

EFICIÊNCIA DE MARCADORES MOLECULARES DE DNA PELO MÉTODO KASP NA IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS DE HMW-GS

Camila Vancini¹, Gisele Abigail Montan Torres^{1(*)}, Luciano Consoli¹, Tatiane Baseggio Crespi¹ e Magali Ferrari Grando²

¹Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, Km 294, Caixa Postal 3081, CEP 99050-970 Passo Fundo, RS. (*)Autor para correspondência: gisele.torres@embrapa.br

²Universidade de Passo Fundo, Rodovia BR 285, CEP 99050-970 Passo Fundo, RS

O glúten é o principal determinante das características de viscoelasticidade da massa da farinha de trigo e da sua qualidade de uso final. As proteínas de reserva, gluteninas e gliadinas, são expressas exclusivamente nos grãos de trigo e são responsáveis pela formação do glúten.

As gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) são codificadas por seis genes situados em três locos no braço longo dos cromossomos 1A, 1B e 1D, respectivamente (*Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*). Essas proteínas estão associadas às características de elasticidade da massa, apresentando propriedades de resistência à extensão (Hoseney, 1994). Diferentes HMW-GS vêm sendo associadas a contribuições distintas para o uso final da farinha de trigo. O loco *Glu-D1* produz alternativamente os pares de subunidades 5+10 e 2+12, que estão associados à qualidade de panificação superior ou inferior, respectivamente (Costa et al., 2013). Outros estudos demonstraram a participação também dos alelos do loco *Glu-A1* (1, 2* e N), com características de interesse para a panificação (Li et al., 2010).

Os programas de melhoramento de trigo têm intensificado as pesquisas para caracterizar genes responsáveis pela qualidade de trigo. Porém, o perfil tecnológico de uma linhagem promissora só pode ser determinado em etapas avançadas do melhoramento genético de trigo, sendo necessária grande quantidade de grãos (aproximadamente 800 gramas).

A eletroforese de gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma técnica que permite a identificação das subunidades de gluteninas a partir da análise dos grãos de trigo. Esta técnica demanda tempo na sua execução e um número restrito de amostras pode ser avaliado por análise. Ainda, há a possibilidade de identificação incorreta de alelos funcionalmente distintos devido à similaridade quanto à mobilidade em SDS-PAGE (Feng et al., 2011).

Marcadores moleculares de DNA também podem discriminar os alelos HMW-GS, proporcionando uma ferramenta mais conveniente para análises genéticas em menor tempo (Yin et al., 2017). Entre os marcadores desenvolvidos para as HMW-GS, estão os SNPs (*single nucleotide polymorphism*), caracterizados pelo polimorfismo de uma única base. Entre os diferentes métodos disponíveis para a detecção de SNPs, o método KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*) tem mostrado resultados promissores, tendo como vantagens a agilidade na identificação de genes de interesse e o baixo custo (Rasheed et al., 2016). Pelo uso desse método, o genótipo é detectado pela leitura de sinais fluorescentes, dispensando a técnica de eletroforese e agilizando o processo de identificação.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a eficiência dos marcadores KASP na identificação de alelos para os locos *Glu-A1* e *Glu-D1*, através da comparação das técnicas de SDS-PAGE e de marcadores de DNA.

Duzentos e setenta acessos de trigo de diversos países, incluindo trigos denominados sintéticos, provenientes de cruzamentos de trigo tetraploides e diploides, foram avaliados quanto ao perfil de HMW-GS por SDS-PAGE, sendo os alelos dos locos *Glu-A1* e *Glu-D1* também avaliados por marcadores de DNA pelo método KASP. Foram empregados dois fluoróforos, FAM e HEX. A extração das proteínas de reserva foi realizada conforme Singh et al. (1991) e a identificação dos alelos proteicos, feita em SDS-PAGE. A extração de DNA foi realizada em placas de 96 poços, pelo protocolo de extração em CTAB. As sequências dos *primers* dos marcadores para os alelos do loco *Glu-A1* (1, 2* e N) e do loco *Glu-D1* (5+10 e 2+12/outros) foram obtidas da literatura, conforme Liu et al. (2008) e Ishikawa e Nakamura (2007), respectivamente (Tabela 1).

TABELA 1. Relação dos *primers* KASP usados para as análises de DNA.

<i>Primer</i>	<i>Caractere</i>	<i>Alelo FAM</i>	<i>Alelo HEX</i>	<i>Primer comum</i>
wMAS000012	<i>Glu-A1</i> (2*/N ou 1)	GAGCGCGAGCT CCAGGAG	GAGCGCGAGCT CCAGGAA	GGCATGCCTTAA GCGAGTG
wMAS000013	<i>Glu-A1</i> (2*/1 ou N)	AAGTGTAAGTTC TCCGCAACA	AAGTGTAAGTTC TCCGCAACG	GGCCTGGATAGT ATGAAACC
wMAS000014	<i>Glu-D1</i> (5+10 ou 2+12/outros)	ATAGTATGAAAC CTGCTGCGGAG	ATAGTATGAAAC CTGCTGCGGAC	TACTAAAAAGGT ATTACCCAAGTG TAACTT

Para os marcadores do loco *Glu-A1*, entre os 270 acessos avaliados, 44 acessos (16,3%) foram identificados com o alelo 1, 119 acessos (44%) com o alelo 2*, 82 acessos (30,3%) com o alelo N e, para 25 acessos (9,2%), não houve leitura devido, provavelmente, à presença de polimorfismo na região de anelamento dos primers (Tabela 2). Considerando os dados dos 245 acessos para os quais foram obtidas leituras com ambos os métodos, houve 91,8% de concordância entre o resultado de SDS-PAGE e de marcadores KASP.

TABELA 2. Relação do total de genótipos de trigo identificados com os marcadores wMAS000012 e wMAS000013 para o loco *Glu-A1*.

HMW-GS	Alelos amplificados	n° de genótipos
1	HEX e FAM	44 (16,3%)
2*	FAM e FAM	119 (44,0%)
N	FAM e HEX	82 (30,3%)
-	sem leitura	25 (9,2%)
Total		270 (100%)

Para o marcador do loco *Glu-D1*, entre os 270 acessos de trigo avaliados, 172 acessos (63,7%) foram identificados com a presença dos alelos 2+12 ou outros, 82 acessos (30,3%) com a presença dos alelos 5+10, e para 16 acessos (5,9%) não houve leitura (Tabela 3). Para os 254 acessos com leitura com ambos os métodos, houve 98,8% de concordância.

TABELA 3. Relação do total de genótipos de trigo identificados com o marcador wMAS000014 para o loco *Glu-D1*.

HMW-GS	Alelos amplificados	n° de genótipos
2+12 ou outros	FAM	172 (63,7%)
5+10	HEX	82 (30,3%)
-	sem leitura	16 (5,9%)
Total		270 (100%)

Os resultados indicam que os primers apresentam uma alta eficiência de amplificação, fornecendo leitura para mais de 90% dos acessos avaliados mesmo com a avaliação de uma coleção de origem diversa. Além disso, foi observada alta porcentagem de concordância de resultado entre os marcadores de DNA pelo método KASP e pela SDS-PAGE. Com os acessos caracterizados, os marcadores moleculares podem ser usados nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, como amostras de folhas, não sendo necessária a formação de grãos. Ainda, a análise em larga escala – maior número de amostras em menor intervalo de tempo - da identificação de alelos gênicos determinantes para a qualidade de uso final de trigo contribuirá para acelerar o processo de desenvolvimento de novas cultivares de trigo.

Referências bibliográficas

COSTA, M. S.; SCHOLZ, M. B. dos S.; FRANCO, C. M. L. Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. **Ciência e**

Tecnologia de Alimentos, v. 33, p. 163-170, 2013. Suppl. I.

FENG, B.; AN, X.; XU, Z.; LIU, D.; ZHANG, A.; WU, N.; WANG, T. Molecular cloning of a novel chimeric HMW glutenin subunit gene 1Dx5' from a common wheat line W958. **Molecular Breeding**, v. 28, n. 2, p. 163-170, 2011.

HOSENEY, R. C. **Principles of cereal science and technology**. 2nd ed. St. Paul: American Associate Cereal Chemistry, 1994. 378 p.

ISHIKAWA, G.; NAKAMURA, T. A new co-dominant PCR-based marker to identify the high-molecular-weight glutenin subunit combination "5+ 10" of common wheat. **Wheat Information Service**, n. 103, p. 1-4, 2007.

LI, Y.; ZHOU, R.; BRANLARD, G.; JIA, J. Development of introgression lines with 18 alleles of glutenin subunits and evaluation of the effects of various alleles on quality related traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 1, p. 127-133, 2010.

LIU, S.; CHAO, S.; ANDERSON, J. A. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 1, p. 177, 2008.

RASHEED, A.; WEN, W.; GAO, F.; ZHAI, S.; JIN, H.; LIU, J.; GUO, Q.; ZHANG, Y.; DREISIGACKER, S.; XIA, X.; HE, Z. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 10, p. 1843-1860, 2016.

SINGH, N. K.; SHEPHERD, K. W.; CORNISH, G. B. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. **Journal of Cereal Science**, v. 14, n. 3, p. 203-208, 1991.

YIN, H.; DU, X.; WANG, B.; MA, X.; BO, C.; LI, A.; ZHANG X.; KONG, L. Detection of high-molecular-weight glutenin subunit genes for 1Dx2 and 1Dx5 using loop-mediated isothermal amplification assay. **Molecular Breeding**, v. 37, n. 8, p. 97, 2017.