 있다(Qi et al. 2006, Tatham et al. 2014, Barak et al. 2015). 특히 γ -45 글리아딘을 지닌 듀럼밀 품종은 γ -42 글리아딘을 지닌 품종에 비해 파스타 품질이

*Corresponding author (E-mail: pcs89@jbnu.ac.kr, Tel:+82-63-270-2533, Fax:+82-63-270-2640)

(Received on June 1, 2016 Accepted on August 9, 2016)

우수하기 때문에 듀럼밀 육종 프로그램에서 표지인자로 활용되고 있다(Barak et al. 2015). 글리아딘은 필수 아미노산인 라이신(Lysine) 함량이 매우 낮고, 밀을 포함한 맥류 섭취로 발생하는 셀리악병(Celiac disease)과 밀가루 및 가공제품 섭취로 발생하는 천식(Baker's Asthma)과 알레르기(WDEIA: Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis)를 유발하는 항원의 특이 염기서열을 지닌 것으로 알려져 있다(Battais et al. 2008, Tatham et al. 2014, Rasheed et al. 2014). 가공제품의 품질 개선 및 영양성 증진과 밀에서 유래하는 면역 반응을 위해 육종 프로그램에 활용 가능한 표지인자 개발이 필요하다. 하지만 글리아딘은 유전적으로 변이가 크고, 단순 염기 서열의 반복이 많아 유전적 다형성 및 구조 분석이 어렵기 때문에 글루테닌에 비하여 많은 연구가 이루어지지 못하였다(Battais et al. 2008, Rasheed et al. 2014, Tatham et al. 2014, Barak et al. 2015).

등숙 기간 동안에 밀 저장 단백질 합성 조절은 주로 전사인자(TFs: Transcription Factors)에 의해 이루어지며, 밀에는 3종류의 motif (GCN4-like motif, prolamin box와 AACA motif)가 전사인자 조절과 관련되어 있다(Shewry & Halford 2002, Dupont & Altenbach 2003). GCN4-like motif는 프로라민 유전자 발현을 조절하며, basic Leucine zipper (bZIP) 전사인자에 의해 인지된다(Albani et al. 1997). 밀에서 발견된 대표적인 bZIP 전사인자는 저장단백질 활성화자(*Spa*: storage protein activator)로 등숙과정에서 저장단백질 발현에 중요한 역할을 한다(Guillaumie et al. 2004). 1번 염색체에 위치하는 *Spa* 유전자는 비록 유전자간 염기 서열의 상동성이 매우 높지만, 발현량의 차이가 있고 반죽 특성 및 종실 정도와 상관성이 있기 때문에 호주 밀 육종 프로그램에서는 선발지표로 검토되고 있다(Ravel et al. 2009, Eagle et al. 2012). 반면 국내 밀 육종 프로그램의 경우, 가공 적성 향상을 위한 글루테닌 조성 검정이 육종 후기 세대에서 이루어지고 있으며, 국내 육성 품종의 글리아딘에 대한 유전적 조성 정보도 미흡하다. 또한, 밀 저장 단백질 발현에 관련 있는 *Spa* 유전자 역시 평가되지 못하고 있다. 본 연구에서는 A-PAGE (Acidic-polyacrylamide gel electrophoresis)와 PCR을 이용한 γ -와 ω -글리아딘 분석과 *Spa* 유전자 조성 평가를 통해 가공적성 개선 및 국내 재배 환경에서 저장 단백질 발현 관련 자료로 이용하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료

본 연구에서는 국립식량과학원 작물육종과 증식 포장에서 전작 조건으로 재배하여 2015년 수확된 금강밀 등 40 품종을 이용하였다. 글리아딘 분석을 위한 종실은 cyclone sample mill (Udy, Fort Collins, 미국)을 이용하여 분쇄하였으며, Genomic DNA 추출을 위해서 건전한 종자를 온실에 파종하여 3주 간 생육시켰다. 유식물체의 엽을 채취하여 액체질소로 급속냉동시킨 후 유발을 이용하여 미세분말로 분쇄한 뒤 -70°C 에 보관하였다. Genomic DNA는 잎 분말(100mg)로부터 식물용 genomic DNA 분리 시약(Solgent, 한국)을 이용하여 추출하였다.

A-PAGE를 이용한 글리아딘 분석

국내 밀 품종의 글리아딘 분석은 Metakovsky(1991)의 방법에 따라 분석하였으며, 표준품종으로 Chinese Spring을 분석에 이용하였다. 글리아딘 추출을 위하여 분쇄된 종실 40mg을 1.5ml 튜브에 옮긴 후 extraction buffer [7.0ml 100%EtOH, 0.8ml N,N-Dimethylformamide (99%) 1M, 2.2ml of tank buffer] 200 μL 을 넣고 2시간 동안 진탕하였다. Sonicator(Jeiotech US-05, 한국)를 이용하여 25°C 에서 20분 동안 sonication 후, 5분동안 13,000 $\times g$ 로 원심분리(Smart 15, Hanil Sci., 한국)하여 상등액을 분리하였다. 글리아딘을 포함한 상등액을 동일량의 sample buffer [30g of sucrose, 40ml of glycerol, 5g methylgreen Adjust to 100ml of D.W]와 혼합하여 5분동안 진탕한 후 5분간 13,000 $\times g$ 로 원심분리하였다. 상등액을 A-PAGE(Acidic-Polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용한 글리아딘 분석에 이용하였다. A-PAGE는 7.8% acrylamide에 0.2% Bisacrylamide를 첨가하였고, 젯산을 이용하여 pH를 3.1로 조정하였으며, tank buffer는 aluminum lactate를 이용하였다. 50mA/gel 조건으로 2시간 전기영동 한 후에 comassie blue R-250으로 18시간 염색하고, 10% trichloroacetic acid로 24시간 destaining 하여 글리아딘 분석에 이용하였다.

PCR을 이용한 글리아딘 및 *Spa* 유전자 분석

글리아딘 유전자 분석을 위한 ω 5-와 γ -글리아딘 및 *Spa* 유전자 분석은 각각 Matsuo et al. (2005), Zhang et al. (2003), Yildirim et al. (2013)과 Ravel et al. (2009) 방법에 따랐다. ω 5-와 γ -글리아딘 및 *Spa* 유전자 분석을 위한 primer는 각기 다른 염기서열의 forward와 reverse 한 쌍으로 이루어져 있다

(Table 1). PCR은 Veriti® Dx 96-Well Thermal Cycler(Applied Biosystem, 미국)을 사용하였다. 각각의 유전자 서열 특이적 분자표지 분석을 위한 PCR 조성은, genomic DNA 은 100ng이었으며, primer는 각각 0.5μmol/l를, MgCl₂와 dNTP 는 각각 2.0mmol/l을, *Taq* polymerase(Genetbio Prime DNA polymerase, 한국)는 1 unit을 사용하였으며, 총 반응액은 25μl 로 하였다. ω5-글리아딘 분석을 위한 PCR 반응은 95°C에서 3분간 변성반응을 거친 후, 증폭단계에서 94°C에서 1분, 65°C에서 1분, 68°C에서 1분을 35회 반복하여 진행한 후 최종 신장반응은 72°C에서 10분간 수행하였다. *Gli-A1.1/2*, *Gli-B1.1/2*와 *Gli-D1.1/2* 프라이머를 이용한 γ-글리아딘 분석을 위한 PCR 반응은 95°C에서 3분간 변성반응을 거친 후, 증폭단계에서 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 60초를 38회 반복하여 진행한 후 최종 신장반응은 72°C에서 10분간 수행하였다. *Spa*

유전자 분석을 위한 PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성반응을 거친 후, 증폭단계에서 94°C에서 1분, 60°C에서 1분 30초, 72°C에서 2분을 35회 반복하여 진행한 후 최종 신장반응은 72°C에서 10분간 수행하였다. GAG05/06 프라이머를 이용한 μ42와 μ45 글리아딘 분석을 위한 PCR 반응은 94°C에서 3분간 변성반응을 거친 후, 증폭단계에서 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 32회 반복하여 진행한 후 최종 신장반응은 72°C에서 5분간 수행하였다. *Spa* 유전자 분석을 위한 PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성반응을 거친 후, 증폭단계에서 94°C에서 1분, 60°C에서 1분 30초, 72°C에서 2분을 35회 반복하여 진행한 후 최종 신장반응은 72°C에서 10분간 수행하였다. PCR 산물은 EtBr(0.5μg/ml)이 포함된 2.0% agarose gel에서 100V로 2시간 동안 전기영동한 후 UV transilluminator에서 확인하였다.

Table 1. Oligonucleotides and PCR conditions used for genotyping ω5-gliadin, γ- gliadin and *Spa* genes.

Gene & marker name	Forward and reverse primers (5'→3')	Fragment size (bp)
ω5- gliadin	F: AAGTGAGCAATAGTAAACACAAATCAAAC R: CGTTACATTATGCTCCATTGACTAACAACGA	ω-5a (1,400bp) ω-5b (1,200bp)
γ- gliadin		
GAG0506	F: ACAATGGCCACAACAACAAC R: TGCCCTGGCCTGGGC	650bp/800bp
<i>GliA1.1</i>	F: CATAGCGTCGTGCATTCCAACG R: GCACATGTTTGGAAGGGATC	168
<i>GliA1.2</i>	F: CATAGCGTCGTGCATTCCAACA R: GCACATGTTTGGAAGGGATC	168
<i>GliB1.1</i>	F: TGATCTGGCCACAAAGGGA R: CATTGGCCACCAATTCCTGT	369
<i>GliB1.2</i>	F: TGATCTGGCCACAAAGGGC R: CATTGGCCACCAATTCCTGT	397
<i>GliD1.1</i>	F: AAGCGATTGCCAAGTGATGCG R: GTTTGCAACACCAATGACGTA	264
<i>GliD1.2</i>	F: AAGCGATTGCCAAGTGATGCG R: GCAAGAGTTTGCAACAGCG	270
<i>Spa</i>		
<i>Spa-A1</i>	F: AATAAAGAGAACATGGACGAAC R: TGCGATCCTCTCATGTTTATA	362/402
<i>Spa-B1</i>	F: ATGGAGCCCGTGTCTTCTG R: CACCTCTCATGGACGTCGTA	311
<i>Spa-D1</i>	F: GCTGAATTTGTATCTATCTCG R: GCGAGGAATGGTATGGA	208/229

결과 및 고찰

국내 밀 품종의 글리아딘 분석

국내 밀 40 품종을 A-PAGE를 이용하여 분석한 전기영동 결과와 이를 바탕으로 작성한 *Gli-1*의 모식도는 Fig. 1과 Table 2에서 보는 바와 같다. *Gli-A1*에서는 7개의 대립 유전자가 나타났다. *Gli-A1a*와 *Gli-A1b*를 지닌 품종이 각각 17개(42.5%)와 10개(25.0%)로 많았으며, 다음으로 *Gli-A1c*와 *Gli-A1d*가 각각 5개(12.5%)와 4개(10.0%)로 나타났고, 나머지 품종은 *Gli-A1f*, *Gli-A1h*, *Gli-A1i*을 지니는 것으로 나타났다. *Gli-B1*에서는 5개의 대립 유전자를 보였는데, *Gli-B1h*를 지닌 품종이 22개(55.0%)로 가장 빈도가 높았으며, 다음으로 *Gli-A1m*와 *Gli-A1d*가 각각 8개(20.0%)와 7개(17.5%)로 나타났고, *Gli-B1f*와 *Gli-B1b*는 각각 2(5.0%)개와 1개(2.5%) 품종에서 나타났다. *Gli-D1*에서는 6개의 대립 유전자가 비슷한 빈도로 나타났는데, *Gli-D1d*를 지닌 품종이 9개(22.5%)로 나타났고, *Gli-D1e*, *Gli-D1i*와 *Gli-D1m*은 각각 7개(17.5%) 품종으로 발생 빈도가 같았으며, 다음으로 *Gli-D1f*와 *Gli-D1o*가 각각 5개 (12.5%)와 4개(10.0%)로 나타났다. 국내 40개 밀 품종의 *Gli-1* 조성은 13개 패턴으로 구분되는데, *Gli-A1b*, *Gli-B1m*, *Gli-D1m*과 *Gli-A1a*, *Gli-B1d*, *Gli-D1d*와 *Gli-A1c*, *Gli-B1h*, *Gli-D1f*를 지닌 품종이 각각 7개(17.5%), 6개(15.0%)와 5개(12.5%)로 많았으며, 다음으로 *Gli-A1a*, *Gli-B1h*, *Gli-D1i*와 *Gli-A1i*, *Gli-B1h*, *Gli-D1e*를 지닌 품종이 4개씩(10.0%)으로 나타났다. *Gli-A1a*, *Gli-B1h*, *Gli-D1d*를 지닌 품종은 3개였으며, *Gli-A1a*, *Gli-B1f*, *Gli-D1i*와 *Gli-A1a*, *Gli-B1h*, *Gli-D1o*와 *Gli-A1b*, *Gli-B1h*, *Gli-D1i*를 지닌 품종은 각각 2개였으며, 수강, 조품과 조은은 다른 품종들과 구별되는 밴드 패턴을 나타내었다.

중국 148개 대표 품종을 분석한 결과 총 48개 글리아딘 패턴이 보고되었고, 스페인의 100개 품종을 분석한 결과 매우 다양한 103개의 글리아딘 변이가 보고되었으며, 스페인 재래종에서는 더욱 다양한 글리아딘 변이가 발견되어 새로운 25개의 대립유전자가 보고되었다 (Metakovsky et al. 2000, Ruiz et al. 2002, Wu et al. 2007). 외국 품종에 비하여 국내 밀 품종의 글리아딘 변이가 적은 것으로 나타나는데, 이러한 협소한 변이 폭은 국내 밀 품종의 글루테닌에서 나타나는 현상과 비슷한데, 이러한 결과는 국내 밀 육종 프로그램이 조숙과 다수성 위주의 선발이 이루어졌기 때문이다(Park et al. 2011). 글루테닌이 반죽 특성 및 제빵 적성에 미치는 영향과 마찬가지로 글리아딘 역시 가공적성에 미치는 영향이 다양하고 중요하다. 이탈리아 밀에서는 *Gli-B1b*,

Fig. 1. A-PAGE patterns (A) and diagram (B) of gliadin in Korean wheat cultivars. CS, Chinese spring; 1, Dahong; 2, Tapdong; 3, Olgeuru; 4, Keumkang; 5, Jinpoom; 6, Younbaek; 7, Shinmichall; 8, Shinmichal; 9, Chunggye; 10, Gobun; 11, Sukang; 12, Jopoom; 13, Jooun.

*Gli-B2c*와 *Gli-A2b*의 글루텐 강도가 높았으며(Metakovsky et al. 1997), *Gli-D1*에서 발견되는 ω -글리아딘이 없는 프랑스 밀 품종이 반죽 특성 및 제빵 적성이 좋은 것으로 나타났다(Branlard & Dardevet 1994). 노르웨이 품종에서는 저분자량 글루테닌 발현과 연관된 글리아딘 이 반죽에 미치는 영향을 평가하였는데, *Gli-A1o*는 *Glu-A3d*와 같이 발현되고 *Gli-Af*와 *Glu-A3f*나 *g*에 비해서 글루텐 반죽 강도가 강하며, *Gli-B1b*와 *Gli-B1h*는 각각 *Glu-B3b*와 *Glu-B3d*와 같이 발현하며 다른 조합에 비하여 반죽 강도가 우수하였고, *Gli-D1g*는 *Glu-D3a*와 같이 발현하고 *Gli-D1b*와 *Glu-D1a*에 비해 반죽 강도가 좋았다(Flaete & Uhlen 2003). 중국 품종에서는 1D에서 발견되는 특정 ω -글리아딘이 반죽 특성에 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Wang et al. 2008).

Table 2. Allelic compositions of gliadin using A-PAGE and γ -gliadin in 40 Korean wheat cultivars.

Cultivar	Gliadin allele [†]			γ -gliadin [‡]		
	<i>Gli-A1</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Gli-D1</i>	<i>Gli-A1.1/2</i>	<i>Gli-B1.1/2</i>	<i>Gli-D1.1/2</i>
Alchan	<i>b</i>	<i>h</i>	<i>o</i>	-/+	-/+	+/-
Anbaek	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	+/-	+/-	+/-
Baekchal	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	+/-	-/+	+/-
Baekjoong	<i>c</i>	<i>h</i>	<i>f</i>	+/-	-/+	+/-
Chunggye	<i>h</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	-/+	-/+	-/+
Dabun	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>d</i>	+/-	-/+	+/-
Dahong	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	+/-	+/-	+/-
Dajoong	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	+/-	+/-	+/-
Eunpa	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	-/+	-/+	+/-
Geuru	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	+/-	-/+	+/-
Gobun	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>o</i>	-/+	-/+	+/-
Goso	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>o</i>	-/+	-/+	+/-
Hanbaek	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	+/-	-/+	-/+
Hojoong	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	+/-	-/+	+/-
Jeokjoong	<i>c</i>	<i>h</i>	<i>f</i>	+/-	-/+	+/-
Jinpoom	<i>i</i>	<i>h</i>	<i>e</i>	-/+	-/+	-/+
Joa	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	+/-	+/-	+/-
Joeun	<i>l</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	-/+	-/+	+/-
Jojoong	<i>c</i>	<i>h</i>	<i>f</i>	+/-	-/+	+/-
Jokyung	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	+/-	-/+	+/-
Jonong	<i>a</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	+/-	-/+	+/-
Joongmo2003	<i>i</i>	<i>h</i>	<i>e</i>	+/-	-/+	+/-
Joongmo2004	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	+/-	-/+	+/-
Joongmo2008	<i>c</i>	<i>h</i>	<i>f</i>	-/+	-/+	+/-
Joongmo2012	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	+/-	+/-	+/-
Jopoom	<i>f</i>	<i>m</i>	<i>e</i>	-/+	+/-	+/-
Keumkang	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	+/-	-/+	+/-
Milsung	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>d</i>	+/-	-/+	+/-
Namhae	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	-/+	-/+	+/-
Ol	<i>i</i>	<i>h</i>	<i>e</i>	-/+	-/+	+/-
Olgeuru	<i>b</i>	<i>h</i>	<i>o</i>	-/+	-/+	+/-
Saeol	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	+/-	-/+	+/-
Shimichal	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>d</i>	+/-	-/+	+/-
Shinmichal1	<i>a</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	+/-	-/+	+/-
Suan	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	+/-	+/-	+/-
Sudun	<i>i</i>	<i>h</i>	<i>e</i>	-/+	-/+	-/+
Sukang	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>e</i>	-/+	+/-	+/-
Tapdong	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	-/+	-/+	+/-
Uri	<i>h</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	-/+	-/+	-/+
Younbaek	<i>c</i>	<i>h</i>	<i>f</i>	+/-	-/+	+/-

[†]Nomenclature according to Metakovsky (1991).[‡]According to Zhang et al.(2003). + presents PCR product and - indicates absence of PCR product.

그러므로 국내 밀 계통에서도 다양한 글리아딘 변이를 창출하여
야 하며, 국내 재배 환경에서 특정 글리아딘이 가공적성에 미치는

영향을 평가하여야 하고 이를 위해서는 국내 재배종에 대한
변이 평가와 시비조건이 글리아딘 특성에 미치는 영향 또한

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified Gli-A1.1/2 (A), Gli-B1.1/2 (B) and Gli-D1.1/2 (C) in Korean wheat cultivars. M, molecular size marker; 1, Jopoom; 2, Jojoong; 3, Sudun; 4, Joa; 5, Uri; 6, Saebol.

평가되어야 한다.

육배체 밀의 γ -글리아딘의 유전자 발현 부위의 염기서열 차이를 이용하여 유전자좌 특이적 PCR 프라이머를 이용한 국내 밀 품종을 분석한 결과(Table 2, Fig. 3.), GliA1.1에서 밴드가 뜨고 GliA1.2에서는 밴드가 뜨지 않는 품종은 24개였고, 이들 품종은 A-PAGE 분석 결과 *Gli-A1a*를 나타낸 품종이 12개였고, *Gli-A1b*를 나타낸 품종은 7개였으며, *Gli-A1c*가 4품종이었고, *Gli-A1i*를 나타낸 중모2003이 여기에 속했다. *Gli-A1a*, *Gli-A1b*와 *Gli-A1c*도 GliA1.2에서 밴드가 뜨는 16개 품종에서 나타났으며, A-PAGE 분석에서 *Gli-A1f*, *Gli-A1h*와 *Gli-A1l*을 지닌 품종은 GliA1.2에서만 밴드를 나타내었다. GliB1에서는 GliA1과 반대로 GliB1.1에서는 밴드를 보이는 품종이 8개로 적었으며, 대부분의 품종이 GliB1.2에서 밴드를 나타냈다. GliB1.1에서 밴드를 보이는 품종은 A-PAGE 분석에서 *Gli-B1m*을 나타낸 품종이 6개였고, *Gli-B1b*와 *Gli-B1d*가 각각 수강과 중모2012에서 나타났다. *Gli-B1h*를 지닌 22개 모든 품종은 GliB1.2에서 밴드를 나타내었으며, *Gli-B1f*를 지닌 2개 품종도 GliB1.2에서 밴드를 나타내었다. GliB1.1 밴드를 나타낸 *Gli-B1d*와 *Gli-B1m*을 2개와 8개 품종은 GliB1.2 밴드를 나타내었다. GliD1.1에서만 밴드가 뜨는 품종은 35개였으며, 5개 품종만 GliD1.2에서 밴드가 나타났다. A-PAGE에서 *Gli-D1f*, *Gli-D1m*과 *Gli-D1o*를 지닌 품종은 모두 GliD1.1에서만 밴드를 나타내었으며, 나머지는 GliD1.1과 GliD1.2에서 밴드를 나타내었다. Gli-A1.1, Gli-B1.1과 Gli-D1.1에서 모두 밴드를 나타내는 품종은 6개였으며, Gli-A1.2, Gli-B1.2와 Gli-D1.2에서 모두 밴드를 나타내는

품종은 4개였으며, Gli-A1.1, Gli-B1.2와 Gli-D1.1에서 밴드를 나타내는 품종이 17개로 가장 많았고, 한백밀은 Gli-A1.1, Gli-B1.2와 Gli-D1.2의 밴드 패턴을 나타내어 다른 품종과 구별되었다. *Gli-A1a*, *Gli-B1h*와 *Gli-D1o*를 지닌 2개 품종, 고분밀과 고소밀, 과 *Gli-A1b*, *Gli-B1h*와 *Gli-D1o*를 지닌 2개 품종, 알찬밀과 올그루밀, 은 Gli-A1.2, Gli-B1.2와 Gli-D1.1의 밴드 패턴에 속했으며, *Gli-A1h*, *Gli-B1h*와 *Gli-D1i*를 지닌 2개 품종, 청계밀과 우리밀, 은 Gli-A1.2, Gli-B1.2와 Gli-D1.2 패턴에 포함되었다.

본 실험에서 이용된 동일한 프라이머를 이용하여 호주 밀 품종을 분석한 결과 (Zhang et al. 2003), GliA1, GliB1과 GliD1은 저분자량 글루테닌(LMW-GS: low molecular weight-glutenin subunits) 유전자와 상관성이 높은 것으로 나타났다(Branlard et al. 2003). 호주 밀에서는 GliA1.1, GliB1.1과 GliD1.1는 *Glu-A3a*, *b*나 *c*, *Glu-B3b*, *c*, *d*나 *e* 그리고, *Glu-D3a*, *b*나 *e*와 상관성이 있고, GliA1.2, GliB1.2와 GliD1.2는 *Glu-A3d*나 *e*, *Glu-B3a*, *g*나 *h* 그리고, *Glu-D3c*와 상관성이 있었다. 저분자량 글루테닌을 포함한 글루테닌의 유전적 조성이 가공적성에 영향을 미치는 것은 이미 많은 연구를 통하여 밝혀졌고, 호주 품종에서는 저분자량 글루테닌 발현이 γ -글리아딘 패턴과 상관성이 있기 때문에 이러한 표지인자를 가공적성을 개선하기 위한 밀 육종 프로그램에 적용을 검토하고 있다. 글루테닌의 경우 육종 프로그램에서 이용할 수 있는 표지인자들이 많이 제시 되었지만, 글리아딘의 경우 현재까지는 대부분 육종 프로그램에서 A-PAGE를 이용해서 평가하는 방법이 많이 사용되고 있다. 최근 들어 육종에

Table 3. Allelic compositions of ω 5-gliadin, γ -gliadin and *Spa* in 40 Korean wheat cultivars.

Cultivar	ω 5-gliadin [†]	γ -gliadin [‡]	<i>Spa</i> [§]		
			<i>A1</i>	<i>B1</i>	<i>D1</i>
Alchan	+ <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Anbaek	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Baekchal	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 3	311bp	208bp
Baekjoong	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Chunggye	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Dabun	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 3	311bp	208bp
Dahong	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 3	311bp	208bp
Dajoong	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Eunpa	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Geuru	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Gobun	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Goso	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 2	311bp	208bp
Hanbaek	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Hojoong	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Jeokjoong	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Jinpoom	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Joa	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 2	311bp	208bp
Joeun	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>h</i>	Type 1	311bp	208bp
Jojoong	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Jokyung	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Jonong	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Joongmo2003	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>h</i>	Type 1	311bp	208bp
Joongmo2004	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Joongmo2008	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Joongmo2012	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 3	311bp	208bp
Jopoom	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 2	311bp	208bp
Keumkang	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Milsung	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 3	311bp	208bp
Namhae	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Ol	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>h</i>	Type 1	311bp	208bp
Olgeuru	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 2	311bp	208bp
Saeol	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 3	311bp	208bp
Shimichal	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 3	311bp	208bp
Shinmichal1	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Suan	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp
Sudun	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Sukang	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 3	311bp	208bp
Tapdong	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Uri	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>b</i>	Type 1	311bp	208bp
Younbaek	<i>a</i> + <i>b</i>	<i>a</i>	Type 1	311bp	208bp

[†]Nomenclature according to Mastuo et al. (2005).[‡]Type *a* and *b* indicate γ -45 and γ -42, respectively, in the same nomenclature according to Yildirm et al.(2013). Type *h* contains both *a* and *b* type of γ -gliadin.[§]Nomenclature according to Ravel et al. (2009). Type 1 in *Spa-A1* indicates 362bp which is same to haplotype 1 of *Spa-A1* according to Ravel et al. (2009). Type II and III indicate one or two additional PCR products above 362bp.

활용 가능한 DNA 표지인자 개발에 많은 관심을 가지고 있지만, EST(Expressed sequence tags) 분석을 통하여 Chinese spring에

서 11개의 γ -글리아딘 유전자가 보고되었지만 (Anderson et al. 2009), 아직까지 선발에 이용 가능한 DNA 표지인자는 없는 실정

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified ω 5-gliadin (A) and γ -gliadin (B), and electrophoretic patterns of γ -gliadin (C) in Korean wheat cultivars. M, molecular size marker; 1, Ol; 2, Geuru; 3, Dahong; 4, Olgeuru; 5, Saeol; 6, Jinpoom; 7, Milsung; 8, Jopoom; 9, Shnmichal; 10, Goso; 11, Jojoong; 12, Baekchhal.

이다. 국내 품종에 대한 결과에서도 γ -글리아딘 표지인자 패턴이 A-PAGE로 분석한 특정 패턴에서는 구별이 가능하였기 때문에 반죽 특성 및 가공적성 평가와 연관된 평가를 수행해야 한다.

γ -글리아딘 중에 분자량이 45KDa, γ -45을 지닌 듀럼밀은 분자량이 42KDa, γ -42을 지닌 품종에 비해서 글루텐의 탄성이 강하고 파스타 품질이 우수한 것으로 알려져 있다(Gupta et al. 1994, D'Ovidio & Porceddu 1996, Yildirim et al. 2013). A-PAGE에서 나타나는 γ -45와 γ -42는 GAG0506프라이머를 이용하면 구분이 가능하다(Büren et al. 2000, Yildirim et al. 2013). 국내 품종에서도 그림 3-B에서 보듯이 구별이 가능하였다. 이러한 결과를 A-PAGE 결과와 비교하였을 때 올밀과 중모 2003을 제외하고는 일치하였다(Fig-3-C.). 터키의 듀럼밀 육종 집단에서도 GAG0506 프라이머를 이용한 결과는 A-PAGE에서 나타나는 γ -글리아딘 패턴과 일치하였고 이러한 결과를 바탕으로 육종 프로그램에서 이용을 하고 있다. 국내 밀 품종에서도 2개 품종을 제외하고 38개 품종에서는 일치하였기 때문에 육종 계통에 대한 평가를 통하여 패턴이 일치하는 지를 확인하고 반죽 특성 및 가공적성에 미치는 영향을 평가한다면 새로운 표지인자로 충분히 활용 가능할 것으로 생각한다. 올밀과 중모 2003에서 패턴이 불일치하는 이유에 대해서는 후속 연구가 필요할 것이다.

국내 밀 품종의 ω 5-글리아딘을 분석한 결과 품종간에 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 3, Fig. 2). 국내 밀 품종은 Matsuo et al. (2005) 논문에서 제시된 바와 2개의 밴드가 나타났는데, ω 5a-글리아딘에서는 1.4kb와 ω 5b-글리아딘에서는 1.2kb를 나타내었다. A-PAGE 결과에서도 국내 밀 품종은 ω 5-글리아딘 부분에서 모두 밴드를 보였다. ω -글리아딘은 분자량에 따라서

상대적으로 분자량이 큰 ω 5-글리아딘과 분자량이 적은 ω 1과 ω 2-글리아딘으로 구분되는데 ω 5-글리아딘 유전자는 1번 B 염색체에서 발현되고, ω 1과 ω 2-글리아딘은 A와 D 염색체에서 발현된다 (Qi et al. 2006). 프랑스 200개 밀 품종에서는 20개의 ω -글리아딘 패턴이 보고되었고, 중국 148개 대표 품종을 분석한 결과 29개의 ω -글리아딘 패턴이 보고되었다 (Wu et al. 2007). 표준품종으로 알려진 Chinese spring의 EST(Expressed sequence tags) 분석한 결과, 2개의 활성화된 ω -글리아딘과 2개의 pseudogene이 보고되었다(Anderson et al. 2013).

국내 밀 품종의 *Spa* 유전자 분석

국내 밀 40 품종에 대한 *Spa* 유전자를 분석한 결과(Fig. 2), 국내 밀 품종은 *Spa-A1*에서만 변이가 나타났고, *Spa-B1*과 *Spa-D1*에서는 국내 품종이 동일한 패턴을 나타내었다(Table 2). *Spa-A1*유전자는 promoter 부분의 indel로 362bp와 402bp로 구분되는데(Ravel et al. 2009), 올밀 등 28개 품종은 362bp를 나타내었지만, 올그루밀, 고소밀, 조품밀과 조아밀은 362bp와 450bp부근에 추가적인 밴드가 나타났으며, 다홍밀, 새올밀, 밀성밀, 신미찰밀, 다분밀, 수강밀, 백찰밀과 중모2012는 362bp외에 추가적으로 2개의 밴드가 나타났다. *Spa-B1* 유전자는 1번 exon의 SNP에 의해서 구분이 가능한데(Guillaumie et al. 2004) 국내 밀 품종은 모두 311bp를 나타내었다. *Spa-D1* 유전자는 *Spa-A1*유전자와 마찬가지로 promoter 부분의 indel로 208bp와 229bp로 구분되는데, 국내 밀 품종은 모두 208bp로 동일하였다.

Ravel et al. (2009)은 372개의 밀 핵심 집단을 이용하여 *Spa* 유전자에 대한 분석을 실시하였다. *Spa-1* 유전자는 4.7kb(*Spa-B1*)에서 6.8kb(*Spa-D1*) 크기이고, 유전자간 유사성

이 매우 높으며, 3번째 exon과 6번째 exon 사이에 bZIP domain 이 공통적으로 보존되어 있다(Salse et al. 2008). *Spa* 유전자는 다양한 SNP가 존재하며, *Spa* 유전자는 2개의 haplotype으로 구분이 가능하고, 이를 통하여 재배 지역이 서로 다른 유럽과 아시아 밀 품종에 대한 구분이 가능하였다. 발현양은 *Spa-B1*이 다른 것에 비해 10배이상 높은 것으로 나타났으며, *Spa-A1* 유전자는 질소시비에 의한 종실 단백질 축적에 있어 글리아딘 함량 증가와 상관이 있지만, *Spa* 유전자는 종실 단백질 함량이나 무게 증가와는 상관이 없는 것으로 나타났다. *Spa-A1* 유전자에서 362bp haplotype을 나타내는 품종은 402bp를 나타내는 haplotype에 비해서 탄성이 높고 점성이 낮았으며, *Spa-B1*와 *Spa-D1*는 종실 경도와 상관이 높은 것으로 나타났다. *Spa* 유전자의 이러한 특성은 종실 발달 단계에서 복잡하고 다양한 다면발현 일 가능성이 높을 것으로 생각된다. 호주에서는 *Spa-B1* 유전자 변이를 육종 프로그램에 이용하고자 검토하였는데, 글루텐닌 조성과의 연계한 *Spa-B1* 유전자 변이가 반죽 특성이나 제분율과는 상관이 없었지만, 종실경도와 상관 있는 Puroindoline 조성과의 연계하였을 때 제분율에 영향을 미치는 것으로 나타났(Eagles et al. 2012). 이러한 이유는 Puroindoline에도 *Spa* 유전자가 포함하는 비슷한 motif를 지니고 있기 때문으로 해석할 수 있으며, serine protease inhibitor의 일종인 Serpin이 결핍된 *Srp-5Bb*의 경우 제분율이 낮는데 이 또한 *Spa-B1* 유전자 조합에 따라 제분율이 높아지는 것으로 나타났다 (Evrard et al. 2007, Eagles et al. 2012). 국내 밀 품종의

경우 제분율 향상은 선택 개선을 포함한 가공제품의 품질 향상은 물론 재배 농가의 수익 향상과 상관이 있기 때문에 국내 환경에서 제분율 향상에 *Spa* 유전자가 미치는 영향에 대한 평가가 필요할 것으로 생각한다. 특히, 호주 밀 품종과 달리 국내 밀 품종은 *Spa-A1* 유전자에서만 변이성이 나타나기 때문에 호주 밀 품종에서 *Spa* 유전자가 제분율에 미치는 영향과는 다른 양상으로 나타날 수도 있다. 이러한 국내 밀 품종의 특이적인 *Spa-A1*의 변이와 다양한 글리아딘 변이는 국내 재배 조건에서 시비 조건에 따른 종자 저장 단백질 분획 변이와 관련된 특성 구명과 제분율 향상을 위해서 보다 면밀한 연구 검토가 필요할 것으로 생각한다.

적 요

국내 밀 품종의 가공적성 향상을 위하여 A-PAGE와 PCR을 이용한 γ -와 ω -글리아딘과 밀 저장 단백질 발현에 관련 있는 *Spa* 유전자를 평가하였다. 국내 40개 밀 품종들을 A-PAGE로 분석한 결과, *Gli-1* 조성에 따라 13개 패턴으로 구분되었으며, *Gli-A1*, *Gli-B1*과 *Gli-D1*에서는 각각 7개, 5개와 6개 대립유전자들이 확인되었다. A-PAGE 분석 결과와 γ -글리아딘에 특이적으로 반응하는 마커들로 검정한 결과를 비교 분석한 결과, A-PAGE 분석에서 *Gli-A1f*, *Gli-A1h*와 *Gli-A1l*을 지닌 품종은 *GliA1.2*마커에서만 반응하였고, *Gli-B1h*과 *Gli-B1f* 지닌 품종은 *GliB1.2*마커에서만 반응하였으며, *Gli-B1f*, *Gli-B1m*과 *Gli-B1o*를 지닌 품종은 모두 *GliD1.1*마커에서만 반응하였다. 나머지

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified *Spa-A1* (A), *Spa-B1* (B) and *Spa-D1* (C) in Korean wheat cultivars. M, molecular size marker; 1, Ol; 2, Geuru; 3, Dahong; 4, Olgeuru; 5, Saeol; 6, Jinpoom; 7, Milsung; 8, Jopoom; 9, Shnmichal; 10, Goso; 11, Jojoong; 12, Baekchhal.

대립유전자들은 GliD1.1과 GliD1.2마커에 반응하였다. γ -45와 γ -42은 올밀과 중모2003을 제외하고 A-PAGE의 γ -글리아딘 패턴이 일치하였다. 그러나 국내 밀 품종의 ω 5-글리아딘을 분석한 결과 품종간에 차이가 없는 것으로 확인되었다. *Spa* 유전자를 분석한 결과, 국내 밀 품종은 *Spa-A1*에서만 변이가 확인되었고, *Spa-B1*과 *Spa-D1*에서는 변이가 없는 것으로 확인되었다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린 21사업(PJ0123762 016)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Albani D, Hammond-Kosack MCU, Smith C, Conlan S, Colot V, Holdsworth M, Bevan M. 1997. The wheat transcriptional activator SPA: a seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamin genes. *Plant Cell* 9: 171-184.
- Anderson O, Huo N, Gu YQ. 2013. The gene space in wheat: the complete γ -gliadin gene family from the wheat cultivar Chinese spring. *Funct. Integr. Genomics* 13: 261-273.
- Anderson OD, Gu Y, Kong X, Lazo GR, Wu J. 2009. The wheat ω -gliadin genes: structure and EST analysis. *Funct. Integr. Genomics* 9: 397-410.
- Barak S, Mudgil D, Khatkar BS. 2015. Biochemical and functional properties of wheat gliadins: A review. *Crit. Rev. Food Nutr.* 55: 357-368.
- Battais F, Richard C, Jacquenet S, Denery-Papini S, Moneret-Vautrin DA. 2008. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 40: 67-76.
- Branlard G, Dardevet M, Amiour N, Igrejas G. 2003. Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadin in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genet. Res. Crop Evol.* 50: 669-679.
- Branlard G, Dardevet M. 1994. A null *Gli-D1* allele with a positive effect on bread wheat quality. *J. Cereal Sci.* 20: 235-244.
- Büren M, Lüthy J, Hübner P. 2000. A spelt-specific γ -gliadin gene: discovery and detection. *Theor. Appl. Genet.* 100: 271-279.
- idio R, Porceddu E. 1996. PCR-based assay for detecting 1B-genes for low molecular weight glutenin subunits related to gluten quality properties in durum wheat. *Plant Breed.* 115: 413-415.
- Dupont FM, Altenbach SB. 2003. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *J. Cereal Sci.* 38: 133-146.
- Eagle HA, Cane K, Appelbee M, Kuchel H, Eastwood RF, Martin PJ. 2012. The storage protein activator gene *Spa-B1* and grain quality traits in southern Australian wheat breeding programs. *Crop Pasture Sci.* 63: 311-318.
- Evrard A, Meynard D, Guiderdoni E, Joudrier P, Gautier M-F. 2007. The promoter of the wheat puroindoline-a gene (PinA) exhibits a more complex pattern of activity than that of the PinB gene and is induced by wounding and pathogen attack in rice. *Planta* 225: 287-300.
- Flaete NES, Uhlen AK. 2003. Association between allelic variation at the combined *Gli-1*, *Glu-3* loci and protein quality in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 37: 129-137.
- Guillaumie S, Charmet G, Linossier L, Torney V, Robert N, Ravel C. 2004. Co-location between a gene encoding for the bZip factor SPA and an eQTL for a high-molecular-weight glutenin subunit in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 47: 705-713.
- Gupta RB, MacRitchie F. 1994. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3*, and *Gli-1*, of common wheats. II. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties. *J Cereal Sci* 19: 19-29.
- Matsuo H, Kohno K, Morita E. 2005. Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS J.* 272: 4431-4438.
- Metakovsky EV, Annicchiarico P, Boggini G, Pognall NE. 1997. Relationship between gliadin allele and dough strength in Italian bread wheat cultivars. *J. Cereal Sci.* 25: 229-236.
- Metakovsky EV, Gomez M, Vazquez JF, Carrillo JM. 2000. High genetic diversity of Spanish common wheats as judged from gliadin alleles. *Plant Breed.* 119: 37-42.
- Metakovsky EV. 1991. Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet. Breed.* 34: 325-344.
- Park CS, Kang CS, Jeung JU, Woo SH. 2011. Influence of allelic variations in glutenin on the quality of pan bread and white salted noodles made from Korean wheat

- cultivars. *Euphytica* 180: 235-250.
21. Qi PF, Wei YM, Yue YW, Yan ZH, Zheng YL. 2006. Biochemical and molecular characterization of gliadins. *Mol. Biol.* 40: 713-723.
 22. Rasheed A, Xia X, Yan Y, Appels R, Mahmood T. 2014. Wheat seed storage proteins: Advances in molecular genetics, diversity and breeding applications. *J. Cereal Sci.* 60: 11-24.
 23. Ravel C, Martre P, Romeufl, Dardevet M, El-Malki R, Bordes J, Duchateau N, Brunel D, Balfourier F, Charmet G. 2009. Nucleotide polymorphism in the wheat transcriptional activator *Spa* influences its pattern of expression and has pleiotropic effects on grain protein composition, dough *Spa-B1* gene effects in wheat viscoelasticity, and grain hardness. *Plant Physiol.* 151: 2133-2144.
 24. Ruiz M, Rodriguez-Quijano M, Metakovsky EV, Vazquez JF, Carrillo JM. 2002. Polymorphism, variation and genetic identity of Spanish common wheat germplasm based on gliadin alleles. *Field Crops Res.* 79: 185-196.
 25. Salse J, Chagué V, Bolot S, Magdelenat G, Huneau C, Pont C, Belcram H, Couloux A, Gardais S, Evrard A, Segurens B, Charles M, Ravel C, Samain S, Charmet G, Boudet N, Chalhou B. 2008. New insights into the origin of the B genome of hexaploid wheat: Evolutionary relationships at the *SPA* genomic region with the S genome of the diploid relative *Aegilops speltoides*. *BMC Genomics* 9: 555.
 26. Shewry PR, Halford NG. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* 53: 947-958.
 27. Tatham AS, Shewry PR. 2014. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: revisited. *J. Cereal Sci.* 55: 79-99.
 28. Wang A, Gao L, Li X, Zhang Y, He Z, Xia X, Zhang Y, Yan Y. 2008. Characterization of two 1D-encoded ω -gliadin subunits closely related to dough strength and pan bread-making quality in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 47: 528-535.
 29. Wu F, Han ZX, Liu Y, Pan ZF, Deng GB, Yu MQ. 2007. Unique gliadin patterns in Chinese winter wheat cultivars. *Plant Breed.* 126: 498-502.
 30. Yildirim A, Sönmezoğlu ÖA, Sayaslan A, Koyuncu M, Gülec T, Kandemir N. 2013. Marker-assisted breeding of a durum wheat cultivar for γ -gliadin and LMW-glutenin proteins affecting pasta quality. *Turk. J. Agric. For.* 37: 527-533.
 31. Zhang W, Gianibell MC, Ma W, Rampling L, Gale KR. 2003. Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for γ -gliadin alleles in *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet.* 107: 130-138.