

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

INSTITUT NATIONAL

DE LA

RECHERCHE AGRONOMIQUE

Laboratoire de Recherches

sur la

Qualité des Blés

18 rue Nicolas Fortin, 75013 PARIS

tél 535.54.72

MANUEL D'INSTRUCTIONS SUR LA TECHNIQUE

D'IDENTIFICATION DES VARIETES DE BLE

PAR ELECTROPHORESE DES GLIADINES

par

J.C. AUTRAN et A. BOURDET

Collaboration technique :

G. GOBIN et C. CHAUSSEPIED

novembre 1975

P L A N

=====

Pages

1- PRINCIPE	2
2- RESUME DE LA TECHNIQUE	2
3- APPAREILLAGES ET PRODUITS UTILISES	3-4
4- PREPARATION DES SOLUTIONS D'USAGE COURANT	4
4a - Solution d'extraction des gliadines	4
4b - Solution mère de lactate d'aluminium	5
4c - Solution diluée de lactate d'aluminium (tampon d'électrophorèse)	5
4d - Solution de coloration des gliadines	5
4e - Solution de lavage des gels	5
4f - Solution de conservation des gels	6
5- EXTRACTION DES GLIADINES	6
5a - Extraction sur moutures de grains (cas d'une variété pure)	6
5b - Extraction grain par grain (cas d'un mélange de variétés)	6
6- PREPARATION DU GEL D'AMIDON	7
7- ELECTROPHORESE PROPREMENT DITE	8
7a - Précourant	8
7b - Dépôt des échantillons	9
7c - Migration des protéines	9-10
8- COLORATION DU GEL	10
9- DIFFERENTES FAUTES POSSIBLES DE MANIPULATION	11-12-13
10- PHOTOGRAPHIE	13
10a - Choix de l'équipement et des produits photo	13
10b - Prises de vues	13-14
10c - Développement et tirage	14
11- INTERPRETATION DES DIAGRAMMES	14
11a - Caractéristiques des diagrammes	14
11b - Principe de l'interprétation	15-16-17
11c - Interprétation dans le cas des variétés pures	17-18
11d - Interprétation dans le cas des mélanges variétaux	18-19-20
12- BIBLIOGRAPHIE	20-21
13- REFERENCES DES FOURNISSEURS DU MATERIEL	20

DOCUMENTS ANNEXES

- 1 Photos des diagrammes des 20 variétés françaises les plus cultivées
- 2 Photos des diagrammes de 3 variétés inconnues (pour exercice d'identification)
- 3 Schémas des diagrammes des 20 variétés
- 4 Clé de détermination des 20 variétés
- 5 Tiré-à-part d'une publication relative à l'identification des variétés de blé.

1- PRINCIPE

L'électrophorèse en gel d'amidon permet de fractionner les gliadines extraites au grain de blé en une vingtaine de composants. Le diagramme ainsi obtenu constitue une caractéristique variétale et apparaît totalement indépendant des conditions culturales ou des facteurs du milieu. D'où la possibilité d'identifier les variétés à partir de ces diagrammes gliadines.

On rappelle que les gliadines, caractérisées par leur solubilité dans les alcools dilués, représentent environ 40 % des protéines de l'albumen du grain de blé et qu'elles constituent, au sein du gluten, une fraction plus particulièrement responsable de l'extensibilité de la pâte. Dans les solutions acides utilisées pour l'électrophorèse, ces protéines sont toutes chargées positivement et, sous l'effet d'un champ électrique, elles se déplacent donc vers l'électrode négative. Cependant, chaque constituant gliadine possède une vitesse de migration qui lui est propre, de sorte qu'après un déplacement de quelques heures dans le champ électrique, une coloration permet de révéler un ensemble de bandes protéiques parallèles échelonnées entre le point de départ et le constituant le plus rapide. C'est ce diagramme de bandes gliadines qui présente une spécificité très élevée permettant la différenciation de la quasi totalité des variétés de blé.

Dans le cas d'un lot variétalement pur, la méthode est appliquée à une mouture de grains et l'interprétation visuelle du diagramme obtenu permet, grâce à une clé de détermination, d'identifier la variété du lot. Dans le cas d'un mélange, de variétés, l'identification est au contraire réalisée grain par grain sur un micro échantillon représentatif, ce qui permet de connaître, dans la limite d'un intervalle de confiance, les pourcentages des différentes variétés composantes du lot.

2- RESUME DE LA TECHNIQUE

L'identification variétale par électrophorèse des gliadines implique 3 phases successives :

- Extraction des gliadines à partir du grain de blé
- Electrophorèse proprement dite
- Interprétation des diagrammes

L'extraction des gliadines est réalisée soit à partir d'une mouture de grains (cas des variétés pures), soit grain par grain (cas des mélanges variétaux), par simple contact dans un solvant alcoolique. On prépare alors un gel d'amidon spécial qui constitue le support d'électrophorèse et on le purifie par passage de

courant. Les différents échantillons sont ensuite déposés dans le gel par insertion de rectangles de papier filtre imbibés de l'extrait gliadine, et, dès l'application du champ électrique, ces protéines migrent vers l'électrode négative. A la fin de l'électrophorèse, comme les bandes sont plus nettes à l'intérieur du gel qu'à sa surface, on découpe le gel dans son épaisseur et on révèle les protéines (initialement invisibles) en immergeant la moitié inférieure dans un colorant spécifique. Le gel est enfin lavé pour éliminer l'excès de colorant et le diagramme de bandes est prêt pour l'interprétation.

3- APPAREILLAGES ET PRODUITS UTILISES

3a - Appareillages

- Générateur de courant stabilisé : modèle ISCO 1420 E ROUCAIRE (0 - 400 volts ; 0 - 80 m A) ou tout autre modèle ayant des caractéristiques égales ou supérieures (ISCO 492, APELAB ST 3 D, GILSON 38520, GELMAN 38207, etc..).
- Appareils d'électrophorèse AMIDOPHOR réf. 130 000 (PLEUGER - OSI) comprenant : cuvette pour gel (315 x 120 x 8 mm), enceinte plexiglas avec bacs à électrode de platine, couvercle. On peut également se limiter aux cuvettes pour gel (réf. 100-601) en les adaptant à des réservoirs à tampon (APELAB CT 60 B) permettant de conduire 3 ou 4 gels simultanément.
- Plaques de verre, format 290 x 118 mm, épaisseur 2 mm, à adapter aux cuvettes AMIDOPHOR.
- Centrifugeur SORVALL S51 (MECA VIGOR) avec tubes polypropylène de 6 ml, ou tout autre modèle permettant de centrifuger des volumes de quelques ml.
- Micro tubes en verre Pyrex, de 1,5 ml, h. 25 mm, diam. 10 mm (à faire confectionner par un verrier) avec bouchons correspondants, ou bien, godets de 2 ml pour auto-analyseurs TECHNICON.
- Portoirs pour les tubes précédents.
- Homogénéiseur-diviseur d'échantillons à rifles (TRIPETTE et RENAUD)
- Broyeur à marteaux (type CULATTI DFH 48) ou moulin à café (type BRAUN)
- Agitateur à moteur électrique, type LABOMECA (PROLABO) avec hélice de diamètre 6 cm et vitesse 1 000 tours/mn, ou tout autre modèle équivalent, ou encore, mixeur électro-ménager.
- Niveau circulaire à bulle (BHV).
- Fil d'acier type "corde à piano" diam. 6/100 mm (WEBER).
- Contrôleur de tension METRIX modèle 462 (inutile, si on dispose du générateur APELAB ST 3 D).
- Fils électriques avec fiches mâles.
- Papier WHATMAN n° 3 ou 4 (PROLABO). A découper en rectangles de 12 x 5 mm ou 10 x 5 mm.
- Film plastifié type SCELOFRAIS ou SARAN WRAP.
- Bacs TUPPERWARE réf. 15 (330 x 220 mm) (PROMOPLAST).

- Appareillage de photographie (appareil à objectif macro, ou lentilles additionnelles, support réglable, lampes floods, et éventuellement matériel de développement et de tirage des photos).
- Petit matériel de laboratoire: pipettes, éprouvettes, béchers, pinces, balance, fioles, scalpels, bistouris, baguettes de verre, marteau...

3b - Produits chimiques

- Amidon hydrolysé pour électrophorèse CONNAUGHT (distribué par : TOUZART et MATIGNON, OSI, APELAB, SERLABO, MERCK...)
- Lactate d'aluminium PROLABO
- Acide lactique pur (d = 1,24)
- Urée purifiée
- Chloro-2-éthanol (ou glycol monochlorohydrine : GMC) : $\text{CH}_2 \text{Cl} - \text{CH}_2 \text{OH}$
- Ethanol pur à 95-96° GL
- Acide trichloracétique pur cristallisé
- Nigrosine à l'eau RAL
- Pyronine G
- Chlorure mercurique pur
- Glycérol pur
- Noir animal
- Eau désionisée

4- PREPARATION DES SOLUTIONS D'USAGE COURANT

Toutes ces solutions sont préparées avec de l'eau convenablement désionisée.

4a - Solution d'extraction des gliadines

Lorsque l'extraction est réalisée durant une nuit, cette solution est la suivante :

(Chloro-2-éthanol 250 ml
{
(Pyronine G..... 200 mg
{
(Eau q.s.p..... 1000 ml

Cette solution peut se conserver indéfiniment à la température du laboratoire. On notera que la pyronine est un colorant qui permet de visualiser la migration sous l'effet du champ électrique.

Lorsqu'on est contraint de réaliser une extraction de courte durée (2 h minimum) il y a lieu d'utiliser la même solution, additionnée de chlorure mercurique (250 mg/litre) afin d'assurer une inhibition des amylases. Toutefois, cette solution ne doit pas être conservée au delà d'une semaine en raison de l'instabilité du sel mercurique.

4b - Solution mère de lactate d'aluminium

Peser 54,55 g de lactate d'aluminium. Transvaser dans une fiole jaugée de 1 000 ml. Ajouter 164 ml d'acide lactique. Compléter à 1 000 ml avec de l'eau désionisée.

On obtient 1 litre de solution mère qui peut se conserver indéfiniment à la température du laboratoire et dont la composition est la suivante :

(0,185 M en lactate d'aluminium ($\mu^* = 1,11$)
(2,25 N en acide lactique
(pH 2,05

* μ = force ionique

4c - Solution diluée de lactate d'aluminium (= tampon d'électrophorèse)

On l'utilise à la fois pour préparer le gel et comme liquide des bacs à électrodes. On la prépare en diluant 250 fois, avec de l'eau désionisée, la solution mère et en y incorporant 0,5 M d'urée. Il est important, vu la très faible force ionique de ce tampon, que l'eau soit parfaitement désionisée.

Pour préparer, par exemple, 5 litres de tampon on prendra :

(solution mère : 20 ml
(urée 150 g
(eau désionisée q.s.p. 5000 ml

Ce tampon ne doit pas être conservé au delà de 1-2 semaines à la température du laboratoire. Sa composition est la suivante :

(0,00074 M en lactate d'aluminium ($\mu = 0,0045$)
(0,0089 N en acide lactique
(0,5 M en urée
(pH 3,15 - 3,20

4d - Solution de coloration des gliadines

Peser 500 mg de nigrosine à l'eau, transvaser dans un erlenmeyer de 1 000 ml. Dissoudre dans de l'eau. Ajouter 20 g d'acide trichloracétique et dissoudre. Compléter à 1 000 ml avec de l'eau et homogénéiser.

Ce bain de coloration doit être préparé aussitôt avant usage et ne doit servir qu'une fois. 500 ml sont nécessaires pour chaque plaque de gel.

4e - Solution de lavage des gels

C'est de l'éthanol à 40-45° que l'on préparera en mélangeant 1 000 ml d'éthanol à 95° GL et 1 600 ml d'eau. Après usage, ce bain peut être régénéré en y incorporant du noir animal et en filtrant. On vérifiera périodiquement le degré d'alcool et on rajustera si nécessaire avec de l'alcool pur.

4f - Solution de conservation des gels

A condition d'être décollés de leur plaque, les gels peuvent être conservés indéfiniment dans l'éthanol à 95° GL. On peut également introduire 20 % de glycérol dans cet éthanol en vue de préparer les gels à une dessiccation.

5- EXTRACTION DES GLIADINES

5a - Extraction sur mouture de grains (cas d'une variété pure)

Broyer l'échantillon au moyen d'un broyeur à marteaux ou d'un simple moulin à café (le type de mouture n'a aucune importance). Peser environ 600 mg de mouture dans un tube à centrifuger. Ajouter 1,5 ml de solution d'extraction : chloro-2-éthanol 25 % + pyronine (+Hg Cl₂ éventuellement) (voir § 4a). Mettre en suspension au moyen d'une baguette de verre. Laisser reposer 2 heures minimum, une nuit si possible, à la température ordinaire. Centrifuger 10 mn à 10000t/mn (la vitesse de centrifugation est en fait sans importance). Décantier les surnageants dans des microtubes pyrex de 1,5 ml.

L'extrait ainsi obtenu contient les gliadines du grain. Il est utilisé directement pour le dépôt de l'échantillon dans le gel.

N.B. Cet extrait n'est pas exhaustif mais il est parfaitement représentatif de la fraction gliadine. Pour le rendre exhaustif, il conviendrait d'opérer au moins 3 extractions successives : 1 ml (1 nuit) + 0,75 ml (5heures) + 0,5 ml (1 heure). On note également que des "protéines solubles" (albumines - globulines) sont extraites en même temps que les gliadines, mais on verra ultérieurement qu'elles ne perturbent pas le fractionnement de ces dernières en raison de leur mobilité plus élevée.

5b - Extraction grain par grain (cas d'un mélange de variétés)

Homogénéiser parfaitement l'échantillon au moyen du mélangeur de grains. Diviser l'échantillon jusqu'à la taille désirée pour le micro échantillon (50 grains environ).

Placer ces 50 grains, sans opérer aucun tri, dans des microtubes pyrex, après avoir écrasé grossièrement chacun d'eux avec un marteau. Ajouter la solution d'extraction en quantité variable selon la taille du grain : 100 - 130 microlitres (environ IV gouttes) pour les petits grains, 150 - 180 microlitres (environ V - VI gouttes) pour les gros grains. Boucher les tubes et laisser reposer 2 heures minimum, 1 nuit si possible. Homogénéiser la suspension au moyen d'une fine baguette de verre. Rajouter une

goutte de solvant si nécessaire. Cette suspension, non centrifugée, est utilisée directement pour le dépôt de l'échantillon dans le gel.

6- PREPARATION DU GEL D'AMIDON

La concentration ~~du gel~~ du gel en amidon est de 10 % et le volume de chaque cuvette ALIDOPHOR est de 350 ml. D'où les quantités d'amidon et de tampon lactate d'aluminium (§ 4c) à prévoir :

Pour préparer	Peser	Mesurer	Volume final
1 gel	35 g d'amidon	335 ml de tampon	350 ml
2 gels	70 g "	670 ml "	700 ml
3 gels	105 g "	1005 ml "	1050 ml
4 gels	140 g "	1340 ml "	1400 ml

On s'assure tout d'abord de la préparation des cuvettes.

- fermer la partie inférieure des ponts avec du scotch
- placer une plaque de verre (290 x 112 x 2 mm) sur la cuvette
- contrôler la parfaite horizontabilité de la plaque au moyen d'un niveau à bulle.

Pour préparer le gel, il suffit en principe de mettre en suspension l'amidon dans le tampon lactate et de chauffer sous agitation jusqu'au dépassement de la température de gélification de l'amidon. En fait, les problèmes de transfert de chaleur posés par le chauffage d'un empois rendent l'opération difficile, à moins de disposer d'un système d'agitation particulièrement vigoureux. On utilisera donc de préférence le système suivant :

Fractionner la quantité prévue de tampon lactate en 2 parties : 1/3 et 2/3. Porter à ébullition la fraction des 2/3 pendant que l'on met l'amidon en suspension homogène, à température ordinaire dans le 1/3 restant. Lorsque l'ébullition est atteinte, mélanger les deux fractions en agitant, ce qui provoque instantanément la formation de l'empois, vers 65-67° C.

Ainsi, si l'on prépare par exemple 2 gels, on portera à ébullition 450 ml de tampon tandis que l'on mettra en suspension les 70 g d'amidon dans les 220 ml restant de tampon. Il est important que la suspension soit bien homogène au moment où l'on réalise le mélange. Pour cela on agite la suspension pendant que l'on verse le tampon bouillant et on maintient l'agitation environ 10 secondes après formation de l'empois.

L'empois est alors coulé immédiatement dans les cuvettes AMIDOPHOR. Ces cuvettes seront remplies à ras bord de façon à ce que le gel ait une épaisseur de 6 mm. Lorsque plusieurs gels sont coulés à la suite, il est important qu'ils aient sensiblement la même épaisseur afin d'être traversés, lors de l'électrophorèse, par la même intensité de courant.

On laisse ensuite le gel refroidir (environ 60 mn) en le transportant de préférence dans un réfrigérateur. On observe que la surface du gel est irrégulière (bulles, ondulations, ...) mais cela est sans importance car la partie supérieure du gel est éliminée en fin d'expérience. Il est par ailleurs inutile, à ce stade, de recouvrir le gel.

Lorsque le gel est refroidi, on découvre les ponts en enlevant le scotch et on place la cuvette dans l'enceinte plexiglas (ou simplement sur la paire de bacs à électrodes). On remplit alors les 2 bacs de tampon lactate d'aluminium (§ 4c) de façon à assurer le contact avec les extrémités du gel. Le précourant peut alors commencer.

Il est important de savoir que les résultats obtenus sont d'autant meilleurs que le gel utilisé est de préparation récente. On a donc nettement intérêt à préparer le gel le matin même de l'expérience. Si cela n'était pas possible, on pourrait, à la rigueur, préparer le gel l'après-midi qui précède et le conserver, recouvert de film plastique, à la température du laboratoire. Dans ce cas, le précourant pourrait être opéré soit l'après-midi, après refroidissement du gel, soit pendant la nuit avec un interrupteur temporisé, soit le lendemain matin.

7- ELECTROPHORESE PROPREMENT DITE

7a - Précourant

Le passage du courant dans le gel avant le dépôt des échantillons a pour but de purifier le gel, de le débarrasser de certains ions nuisibles à la séparation des bandes protéiques. Beaucoup d'impuretés, ainsi poussées par le courant, se concentrent sous la forme d'une ligne de front que l'on découvrira sur les diagrammes après coloration.

Après avoir placé le gel dans l'enceinte, au contact des bacs à électrodes, on relie ces électrodes aux bornes de sortie du générateur (montage en parallèle si plusieurs gels par générateur).

Le générateur doit être placé en "voltage constant" et sur le calibre 80 mA. Au moyen du contrôleur METRIX, régler la tension de manière à avoir 8 volts/cm de longueur de gel, soit encore 250 volts entre les extrémités du gel. L'intensité du courant doit être de l'ordre de 20-

25 mA par gel (variable selon l'épaisseur exacte de chaque gel). Placer alors un couvercle sur l'enceinte ou bien recouvrir le gel de film plastique type SCELOFRAIS.

La durée de ce précurant doit être de 1 heure 30 à 1 h 45.

7b - Dépôt des échantillons

ATTENTION :
=====

AVANT TOUTE MANIPULATION DU GEL OU DE L'APPAREILLAGE, S'ASSURER QUE LE COURANT A ETE COUPE (VOYANT ROUGE ETEINT)

Lorsque le précurant est terminé, on introduit les extraits de gliadines dans le gel. Pour cela, à l'aide d'un bistouri et d'un guide en plexiglas (ou d'une règle graduée), on pratique des fentes verticales régulièrement espacées dans le gel à environ 4 cm du bord relié au pôle +. La longueur de chaque fente est de 10 à 12 mm selon le nombre de dépôts à effectuer (6 à 8 par gel).

Les gliadines sont alors déposées au moyen de rectangles de papier WHATMANN imbibés de l'extrait (voir § 5a et 5b) ; un papier n° 3 ou une double épaisseur de papier n° 4, pour chaque échantillon. Dans le cas d'un extrait centrifugé et décanté, le rectangle de papier sera immergé, dans le liquide puis égoutté. Dans le cas d'un extrait non centrifugé à partir d'un grain, on essayera d'absorber le maximum de liquide avec le papier.

Exemples :

Pour 6 échantillons par gel : 6 fentes de 12 mm et papier 12 x 5 mm
7 " " " : 7 " 12 mm " 12 x 5 mm
8 " " " 8 " 10 mm " 10 x 5 mm

7c - Migration des protéines

Aussitôt après le dépôt des échantillons, recouvrir le gel de film plastique et rétablir le courant. Vérifier le réglage à 8 volts/cm. Il est à noter qu'on ne doit pas utiliser le couvercle de verre des enceintes AMIDOPHOR lors de la migration, mais toujours le film plastique qui empêche beaucoup plus efficacement l'évaporation à la surface du gel.

Il est normal que le passage du courant provoque un léger échauffement du gel. Dans les conditions habituelles la température du gel ne doit pas excéder 30-35° C.

Laisser migrer les protéines jusqu'à ce que le colorant pyronine ait parcouru une distance de 17 cm environ. Les gliadines les plus rapides ont alors parcouru 15 cm. Durée moyenne, 4h 45.

Enlever le film plastique quelques minutes avant la fin de l'expérience afin qu'il se forme une légère croûte à la surface du gel, ce qui facilite le découpage.

Lorsque le courant est arrêté, découper le gel avec un scalpel (mouillé) tout autour de la plaque de verre qui le supporte. Soulever cette plaque, nettoyer la cuvette et y replacer la plaque de verre et son gel après avoir intercalé au dessous une plaque de 3 mm d'épaisseur.

Découper le gel dans son épaisseur au moyen du fil d'acier de 6/100 mm. Eliminer la partie supérieure (environ 4 mm d'épaisseur) en la soulevant par fragments, avec un scalpel. La partie inférieure (environ 2 mm d'épaisseur) qui reste collée sur la plaque de verre est alors prête pour la coloration.

8- COLORATION DU GEL

Préparer un bac type TUPPERWARE pour chaque gel à colorer. Noter les références du gel sur le bac. Verser dans chaque bac 500 ml de colorant (nigrosine 0,05 % - ATC 2 %) (§ 4d). Y placer avec précaution la plaque de gel. Laisser le gel ainsi immergé durant la nuit(ou le week-end, éventuellement).

Le lendemain, retirer la plaque de verre et égoutter le gel avec précaution. Eliminer le bain de coloration (qui ne doit servir qu'une fois). Verser de l'alcool dilué (40-45° GL) dans le bac. Replacer la plaque avec précaution. L'excès de colorant s'élimine progressivement et les bandes protéiques apparaissent. Le gel est alors prêt pour l'interprétation.

Si l'on désire photographier le gel rapidement, il convient de renouveler au moins 3 fois l'alcool dans la matinée, afin d'obtenir un contraste élevé.

Les gels peuvent être conservés indéfiniment dans cet alcool dilué et on observe qu'ils perdent peu à peu leur fragilité initiale. Il ne faut jamais utiliser de concentration en alcool supérieure à 45° GL (risque de contraction et de fissuration) tant que les gels restent collés à leur plaque de verre. On peut cependant après les avoir décollés, faire glisser les gels dans l'alcool à 95° GL dans lequel ils durcissent encore davantage.

On peut également faire sécher les gels à l'air, à condition qu'ils aient séjourné quelques jours dans de l'éthanol à 95° GL contenant 20 % de glycérol. Il suffit alors de les placer sur des papiers filtres en les retournant fréquemment. Leur dessiccation et leurs contractions s'effectuent alors sans perte d'élasticité et sans rupture.

9- DIFFERENTES FAUTES POSSIBLES DE MANIPULATION

On énumère ci-dessous les symptômes observés lors des principales fautes possibles de manipulation, en signalant les causes probables ainsi que les vérifications qui devront être effectuées avant de lancer de nouvelles expériences.

- Fuite lors du coulage du gel : s'assurer d'une meilleure adhérence du ruban scotch sur les ponts de la cuvette.
- Intensité du courant supérieure à la normale, le gel chauffe-; la migration est trop rapide : la force ionique du tampon, ou sa concentration en urée sont probablement trop élevées. Il y a erreur par excès dans la préparation du tampon ou dans sa dilution. Vérifier le pH. Repréparer la solution éventuellement. Vérifier également que l'eau est convenablement désionisée.
- Intensité du courant très faible ou nulle ; migration trop lente : mauvais branchement des fils électriques, ou oubli d'enlever le scotch des ponts, ou encore erreur (par défaut) dans la dilution du tampon (oubli de l'urée ou oubli du lactate). Vérifier le pH.
- Présence de grumeaux ou d'irrégularités dans le gel : agitation insuffisante lors de la formation de l'empois, ou température de gélification non suffisamment dépassée.
- Présence de bulles au coeur du gel : température de formation de l'empois insuffisamment élevée. La viscosité est alors trop forte et les bulles (qui doivent normalement remonter en surface, où elles ne gênent pas la séparation) demeurent au coeur du gel. Mieux s'assurer des proportions du mélange tampon bouillant/tampon froid et contrôler éventuellement la température.
- Gel anormalement fragile avec parfois effondrement des ponts : vérifier que la concentration en amidon a bien été de 10 %. S'assurer que le gel n'a pas trop chauffé notamment en été. Régler le voltage à une valeur inférieure, éventuellement.
- Migration en sens inverse : cuve mal polarisée.
- Certains diagrammes sont trop faiblement concentrés : extraction des gliadines insuffisante ou trop courte, ou mauvaise imbibition des papiers WHATMAN (fréquent dans le cas des extractions sur un seul grain), ou encore solution de nigrosine trop ancienne.
- Les bandes protéiques révélées sont floues : faire vérifier que le courant délivré par le générateur est correctement redressé. S'assurer que le temps d'électrophorèse a été bien respecté (il y a diffusion des bandes lors de migrations trop longues) et qu'il n'y a pas eu de panne de courant en cours de migration. Ou bien, le gel a été trop longtemps conservé avant utilisation. Autre cause possible, la coupe du gel a été réalisée trop haut, à la limite de la zone renfermant les bandes.

- Certains dépôts donnent des traînées : la concentration en gliadine du dépôt est trop élevée. Mieux égoutter les papiers, ou recommencer avec des concentrations inférieures (cas des blés durum et de certains blés hard). Autre cause, notamment dans le cas des extractions sur grains : on a introduit des fragments de grain lors de l'insertion du papier dans la fente. Ou bien les rectangles de papiers ont été souillés.
- Certains diagrammes sont déformés : présence de grumeaux, d'impuretés ou de régions hétérogènes dans le gel. Parfois, fissuration du gel avant la migration.
- Bandes non parallèles au dépôt, ou en forme d'arc : peut se produire si la solution d'extraction ou si le blé contiennent des impuretés, notamment des sels, ou encore si la solution d'extraction qui contient le Hg Cl₂ est trop ancienne. Par ailleurs, les bandes peuvent prendre des formes plus ou moins arquées dans le cas de gels conservés au delà de 24 heures.
- Débordement latéral des bandes, vers les diagrammes voisins : papier déplacé après avoir été inséré, ou fente trop longue, ou encore, migration latérale de la solution de dépôt par capillarité (fréquent si le gel a été conservé plus de 24 heures).
- Traînées à partir du dépôt avec dégradation du gel : attaque amylasique de l'amidon. Facile à éliminer par extraction prolongée une nuit ou par addition de chlorure mercurique (voir § 4a).
- Diagrammes perturbés par la présence d'une ligne de front : précourant trop court (ou précourant omis).
- Front des bandes rapides non parallèle à ligne de départ : champ électrique non homogène, dû en général à une épaisseur irrégulière du gel. Mieux vérifier l'horizontalité des plaques avant de couler. Ou encore, électrode de platine cassée.
- Front des bandes rapides fortement arqué : provoqué par une évaporation excessive à la surface du gel qui affecte surtout la région centrale. Eviter l'emploi du couvercle de verre de l'enceinte et utiliser toujours un film polyéthylène pour recouvrir le gel pendant la migration.
- Zones rapides du diagramme trop tassées par rapport aux zones lentes : temps de migration non respecté ou précourant trop court ; les bandes rapides sont comprimées à l'approche de la ligne de front.
- Présence de "blancs" en certains points du gel : provoquée par de petits débris de gel qui se trouvaient dans le bain de coloration et qui ont empêché la nigrosine de pénétrer.
- Régions du diagramme ayant mal pris le colorant ou colorant mal fixé sur certaines bandes : défaut provoqué par une fixation insuffisante des protéines avant action du colorant et qui se produit lorsqu'on omet d'introduire de l'acide trichloracétique dans la solution de nigrosine.

- Gels qui se contractent et se fissurent lors de la décoloration : vérifier que le degré de l'alcool n'est pas supérieur à 45° GL. Le phénomène se produit par ailleurs souvent avec des gels trop longtemps conservés et dont la structure s'est modifiée (rétrogradation) avec le temps, ou encore avec des gels préparés à une température insuffisamment élevée (gélification incomplète).

10- PHOTOGRAPHIE DU GEL

Les gels d'amidon peuvent se conserver indéfiniment dans l'alcool, mais une telle collection devient rapidement encombrante. Ils peuvent être également conservés à l'état sec mais avec évidemment un contraste plus médiocre. Il est donc souvent nécessaire de réaliser un cliché des diagrammes et cela permet en outre de conserver une trace dans les cahiers expérimentaux et une preuve matérielle des analyses variétales effectuées.

Les conditions exactes de photographie dépendent de l'équipement que l'on possède. On se bornera donc ici à donner des conseils d'ordre général.

10a - Choix de l'équipement et des produits photo

Il est conseillé d'utiliser un appareil photo type reflex 24 x 36 avec, de préférence, un objectif macroscopique ou, à la rigueur, des lentilles additionnelles. La prise de vue nécessite un support de hauteur réglable pour l'appareil et un éclairage par lampes floods. Si on réalise soi-même le développement des films et le tirage des photos, il convient d'avoir une chambre noire avec bacs à réactifs, eau courante, agrandisseur et sècheuse-glacuse.

Comme il est généralement difficile d'obtenir des contrastes suffisamment élevé avec les films courants, on conseille d'utiliser de préférence les produits suivants (qui sont d'ailleurs d'un emploi très facile : rapidité, possibilité de travailler en lumière rouge) :

- film ORTHOCHROMATIQUE type LF IV en rouleaux de 30 m x 3,5 cm perforés (GUILLEMINOT)
- papiers 9 x 13 blanc brillant GUILBROM avec gamme de contraste G1 (doux) à G5 (super contraste)
- révélateur rapide concentré GUILLEMINOT à diluer 5 fois
- fixateur rapide concentré GUILLEMINOT à diluer 3 fois

Pour mémoire, on signale l'emploi possible d'un appareil POLAROID permettant de réaliser des tirages instantanés, mais d'une qualité généralement inférieure.

10b - Prise de vue

On peut photographier les plaques de gels lorsque leur décoloration est suffisante (2 à 3 heures dans l'éthanol dilué en changeant le bain toutes les heures). On tiendra compte des conseils suivants :

- les gels seront photographiés immergés dans un bac d'alcool dilué propre.
- on filtrera fréquemment cet alcool pour éviter que de petits débris de gel n'y surnagent et n'apparaissent sur le cliché.
- on réglera l'angle et la distance des lampes floods : de façon à avoir une plage lumineuse homogène.
- on cherchera à éliminer ou à réduire les reflets dans le bain d'alcool (lesquels pourraient apparaître sur le cliché) au moyen d'un pare-soleil ou d'un cache noir mat.

10c Développement et tirage

Conditions classiques d'un laboratoire photo, avec possibilité (grâce au film ORTHOCHROMATIQUE) de travailler en lumière rouge.

11- INTERPRETATION DU DIAGRAMME

11a - Caractéristiques du diagramme

Comme le montrent les photos de l'annexe 1, le diagramme de chaque variété est constitué d'une vingtaine de bandes protéiques. Ces bandes (appelées aussi composants du diagramme) sont caractérisées par leur mobilité électrophorétique et par leur concentration.

La mobilité électrophorétique s'exprime par un nombre compris entre 0 (ligne de dépôt) et 100 (bande la plus rapide). A titre d'exemple, ce nombre a été explicité sur l'un des diagrammes de l'annexe 2. La mesure des mobilités des différentes bandes rencontrées au niveau de l'ensemble des blés français a été réalisée une fois pour toutes et 43 composants (significativement différenciables) ont été retenues.

La concentration relative des bandes a été exprimée simplement à l'aide de l'échelle suivante : +++, ++, +, traces, 0. Tout diagramme variétal peut alors être présenté sous la forme d'un schéma, rendant compte à la fois de la mobilité des composants et de leur concentration relative. L'annexe 3 fournit ainsi un tableau de ces schémas de diagrammes pour l'ensemble des 20 variétés françaises déjà citées dans l'annexe 1.

Il faut également souligner que les composants du diagramme variétal ne sont pas distribués au hasard, mais qu'ils constituent souvent des groupes caractéristiques aisément repérables. On a ainsi l'habitude de diviser le diagramme en 4 régions bien distinctes : les α gliadines (mobilité 100 à 88), les β gliadines (85 à 77), les γ gliadines (75 à

62) et les ω gliadines (60 à 21).

On a également observé que :

- certains composants sont communs à toutes les variétés et peuvent servir de repères sûrs : c'est le cas des bandes 65, 79, 81, 96.
- d'autres composants sont moins universels mais permettent une discrimination rapide des diagrammes variétaux : c'est le cas des bandes 22, 26, 30, 37, 39, 44, 46, 49, 74, 83, 85.
- d'autres composants enfin, ne se rencontrent qu'exceptionnellement et ne sont utilisés que très rarement dans les interprétations : c'est le cas des bandes 33, 41, 50, 52, 55, 57, 59, 60, 75, 86, 100.

11b - Principe de l'interprétation

L'interprétation du diagramme peut se réaliser soit sur le gel décoloré, soit sur une photo de ce gel. Il ne faut pas cacher que pour les non initiés, cette opération apparaîtra délicate. Elle consiste en effet, en une analyse visuelle des diagrammes et requiert une certaine mémoire visuelle. En outre, la possibilité de déterminer avec facilité les variétés ne sera pas acquise instantanément, mais apparaîtra après un entraînement progressif que chacun devra effectuer personnellement à partir des conseils et des documents fournis ici. Il convient donc de se familiariser avec la constitution des diagrammes, de s'entraîner à reconnaître tout d'abord les 5 ou 6 variétés les plus cultivées, ce qui est facile, et d'accroître ensuite peu à peu le champ de ses possibilités.

Les photos de l'annexe 1 (ou les schémas de l'annexe 3) mettent en évidence de nombreuses différences variétales et on observe que pratiquement chaque variété possède un diagramme particulier. Il est donc possible, à partir d'un diagramme quelconque, de retrouver l'identité de la variété correspondante. Tel est l'objectif du travail d'interprétation.

On pourrait essayer, pour cela, à partir d'un catalogue complet de photos, de comparer un à un les diagrammes, mais on préfère à cette solution fastidieuse, l'utilisation d'une clé de détermination. L'annexe 4 fournit l'exemple d'une telle clé, toujours dans le cas des 20 principales variétés françaises. Ce tableau construit selon le principe d'une flore, permet grâce à l'examen de quelques caractéristiques importantes du diagramme (présence ou absence de certains composants très discriminants), de retrouver rapidement et sans ambiguïté le nom ~~de~~ de chacune des variétés.

L'utilisation de la clé de détermination n'offre pas de difficulté particulière lorsqu'on dispose déjà d'un schéma du diagramme ou d'un diagramme dont les bandes ont été repérées (voir annexe 2). La partie délicate de l'interprétation réside donc évidemment dans le repérage des composants du diagramme, c'est-à-dire dans la détermination exacte de leur mobilité.

Pour différentes raisons, il n'est pas question d'essayer de recalculer les mobilités des différentes bandes du diagramme à partir de mesures directes sur les gels ou sur les photos. La solution que nous préconisons consiste, au contraire, en une utilisation systématique de diagrammes témoins dont les composants sont déjà parfaitement connus. Pour une meilleure efficacité du travail il est même conseillé d'avoir en mémoire les mobilités des bandes de 2 ou 3 variétés courantes (par exemple : Capitole, Champlein et Joss). Lorsque l'un de ces diagrammes témoins se trouvera situé sur le gel, à côté d'un diagramme inconnu, il deviendra alors aisé d'établir les mobilités des bandes de ce dernier, en s'aidant éventuellement du répertoire complet des 43 composants possibles. L'annexe 2 suggère un tel exercice de repérage sur 2 diagrammes inconnus, à partir du marquage réalisé sur un diagramme témoin.

Lorsque l'on se sera peu à peu familiarisé avec les diagrammes des blés courants, on vérifiera que plusieurs bandes ou groupes de bandes se retrouvent très souvent dans les diagrammes, notamment chez les blés d'hiver et leur repérage se fera alors quasi instantanément. Par exemple, les ω gliadines de Capitole se retrouvent sans changement chez Top, Hardi, Joss, Ducat, etc... Celles de Champlein se retrouvent aussi pratiquement chez Talent, Maris Huntsman, Charles-Péguy, etc... De même, les α gliadines sont les mêmes chez Hardi, Joss, Magali, Top, Heima, d'une part, chez Capitole, Charles-Péguy, et Talent d'autre part.

On observera également qu'il est inutile de déterminer la mobilité de toutes les bandes, mais seulement de certaines d'entre elles, parmi les plus discriminantes ; celles, précisément, que la clé de détermination utilise.

Il faut ainsi s'entraîner à analyser, dans un premier temps, la région des ω gliadines, dont les bandes sont très bien résolues et chez laquelle les différences variétales sont très nettes ; dans un second temps seulement, les autres régions (α , β , γ) du diagramme, chez lesquelles les différences sont souvent plus subtiles.

Au sein des ω gliadines, il est important de savoir distinguer :

- le groupe 22.26.30. (caractéristique des diagrammes de type A), du groupe 21.25.26 (caractéristique des diagrammes de type B).
- le groupe 44.46.49. (rencontré chez Capitole, Top, Hardi, Joss, Ducat, Magali...) du groupe 44.46. (Champlein, Talent, Maris Huntsman...).
- le composant 39 (présent chez Capitole, Top, Hardi, Heima, Florence-Aurore ...) et absent chez Champlein, Talent, Rex, Charles-Péguy, Chrismor...
- quelques composants relativement exceptionnels tels que le 60 (caractéristique d'Etoile de Choisy) ou le 37 (rencontré chez Clément, Courtot, Lutin...).

Dans les régions α -, β - et γ - gliadines, la discrimination portera essentiellement sur les bandes :

- 74 (dont l'absence caractérise les blés : Capitole, Talent, Ducat, Charles-Péguy, ...).
- 77 (fortement représenté chez Champlein, Hardi, Talent, Joss...).
- 83/85 (permettant notamment de différencier : Joss, Hardi, Champlein-Maris Huntsman...).
- 90/91 (permettant notamment de différencier : Top-Capitole, Champlein-Talent...).
- 93 (qui caractérise plusieurs blés de printemps : Rex, Kolibri, Florence-Aurore...).

Lorsque l'on aura ainsi établi la présence ou l'absence de ces composants principaux, il suffira de suivre la clé de détermination jusqu'à aboutir au nom de la variété. On pourra alors éventuellement confirmer le résultat en s'assurant qu'il y a bien identité entre le diagramme analysé et celui du tableau de référence (annexe 1 ou annexe 3).

On rappelle que les documents fournis dans les annexes 1, 3 et 4 sont limités aux 20 principales variétés cultivées en France, ce qui permet de trancher dans la quasi totalité des cas. Si l'on rencontrait cependant une variété ne figurant pas dans ces documents, on pourrait alors s'aider de la clé de détermination complète du Catalogue Officiel des Variétés Françaises, qui figure dans le tiré-à-part (annexe 5).

11c - Cas des variétés pures

Lorsque l'on est certain d'avoir affaire à un lot de variété pure, on opère selon le protocole suivant :

- mouture de quelques grammes de l'échantillon inconnu
- extraction des gliadines sur cette mouture (voir § 5a)
- dépôt de cet extrait dans le gel, à côté de celui d'un blé courant dont

les positions des bandes sont parfaitement connues (Capitole, Champlain, Joss...).

- après électrophorèse, coloration du gel, repérage des principaux composants du diagramme inconnu en s'aidant de ceux du diagramme témoin.
- lecture de la clé de détermination jusqu'à identification de la variété.
- vérification à l'aide d'un diagramme ou d'un schéma de référence.

Généralement, on pourra affirmer avec certitude que le lot inconnu appartient à la variété ainsi déterminée. Il faut cependant signaler que dans quelques rares cas, deux ou plusieurs variétés présentent le même diagramme gliadine (voir clé de détermination de l'annexe 5) et qu'il y a alors lieu de faire certaines réserves. Pratiquement, au niveau des variétés courantes actuelles, le cas ne se présente que pour Capitole et Ducat (voir annexe 4). Si l'on trouve ainsi, par exemple, le diagramme de Capitole, il y aura lieu de dire :

"Capitole, ou Ducat".

La différenciation plus poussée de ces deux blés nécessite la mise en oeuvre de techniques complémentaires.

Dans l'ensemble, on observera que la différenciation de deux variétés est d'autant plus aisée que les diagrammes présentent davantage de différences. Comme l'analogie des diagrammes est une forme d'expression de la parenté génétique des blés, il est toujours plus simple de distinguer des variétés génétiquement éloignées (cas des blés de printemps), que des variétés génétiquement voisines (cas de certains blés d'hiver).

11d - Cas des mélanges variétaux

Lorsque l'on est en présence d'un mélange de variétés, il est inutile de procéder à l'analyse des gliadines sur mouture, car l'additivité des bandes provenant de différents diagrammes, déjà complexes par eux-mêmes, rendrait le plus souvent ininterprétable le diagramme du mélange. On a alors recours à une détermination, grain par grain, de la variété, à partir d'un micro-échantillon représentatif, selon le protocole suivant :

- homogénéisation de l'échantillon
- divisions successives, jusqu'à la taille désirée pour le micro-échantillon (50 grains en général)
- extraction des gliadines grain par grain (voir § 5b) sur ce micro-échantillon
- dépôt des extraits dans les gels, au cours d'expériences pouvant être étalées sur 1 ou plusieurs jours
- identification (comme pour le cas des variétés pures) des différentes variétés présentes à partir des diagrammes donnés par chaque grain

- bilan du nombre de grains appartenant à chacune des variétés trouvées
- calcul de leur pourcentage relatif, d'où la composition variétale qualitative et quantitative du lot analysé.

Il faut évidemment préciser que les pourcentages trouvés après analyse du micro échantillon ne ~~peuvent~~ peuvent être considérés comme des valeurs rigoureusement exactes. Comme pour toute autre analyse de populations, ces pourcentages ne représentent que la valeur correspondant à une probabilité maximum, les pourcentages réels des variétés dans l'échantillon se trouvant dans un intervalle de confiance (ou "fourchette") que l'on peut calculer selon des tables statistiques et dont le tableau ci-dessous fournit un exemple simplifié (d'après WRIGLEY et BAXTER, 1974).

Pourcentage trouvé	: Intervalle de confiance pour 1 probabilité de 95%			
	: 20 grains	: 50 grains	: 100 grains	: 200 grains
1 %	: -	: -	: 0-5 %	: 0-3 %
2 %	: -	: 0-10 %	: 0-7 %	: 0-4 %
3 %	: -	: -	: 1-8 %	: 1-5 %
4 %	: -	: 1-13 %	: 1-10 %	: 2-7 %
5 %	: 0-25 %	: -	: 2-11 %	: 2-9 %
6 %	: -	: 1-16 %	: 2-12 %	: 3-10 %
8 %	: -	: 2-19 %	: 3-13 %	: 4-12 %
10 %	: 1-32 %	: 3-22 %	: 5-17 %	: 6-14 %
20 %	: 6-44 %	: 10-34 %	: 13-29 %	: 15-25 %
30 %	: 12-54 %	: 18-45 %	: 21-40 %	: 24-36 %
40 %	: 19-64 %	: 26-55 %	: 30-50 %	: 33-47 %
50 %	: 27-73 %	: 35-65 %	: 40-60 %	: 43-57 %

Exemples d'analyses :

- 1) Sur 50 grains analysés dans un mélange commercial, on trouve 48 grains de Hardi et 2 grains de Maris Huntsman.

Quelle est la composition du lot ?

2 grains sur 50 représentent 4 %. Lire la table pour 4 % et pour 50 grains on trouve qu'à une probabilité de 95 %, la teneur en Maris Huntsman est comprise entre 1 et 13 %.

2) Sur 100 grains analysés dans un mélange commercial, on trouve 60 grains Capitole, 30 grains Top et 10 grains Joss. La table donne la composition du lot (valeurs médianes et "fourchettes" correspondantes, à 95 % de probabilité) :

(Capitole 60 % (50 à 70 %)
(Top 30 % (21 à 40 %)
(Joss 10 % (5 à 17 %)

12 - REFERENCES DES FOURNISSEURS

APELAB (Matériel d'Electrophorèse). 29 rue Salvador Allende 92220 BAGNEUX 655.63.36
BERCAUVERRE (verrier). 3 rue Rollin 75005 PARIS 326.29.76
BHV (Bazar de l'Hôtel de Ville). 1 rue des Archives 75004 PARIS 508.20.02
CIE GENERALE DE METROLOGIE (Metrix). 56 avenue Emile Zola 75015 PARIS 253.31.89
CULATTI (Broyeur). Urmentrasse 291 ZURICH 5. SUISSE
GELMAN (Electrophorèse). 14 boulevard Edouard Vaillant 93300 AUBERVILLIERS 834.91.80
GILSON FRANCE (Electrophorèse). 69 rue Gambetta 95 VILLIERS LE BEL 990.10.38
GUILLEMINOT BOESFLUG et Cie (Photo). 22 rue de Chateaudun 75009 PARIS 678.42.07
MECA VIGOR (centrifugeuse). 88 rue de la Folie-Méricourt 75011 PARIS 357.90.90
OSI SERVICE PLEUGER (matériel d'électrophorèse). 141 rue de Javel 75015 PARIS 828.53.09
PROLABO. 12 rue Pelée BP 20 75011 PARIS 355.90.00
PROMOPLAST (Tupperware). 13 bis rue des Truilles 92 CLAMART 642.95.01
ROUCAIRE (Service ISCO). BP 65. 20 avenue de l'Europe 78140 VELIZY 946.96.33
TOUZART et MATIGNON. 3 rue Amyot 75005 PARIS 325.70.04
TRIPETTE et RENAUD. 39 rue Jean-Jacques Rousseau 75001 PARIS 231.21.45
WEBER (fils d'acier). 9 rue du Poitou 75010 PARIS 887.33.89

13 - BIBLIOGRAPHIE

AUTRAN J.C., 1973. L'identification des variétés de Blé. Bull. Anc. Elèves EFM, 256, 163-169.
AUTRAN J.C., 1975. Nouvelles possibilités d'identification des variétés françaises de blé par électrophorèse des gliadines du grain. Indus. Agric. Alim., 8, sept-oct., 9-10, 1075-1094.
AUTRAN J.C., 1975. Identification des principales variétés communautaires de blé tendre par électrophorèse des gliadines. Bull. Anc. Elèves EFM, 270 (sous presse)
AUTRAN J.C., BOURDET A., 1973. Nouvelles données permettant l'exploitation de l'hétérogénéité électrophorétique des gliadines du grain de blé en vue d'une identification variétale. C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. D, 2081-2084.
AUTRAN J.C., BOURDET A., 1975. Possibilités d'un contrôle variétal qualitatif et quantitatif dans les lots de blé commerciaux. C. R. Acad. Agric., Séance du 11 juin 1975 (sous presse).
AUTRAN J.C., BOURDET A., 1975. Nouvelles possibilités de contrôle variétal qualitatif et quantitatif dans les lots de blé commerciaux. Techniques des Industries Céréalières, 150, 7-13.

- AUTRAN J.C., BOURDET A., 1975. L'identification des variétés de blé : établissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grain. Ann. Amélior. Plantes, 25, 3, 277-301.
- BOURDET A., FEILLET P., METTAVANT F., 1963. Sur le comportement électrophorétique des prolamines en gel d'amidon. C. R. Acad. Sci. Paris, 256, Sér. D, 4517-4520.
- DOEKES G.J., 1968. Comparison of wheat varieties by starch gel electrophoresis of their grain proteins. J. Sci. Food Agric., 19, 169-176.
- ELLIS R.P., 1971. The identification of wheat varieties by the electrophoresis of grain proteins. J. nat. Inst. agric. Bot., 12, 223-235.
- ELTON G.A.M., EWART J.A.D., 1962. Starch gel electrophoresis of cereal proteins. J. Sci. Food Agric., 13, 62-72.
- FEILLET P., 1965. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques technologiques et agronomiques. Ann. Technol. Agric. 14, HS 1, 1-94.
- FEILLET P., BOURDET A., 1967. Composition protéique et caractéristiques génétiques des blés. Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 10, 1273-1283.
- HUEBNER F.R., ROTHFUS J.A., 1968. Gliadin proteins from different varieties of wheats. Cereal Chem., 45, 3, 242-253.
- KONAREV V.G., GUBAREVA N.K., GAVRILYUK I.P., 1970. Marqueurs protéiques des génomes de blé et d'espèces sauvages apparentées. II. Analyse comparative des gliadines (en russe). Vestn. Sel'Skokhoz. Nauki (Moscou), 15, 8, 109-114.
- LEE J.W., WRIGLEY C.W., 1963. The protein composition of gluten extracted from different wheats. Aust. J. exp. Agric. Animal Husbandry, 3, 9, 85-88.
- SOZINOV A.A., POPERELLIA F.A., STAKANOVA A.I., 1973. Polymorphisme intervariétal des gliadines de quelques variétés de blé (en russe). Dokl. Vses. Akad. Sel'Skokhoz. Nauk ., 2, 9-11.
- WOYCHICK J.H., BOUNDY J.A., DIMLER R.J., 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. Arch. Biochem. Biophys., 94, 477-482.
- WRIGLEY C.W., SHEPHERD K.W., 1974. Identification of australian wheat cultivars by laboratory procedures : examination of pure samples of grain. Aust. J. of Exptl. Agric. Anim. Husb., 14, 796-804.
- WRIGLEY C.W., BAXTER R.I., 1974. Identification of australian wheat cultivars by laboratory procedures : grain samples containing a ~~mixtures~~ mixture of cultivars. Aust. J. of Exptl. Agric. Anim. Husb., 14, 805-810.
-