

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Caracterização de alelos de gluteninas de alto peso molecular,
influência sobre a qualidade de uso final de trigo no Brasil e análise de
marcadores moleculares**

Camila Vancini

Passo Fundo

2018

Camila Vancini

Caracterização de alelos de gluteninas de alto peso molecular, influência sobre a qualidade de uso final de trigo no Brasil e análise de marcadores moleculares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Agronomia.

Orientador:

Profa. Dra. Magali Ferrari Grandó

Coorientador:

Dra. Gisele Abigail Montan Torres

Passo Fundo
2018

CIP – Catalogação na Publicação

V222c Vancini, Camila

Caracterização de alelos de gluteninas de alto peso molecular, influência sobre a qualidade de uso final de trigo no Brasil e análise de marcadores moleculares / Camila Vancini. – 2018.

112 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Dra. Magali Ferrari Grando.

Coorientadora: Dra. Gisele Abigail Montan Torres.

Mestrado (Dissertação em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. Trigo. 2. Marcadores genéticos. 3. Engenharia genética vegetal. I. Grando, Magali Ferrari, orientadora. II. Torres, Gisele Abigail Montan, coorientadora. III. Título.

CDU: 633.11

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

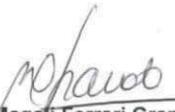
“Caracterização de alelos de gluteninas de alto peso molecular, influência sobre a qualidade de uso final de trigo no Brasil e análise de marcadores moleculares”

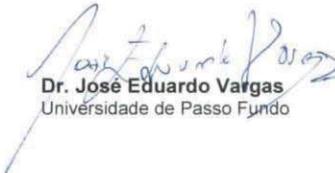
Elaborada por

Camila Vancini

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas

Aprovada em: 30/04/2018
Pela Comissão Examinadora


Dra. Magali Ferrari Grando
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dr. José Eduardo Vargas
Universidade de Passo Fundo


Dra. Gisele Abigail Montan Torres
Embrapa
Coorientadora


Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia


Dra. Sandra Patussi Brammer
Embrapa


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus amados pais, Isair e Lourdes, por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo amor e cuidado incondicional. E ao meu marido Diones, por estar sempre ao meu lado, me apoiar em todos os momentos. Muito obrigada por acreditarem em mim e pelo apoio contínuo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de Passo Fundo pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado em Agronomia.

À CAPES, pela concessão da taxa de estudos.

À Embrapa Trigo por poder desenvolver meu estudo.

À minha orientadora profa. Dra. Magali Ferrari Grando, a qual tenho imensa admiração. Por ser uma pessoa iluminada e grande profissional que me inspirou a seguir este caminho. Obrigada por ter me recebido tão bem nessa jornada. Por sempre acreditar em mim e me motivar desde que nos conhecemos. Sua presença na minha caminhada foi e será sempre muito importante.

À minha coorientadora Dra. Gisele Abigail Montan Torres, obrigada por todos os ensinamentos, por todo crescimento profissional e pessoal que tive durante sua orientação. Obrigada pela paciência e esforço em me guiar a ser cada dia melhor no que faço. Por ser essa pessoa incrível, profissional competente que admiro muito e que me inspira a cada dia.

Aos colaboradores do meu trabalho, Dra. Martha Zavariz de Miranda e Dr. Luciano Consoli, grandes profissionais e pessoas admiráveis. Obrigada pela valiosa e incansável contribuição. Sem vocês a realização deste trabalho não seria possível.

À toda equipe do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, por toda a ajuda e amizade que fiz durante este período. Em especial agradeço aos funcionários Tatiane Baseggio Crespi e Jordalan Buffet Muniz, pela grande ajuda nas análises de DNA.

À toda equipe do Laboratório de Qualidade de Grãos da Embrapa Trigo, pelas análises de qualidade tecnológica de trigo em especial ao funcionário Antônio Sérgio Brisola de Oliveira que me ajudou com as análises de microssedimentação.

Aos meus amados pais, Isair e Lourdes, que me ensinaram o amor e a gratidão e me apoiaram em todos os momentos. À minha querida irmã Deise, meu cunhado Leandro e minha sobrinha Estela pelo orgulho que demonstraram por mim e ao apoio constante.

Ao meu marido Diones, por estar sempre ao meu lado com amor e compreensão, me apoiando em todos os momentos. Obrigada pelo incentivo e ajuda que possibilitou a realização deste curso. Obrigada por ser esse companheiro tão presente em minha vida.

Aos colegas e amigos que fiz durante o curso, pelos bons momentos compartilhados.

À toda minha família e amigos que estiveram me apoiando e torcendo por mim.

Por fim agradeço a Deus pelas bênçãos constantes em minha vida.

EPIGRAFE

“Ninguém é digno do pódio se não usar suas derrotas para alcançá-lo. Ninguém é digno da sabedoria se não usar suas lágrimas para cultivá-la. Ninguém terá prazer no estrelato se desprezar a beleza das coisas simples no anonimato. Pois nelas se escondem os segredos da felicidade”. (Augusto Cury)

RESUMO

VANCINI, Camila. Caracterização de alelos de gluteninas de alto peso molecular, influência sobre a qualidade de uso final de trigo no Brasil e análise de marcadores moleculares. 2018. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar as gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) e analisar sua relação com parâmetros de qualidade tecnológica de trigo (QTT) em uma coleção de genótipos de trigo com importância na introgressão de características de interesse pelos programas de melhoramento no Brasil. Foram avaliados 274 acessos de trigo por SDS-PAGE, sendo que para 219 acessos com homogeneidade para gluteninas de alto peso molecular foram encontrados 53 perfis e 21 alelos. A combinação mais frequente foi 2*/7+9/5+10 (11,9%). Com base no perfil proteico de HMW-GS e na identificação da super expressão do alelo 7oe e da translocação 1BL.1RS, através do uso de marcadores moleculares de DNA, o escore *Glu-1* foi calculado e as correlações com parâmetros de qualidade tecnológica de trigo (QTT) foram analisadas. Os principais efeitos dos locos *Glu-1* e 1BL.1RS foram estimados usando o algoritmo da máxima verossimilhança restrita (REML). O escore *Glu-1* mostrou correlações significativas com as análises de QTT: microssedimentação com dodecil-sulfato de sódio (MS-SDS); alveografia, com os parâmetros: força de glúten (W), tenacidade (P), extensibilidade (L) e índice de elasticidade (Ie) e farinografia, com o parâmetro estabilidade (EST) com valores de coeficiente de correlação (*r*) variando de 0,27 a 0,51. Os alelos 1, 7oe+8 e 5+10, localizados nos locos *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*, respectivamente, tiveram maiores valores para W, Ie e EST. Os resultados indicaram que é necessário um ajuste no escore para os alelos do loco *Glu-A1* para as condições do Brasil bem como o uso de marcadores moleculares para a identificação da combinação 7oe+8. Marcadores moleculares do tipo SNP (single nucleotide polymorphism) foram usados para analisar 467 acessos de trigo pelo método KASP, para alelos dos locos *Glu-A1* e *Glu-D1* e para translocação 1BL.1RS. A análise de HMW-GS em SDS-PAGE de 270 dos acessos possibilitou a comparação dos resultados com as análises de DNA. Para o marcador do loco *Glu-A1* houve 91,8% de concordância com o perfil proteico de HMW-GS e para o loco *Glu-D1*, 98,8%. Para o marcador do loco *Glu-B1* da super expressão 7oe, foram identificados 22 (10%) acessos com este alelo. A presença da translocação 1BL.1RS foi identificada em 83 (18%) dos 467 acessos de trigo avaliados. Os resultados indicaram a eficiência no uso de marcadores moleculares para os locos *Glu-1*.

Palavras-chave: 1. *Triticum aestivum*. 2. HMW-GS. 3. Panificação. 4. Escore *Glu-1*. 5. Marcadores moleculares de DNA.

ABSTRACT

VANCINI, Camila. Characterization of high molecular weight glutenins alleles, influence on the end-use quality of wheat in Brazil and analysis of molecular markers. 2018. 112 f. Dissertation (Masters in Agronomy) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

The objective of this work was to characterize the high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) and to analyze their relation with parameters of wheat technological quality in a collection of wheat genotypes with importance in the introgression of characteristics of interest by breeding programs in Brazil. A total of 274 accessions of wheats were evaluated by SDS-PAGE, and for 219 accessions with homogeneity for HMW-GS 53 profiles and 21 alleles were found. The most frequent combination was 2*7+9/5+10 (11.9%). Based on the protein profile of HMW-GS and the identification of 7^{oe} allele overexpression and 1BL.1RS translocation with DNA molecular markers, the *Glu-1* score was calculated and the correlations with wheat technological quality parameters were analyzed. The main effects of the *Glu-1* and 1BL.1RS loci were estimated using the maximum likelihood-restricted algorithm (REML). The *Glu-1* score showed significant correlations with the QTT: sodium dodecylsulfate microsedimentation (MS-SDS); alveography with gluten strength (W), tenacity (P), extensibility (L) and elasticity index (Ie) and pharynography, with the parameter stability (ST) with values of correlation coefficient (*r*) varying from 0.27 to 0.51. Alleles 1, 7^{oe}+8 and 5+10, located at the *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* loci, respectively, had higher values for W, Ie and ST. The results indicated that an adjustment to the *Glu-A1* locus alleles score for Brazil conditions of cultivation is required as well as the use of molecular markers for the identification of the 7^{oe}+8 combination. SNP (single nucleotide polymorphism) molecular markers were used to analyze 467 accessions of wheat by the KASP method for alleles of the *Glu-A1* and *Glu-D1* loci and for translocation 1BL.1RS. The SDS-PAGE analysis of 270 of the accessions allowed the comparison of the results with the DNA analyzes. For the *Glu-A1* locus marker there was 91.8% agreement with the protein profile of HMW-GS and for locus *Glu-D1*, 98.8%. For the *Glu-B1* locus marker of superexpression 7^{oe} and 22 (10%) were identified with this allele. The presence of 1BL.1RS translocation was identified in 83 (18%) of the 467 accessions of wheat. The results indicated the efficiency in the use of molecular markers for the *Glu-1* loci.

Key words: 1. *Triticum aestivum*. 2. HMW-GS. 3. Bread-making. 4. *Glu-1* score. 5. DNA molecular markers.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	<i>Trigo</i>	16
2.2	<i>Importância do trigo</i>	17
2.3	<i>Qualidade tecnológica de trigo</i>	19
2.4	<i>Parâmetros físicos e físico-químicos</i>	20
2.5	<i>Parâmetros relacionados ao glúten</i>	21
2.6	<i>Parâmetros reológicos</i>	22
2.7	<i>Proteínas de reserva do trigo</i>	23
2.8	<i>Combinações para qualidade tecnológica de trigo</i>	27
2.9	<i>Escore para qualidade tecnológica de trigo</i>	28
2.10	<i>Marcadores moleculares de DNA</i>	31
2.11	<i>Marcadores moleculares de DNA para HMW-GS</i>	32
3	CAPÍTULO I	35
3.1	<i>Resumo</i>	35
3.2	<i>Introdução</i>	35
3.3	<i>Material e Métodos</i>	37
3.4	<i>Resultados e Discussão</i>	44
3.4.1	<i>Alelos e escore <i>Glu-1</i></i>	44
3.4.2	<i>Diversidade genética</i>	57
3.4.3	<i>Trigos sintéticos</i>	58
3.4.4	<i>Relação do escore <i>Glu-1</i> e da MS-SDS com parâmetros de qualidade tecnológica de trigo</i>	61
3.4.5	<i>Efeito dos locos <i>Glu-1</i>, da translocação 1BL.1RS, do ano e da interação com o ano sobre os parâmetros de qualidade tecnológica de trigo</i>	65
3.4.6	<i>Efeito dos alelos do loco <i>Glu-A1</i> sobre parâmetros de qualidade tecnológica de trigo</i>	67
3.4.7	<i>Efeito dos alelos do loco <i>Glu-B1</i> sobre parâmetros de qualidade tecnológica de trigo</i>	71
3.4.8	<i>Efeito dos alelos do loco <i>Glu-D1</i> sobre parâmetros de qualidade tecnológica de trigo</i>	73
3.4.9	<i>Efeito da translocação 1BL.1RS sobre parâmetros de qualidade tecnológica de trigo</i>	74
3.5	<i>Conclusões</i>	75
4	CAPÍTULO II	76
4.1	<i>Resumo</i>	76
4.2	<i>Introdução</i>	76

<i>4.3 Material e Métodos</i>	79
<i>4.4 Resultados e Discussão</i>	81
4.4.1 Marcador molecular de DNA para o loco <i>Glu-A1</i>	82
4.4.2 Marcador molecular de DNA para <i>GluBx7oe</i>	84
4.4.3 Marcador molecular de DNA para o loco <i>Glu-D1</i>	87
4.4.4 Marcador para translocação 1BL.1RS	89
<i>4.5 Conclusões</i>	90
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
6 CONCLUSÃO GERAL	93
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum*) tem grande importância econômica e nutricional e está entre os cereais mais produzidos e consumidos no mundo. A farinha é o principal derivado obtido do trigo, sendo a única a apresentar características como coesividade, elasticidade e extensibilidade, necessárias para o processo de panificação. As proteínas do trigo, especificamente as proteínas formadoras do glúten, são as responsáveis por essas características especiais da farinha. Elas são expressas especifica e exclusivamente nos grãos.

As gliadinas e as gluteninas são as proteínas responsáveis pela formação do glúten influenciando suas propriedades reológicas. As gliadinas estão envolvidas nas características de extensibilidade da massa. Já as gluteninas são consideradas as principais determinantes da elasticidade do glúten e apresentam propriedade de resistência à extensão no processo de panificação. As gluteninas são classificadas em função da massa molecular em gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS, *high-molecular weight glutenin subunits*) e em gluteninas de baixo peso molecular (LMW-GS, *low-molecular weight glutenin subunits*).

A qualidade do trigo é influenciada por fatores hereditários, principalmente por suas proteínas que estão ligadas ao genoma. Atribui-se à composição das HMW-GS características específicas para o processo de panificação. Os programas de melhoramento genético de trigo buscam além de características agrônomicas, como um elevado rendimento em grãos, a capacidade deste em produzir farinha com qualidade, atendendo a demanda dos agricultores, moinhos, indústrias de produto final e consumidores. A qualidade tecnológica de trigo (QTT) pode ser incrementada através da caracterização de germoplasma disponível, com o uso de testes específicos para qualidade tecnológica e a identificação de genes envolvidos com características de interesse. Deste

modo, é possível a seleção de cultivares adequadas a cada uso final em menor tempo, garantindo a aceitabilidade e o sucesso da nova cultivar.

A maioria dos estudos sobre a associação das combinações alélicas de HMW-GS com a aptidão tecnológica do trigo foi e vem sendo realizados no exterior. A interação genótipo x ambiente (GxE) é um fator determinante na expressão do fenótipo de uma cultivar. Contudo, combinações alélicas conhecidas, baseadas em estudos internacionais, para uma boa qualidade para panificação, por exemplo, podem não apresentar o mesmo resultado nas condições climáticas de cultivo no Brasil.

No presente trabalho foi testada a hipótese de que se determinadas HMW-GS influenciam a QTT e a GxE é um fator determinante na expressão do fenótipo de uma cultivar, poderiam haver combinações com melhor desempenho para as condições climáticas do Brasil. E, ainda foi testada uma segunda hipótese, se o uso de marcadores moleculares de DNA para a identificação dos alelos de HMW-GS é eficiente para acelerar o processo de seleção de um genótipo.

Para isso, é necessário conhecer: as frequências de HMW-GS em acessos de trigo encontrados no país; os alelos de HMW-GS que estão associados com qualidade tecnológica de trigo; e se o uso de marcadores moleculares para a caracterização das HMW-GS é eficiente.

Deste modo, o objetivo geral do trabalho foi:

Caracterizar, quanto ao perfil de HMW-GS, uma coleção com 274 acessos de trigo de diferentes países e avaliar a sua relação com os parâmetros de QTT.

Os objetivos específicos foram:

Descrever o perfil de 274 acessos de trigo quanto às HMW-GS.

Avaliar os genótipos quanto aos parâmetros de QTT.

Avaliar o uso de marcadores moleculares de DNA para as HMW-GS.

Este trabalho foi organizado da seguinte forma: a Introdução expõe a problemática, incluindo as hipóteses e os objetivos; a Revisão da Literatura, apresenta aspectos conceituais sobre o trigo e as HMW-GS, com as principais descobertas sobre o assunto ocorridas nos últimos dez anos nas principais revistas científicas da área; no Capítulo I são apresentados e discutidos os resultados sobre a caracterização de uma coleção de acessos de trigo para HMW-GS e a relação das subunidades do loco *Glu-1* com parâmetros de QTT; no Capítulo II são apresentados e discutidos os resultados das análises de marcadores moleculares de DNA para as HMW-GS; e por fim, são apresentadas as Considerações Finais e a Conclusão Geral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Trigo

O gênero *Triticum* L. possui número básico cromossômico de sete, e é constituído por várias espécies com diferentes níveis de ploidia, sendo estes diploides ($2n=2x=14$), tetraploides ($2n=4x=28$) ou hexaploides ($2n=6x=42$).

A espécie *Triticum aestivum* L. hoje cultivada, é um hexaploide constituído por três genomas A, B e D, resultante de hibridizações interespecíficas seguidas de duplicações cromossômicas entre uma espécie de trigo tetraploide e outra espécie diploide (GUPTA et al., 2008). A primeira poliploidização ocorreu entre as espécies *T. urartu* ($2n=2x=14$ cromossomos, genoma AA) e uma espécie desconhecida relacionada com *Aegilops speltoides*, dando origem a uma nova espécie com 14 pares de cromossomos, o *T. turgidum* L. ssp. *dicoccoides* ($2n=4x=28$ cromossomos, genoma AABB). O segundo evento de poliploidização foi entre o tetraploide *T. turgidum* e a espécie selvagem diploide *T. tauschii* (DD), originando então a espécie hexaploide *T. aestivum* L. ($2n=6x=42$ cromossomos, genoma AABBDD) (CHARMET, 2011).

O trigo tem como centro de origem a região do Oriente Médio, entre os rios Tigre e Eufrates. Foi uma das primeiras espécies a ser cultivada na história, cerca de 10 mil anos atrás durante a revolução neolítica, marcada pela transição da caça e da coleta de alimentos para a agricultura. As primeiras formas cultivadas foram diploides (genoma AA) e tetraploides (genoma AABB) (SHEWRY, 2009, p. 228).

A propriedade de manter as suas características de qualidade, mesmo quando armazenado por longos períodos, fez do trigo uma das culturas mais importantes no

desenvolvimento das civilizações. O trigo faz parte da dieta básica de 35% da população mundial (VOSS-FELS et al., 2015). Contém alto valor calórico com nutrientes como carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e vitaminas.

Cultivado em diferentes ambientes e regiões geográficas, o trigo tem importância econômica dando suporte a diversas ramificações industriais, contribuindo para a geração de valor agregado e de postos de trabalho (De MORI, 2015).

2.2 Importância do trigo

O trigo é o segundo cereal mais produzido no mundo ficando atrás somente do milho. Entre o período de 2009-2017 os principais países produtores foram: União Europeia, China, Índia, Rússia e EUA, representando mais de 60% da produção mundial. O rendimento dos principais produtores oscila de 47 a 160 milhões de toneladas (USDA, 2017).

O Brasil está na 17^a posição entre os países produtores de trigo no mundo. A área plantada na última safra foi de cerca de 2 milhões de hectares, tendo como estados produtores Bahia, Mato Grosso do Sul, Goiânia, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A safra nacional de 2017 alcançou a produção de 4,3 milhões de toneladas (CONAB, 2018). Na região sul do país, especialmente os estados do Rio Grande do Sul e Paraná, concentra-se cerca de 90% da produção de trigo do país, sendo a principal opção de cultivo no inverno e auxiliando na rotação de culturas (VIOLA et al., 2013; CONAB, 2017).

Para atender a demanda do mercado consumidor cada vez mais é buscada a qualidade do produto final obtido a partir do trigo. A produção grãos de trigo com elevada força de glúten (W) é fator determinante da viabilidade econômica do trigo, levando este a obter melhor preço no mercado (BAUMGRATZ et al., 2017).

A farinha de trigo tem ampla aplicabilidade na indústria de alimentos, como na panificação, produção de bolos, biscoitos e massas alimentícias. Com um total de mais

de 8 milhões de toneladas de farinha produzida no Brasil, mais de 50% destina-se a panificação, 15% para produção de macarrão, seguida pela produção de biscoito (10%), pelo de uso doméstico (10%) e outros segmentos (9%) (ABITRIGO, 2016).

É possível que sejam realizadas análises para caracterizar aspectos estruturais, de processamento e da composição química do trigo. Porém são análises físico-químicas e reológicas específicas que direcionam a aplicabilidade da farinha na indústria. Moinhos e indústrias de processamento priorizam trigo com atributos específicos de qualidade de grãos e elevado rendimento de farinha, sendo importante que essas características mantenham o padrão de qualidade a cada nova safra (MIRANDA et al., 2010; SCHEUER et al., 2011).

Para o consumidor, a boa qualidade de trigo reflete-se na produção de pães de volume elevado, cor e textura adequadas e grande valor nutritivo (GUARIENTI, 1996, p. 11). Dessa maneira, é comum constatar que o valor de uma cultura de trigo no mercado é geralmente determinado pelos atributos dos grãos, associados à qualidade de processamento (PEÑA, 2002).

De acordo com a Instrução Normativa nº 38 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de classificação do trigo brasileiro (BRASIL, 2010), três parâmetros de qualidade são considerados: força de glúten (W), estabilidade (EST) e número de queda (NQG). As classes comerciais de trigo, segundo a IN nº 38 são: melhorador, pão, doméstico, básico e outros usos, que estão apresentadas no Quadro 1. A classe comercial com a maior frequência de amostras analisadas define o enquadramento do genótipo.

Os genótipos de trigo, enquadrados em cada classe comercial, tem aplicações sugeridas, de acordo com sua aptidão tecnológica. A classe de trigo melhorador é indicada para uso em mesclas com grãos de genótipos de trigo de força de glúten mais baixa, destinados à panificação, produção de massa alimentícia seca, biscoito tipo "cracker" e pão industrial (como pão de forma e tipo *Pullmann*). A classe de trigo pão tem aptidão para a produção do pão artesanal e do pão tipo francês/d'água consumido no Brasil. Esses

grãos também podem ser destinados à produção de massa alimentícia seca, de folhados ou ao uso doméstico. A classe de trigo doméstico é destinada a produtos de confeitaria, massa instantânea, pizza, waffer e uso doméstico (pão caseiro, massa fresca, biscoito e bolo). Já a classe de trigo básico é sugerida para a produção de bolo, bolacha (biscoito doce), produtos de confeitaria, pizza, massa caseira fresca, uso doméstico e em mescla com trigo de força de glúten mais elevada. E, por fim, a classe de trigo para outros usos, que é destinada a alimentos infantis, grãos integrais em saladas, ração animal e usos industriais (produção de: gérmen e amido de trigo, glúten vital, furfural, etanol, cerveja, cola). Esta última classe engloba grãos de trigo com qualquer valor de W, mas não enquadrados em nenhuma das outras classes, por apresentarem número de queda (*Falling Number*) inferior a 200 segundos (GUARIENTI; MIRANDA, 2016; EMBRAPA, 2017).

Quadro 1 - Classificação do trigo do Grupo II, destinado à moagem e outras finalidades, segundo a Instrução Normativa nº 38 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Classe de Trigo	Força de glúten (10 ⁻⁴ J)	Estabilidade (min)	Número de queda (s)
Melhorador	300	e 14	250
Pão	220	ou 10	220
Doméstico	160	ou 6	220
Básico	100	ou 3	200
Outros usos	Qualquer	Qualquer	Qualquer

Fonte: MAPA (2010).

2.3 Qualidade tecnológica de trigo

O termo “qualidade tecnológica de trigo” está relacionado ao seu destino de uso final, ou seja, a qualidade para uso em determinado produto derivado da farinha de trigo. Para determinar as características da farinha é necessária a utilização de vários métodos, que incluem a determinação de parâmetros físico-químicos do grão e aspectos reológicos da massa de farinha de trigo. Após a avaliação conjunta destes dados é definido o destino da farinha (CALDEIRA et al., 2003).

2.4 Parâmetros físicos e físico-químicos

O peso do hectolitro é um teste que corresponde a massa de 100 litros de trigo expressa em kg/hl. Esse teste indica indiretamente a sanidade do grão, sendo influenciado pela uniformidade, forma, densidade e tamanho do grão e pelo teor de matérias estranhas e grãos quebrados da amostra (MIRANDA et al., 2010).

A dureza do grão é uma importante característica de textura, que permite a classificação do trigo e, assim, a indicação de seu uso final (BEAN, et al., 2006). Muitos fatores podem estar envolvidos na característica de dureza, como a genética do grão, condições de cultivo do cereal, época e retenção de água pelo grão. A classificação dos grãos de trigo divide-se em dois grupos, *hard* (duro) e *soft* (suave). (GUARIENTI, 1993, p. 15). Quando o grão é classificado como *soft*, sua farinha é mais leve, com coloração branca, baixo teor de glúten e menor granulometria, e é destinada para a fabricação de bolos, tortas e bolachas. Já a classificação em grão *hard*, caracteriza-se por apresentar uma farinha mais pesada, de coloração amarela, com maior teor de glúten e maior granulometria, destinada principalmente para a indústria de panificação, de macarrão e de massas em geral (SCHEUER et al., 2011).

O número de queda (ou *falling number*), avaliado através do método de Hagberg (1961) é um método físico-químico viscosimétrico que mede indiretamente o efeito da enzima α -amilase, sua atividade e também propriedades do amido da farinha durante o processo de aquecimento. Esse teste detecta possíveis danos na fase de germinação da espiga. O valor é expresso em segundos e quanto menor o tempo em segundos para a haste do equipamento cair, maior é a atividade da enzima (PERTEN, 1964). Pode ser determinado no trigo moído (peneira de 8 mm) ou na farinha de trigo (refinada).

Para realizar as análises reológicas é necessária a obtenção da farinha de trigo, ou seja, a moagem experimental dos grãos de trigo, que simula o processo que ocorre na indústria moageira, servindo como indicativo do rendimento de moagem ou da taxa de extração de farinha (MIRANDA et al., 2010).

2.5 Parâmetros relacionados ao glúten

As proteínas insolúveis da farinha de trigo, associadas à água, juntamente com grânulos de amido e sob agitação mecânica, formam uma rede proteica que retém o CO₂ produzido no processo fermentativo, denominada glúten, que confere capacidade de absorção, coesividade, viscosidade e elasticidade na massa (WIESER, 2007). O glúten é o principal determinante das características da massa de farinha de trigo.

As proteínas insolúveis, como as gluteninas, conferem características de elasticidade e as gliadinas estão envolvidas na extensibilidade da massa. Já as proteínas solúveis são necessárias no processo de fermentação por fornecerem a matéria proteica para as leveduras (GUARIENTI, 1993, p. 18; MANDARINO, 1993, p. 11).

O teste de teor de glúten baseia-se nas propriedades das proteínas funcionais do trigo em se unirem para formar a rede de glúten (VÁZQUEZ, 2012). Este teste possui os parâmetros glúten úmido e glúten seco. No glúten úmido, a medida quantitativa das proteínas formadoras de glúten é fornecida. Já o glúten seco corresponde à quantidade de água eliminada durante o processo de secagem. Deste modo o coeficiente de hidratação do glúten pode ser determinado pelo peso do glúten úmido menos o peso do glúten seco (MANDARINO, 1993, p. 18).

A microssedimentação com dodecil sulfato de sódio (MS-SDS) é um teste físico-químico baseado na precipitação das proteínas em meio ácido. Através do volume de sedimentação é estimada a força de glúten que pode ser classificada em quatro categorias: fraca ($\leq 12,0$ ml), intermediária (12,5 a 18,5 ml), forte (19,0 a 21,0 ml) e muito forte ($\geq 21,5$ ml) (MANDARINO, 1993, p. 16). A MS-SDS é um teste que tem como vantagem o requerimento de pouca quantidade de farinha (1g), o que é bastante interessante para programas de melhoramento genético de trigo, que quase sempre dispõem, em suas etapas iniciais de seleção, de pouca amostra para análise.

O volume de MS-SDS pode ser influenciado pelo ambiente, ano-safra, e suas interações com a cultivar, indicando mudanças qualitativas a nível de proteína

(MAGALLANES-LÓPEZ et al., 2017). Estudos mostram que há relações significativas entre a MS-SDS com outros parâmetros que são influenciados pelo glúten, como o tempo de desenvolvimento da massa e a dureza do grão (OELOFSE; LABUSCHAGNE; DEVENTER 2010; MA; BAIK, 2018).

2.6 Parâmetros reológicos

A massa da farinha de trigo possui propriedades reológicas que são influenciadas pela dureza do grão, granulometria e hidratação da massa. A simulação do comportamento da farinha na etapa de fermentação durante o processo de panificação pode ser mostrada através de gráficos da alveografia (GUARIENTI, 1996, p. 26).

A força de glúten (W) é um parâmetro da alveografia relacionado à maior ou menor capacidade da farinha, quando misturada à água, de suportar um tratamento mecânico. A tenacidade (P) e a extensibilidade (L) são parâmetros relacionados à expressão do equilíbrio da massa. A tenacidade refere-se à capacidade da farinha quanto à absorção de água, medindo a resistência à extensão da massa. A extensibilidade representa a capacidade de fluidez da massa sem se romper. Desse modo, juntamente com o teor de proteína, os parâmetros da alveografia P e L contribuem para a predição do volume do pão (MÓDENES et al., 2009).

A farinografia é um teste usado para avaliar as propriedades de mistura e processamento da massa de farinha de trigo. Esse teste fornece os dados sobre a capacidade da farinha em absorver água, o tempo de desenvolvimento e a estabilidade da massa (SINGH et al., 2011).

O parâmetro absorção de água (AA) avalia a quantidade de água que se deve adicionar à farinha para obter a consistência requerida. O parâmetro estabilidade (EST) fornece a medida de tolerância da massa à mistura, e também está relacionada com a força da massa (MIRANDA et al., 2010).

Parâmetros de qualidade como dureza do grão e características do glúten têm sido ligados a herança genética, principalmente pelas proteínas formadoras do glúten (LI et al., 2013; STUDINICKI et al., 2016). O bom produto final de panificação (pão) deve ter bom volume, textura interna suave e granulometria aberta. Essas características são conferidas pela capacidade de absorção de água das proteínas formadoras do glúten em associação à retenção do gás carbônico (GUTKOSKI; NETO, 2002).

Dessa forma, é de grande interesse compreender como as proteínas do trigo podem influenciar as características de QTT.

2.7 Proteínas de reserva do trigo

As proteínas de reserva do trigo estão divididas em dois grupos: as insolúveis e responsáveis pela formação do glúten, que são as gluteninas e as gliadinas que constituem aproximadamente 80% do total de proteínas do grão e as solúveis, albuminas e globulinas, que não estão relacionadas à formação do glúten. O glúten é o principal determinante das características reológicas e de panificação da farinha de trigo (SHEWRY et al., 2001b). A quantidade e a qualidade das proteínas formadoras de glúten influenciam as propriedades da farinha. Fatores agrônômicos e ambientais influenciam o teor de proteína do grão de trigo, porém, a qualidade das proteínas é uma característica genotípica (BUSHUK, 1997).

As gliadinas são proteínas monoméricas e representam um grupo heterogêneo devido a variações na sequência de aminoácidos primários, permitindo a classificação dessas proteínas em 4 subunidades, tipos α , β , γ e ω , apresentando pequenas diferenças estruturais. As ω -gliadinas contêm maior teor de prolina e glutamina na sua estrutura e menos resíduos de cisteína, evitando assim a formação de ligações dissulfídicas. As α , β e γ gliadinas apresentam menores quantidades de prolina, glutamina e resíduos de cisteína, e estão todos envolvidos em ligações dissulfídicas intramoleculares (WIESER, 2007; DELCOUR et al., 2012).

As gliadinas após a hidratação comportam-se como um líquido viscoso, devido a suas ligações intramoleculares e interações hidrofóbicas que lhe conferem baixa elasticidade. Entretanto, as gliadinas são responsáveis pela extensibilidade e coesividade da massa (GIL-HUMANES et al., 2012; KHATKAR et al., 2013).

As gluteninas são consideradas as principais determinantes da elasticidade do glúten e apresentam propriedade de resistência à extensão no processo de panificação. São proteínas poliméricas, com massa molecular entre de 100 kDa até 1000 kDa, apresentam ligações intra e intermoleculares, onde suas subunidades estão ligadas por pontes de dissulfeto decorrentes da ligação dos resíduos de cisteínas (SHEWRY et al., 1986; HOSNEY, 1994).

As gluteninas são classificadas em função da massa molecular em gluteninas de alto peso molecular (*HMW-GS, high-molecular weight glutenin subunits*), com massa molecular entre 65 e 90 kDa, e gluteninas de baixo peso molecular (*LMW-GS, low-molecular weight glutenin subunits*) com massa molecular entre 30 e 40 kDa (SHEWRY; TATHAM, 1997; KASARDA, 1999).

As LMW-GS são codificadas por genes localizados em três locos, *Glu-A3*, *Glu-B3* e *Glu-D3* (GUPTA; SHEPHERD, 1990). São classificadas como tipos B, C e D, de acordo com seu perfil de mobilidade eletroforética. A principal diferença entre os tipos é o primeiro resíduo de aminoácido que forma sua estrutura primária, que pode ser serina, metionina ou isoleucina, respectivamente (DELCOUR et al., 2012).

As LMW-GS são superiores em quantidade em relação à HMW-GS. Constituem, aproximadamente, 40% das proteínas de reserva do grão de trigo e contribuem significativamente para a força de glúten e a extensibilidade. Porém, devido a seu grande número e à sobreposição com as gliadinas em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é difícil sua correta classificação (IKEDA et al., 2008).

Já, as HMW-GS, apesar de serem componentes menores em termos de quantidade,

são importantes na determinação da elasticidade e da funcionalidade do glúten e, portanto, são fatores chave no processo de panificação (GIANIBELLI et al., 2001).

As HMW-GS são codificadas por seis genes localizados em pares nos locos *Glu-1* do braço longo dos cromossomos 1A, 1B e 1D, *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*, respectivamente. Estes genes codificam dois subgrupos de subunidades designadas como tipo x e tipo y (VERAVERBEKE; DELCOUR, 2002).

Dependendo do genótipo de trigo, pode haver 3, 4 ou 5 HMW-GS devido ao fato de que alguns desses genes são silenciados. No loco *Glu-A1*, as subunidades de tipo x são expressas enquanto que as subunidades de tipo y não se expressam. No loco *Glu-B1*, as subunidades de tipo x são sempre expressas enquanto que as subunidades do tipo y podem não ser expressas. E, no loco *Glu-D1*, ambas as subunidades são sempre expressas em todos os genótipos (PAYNE et al., 1981; PAYNE, 1987) (Quadro 2). O silenciamento de alguns dos genes pode ser causado pela presença de uma inserção do tipo transposon na região codificadora (HARBERD et al., 1986).

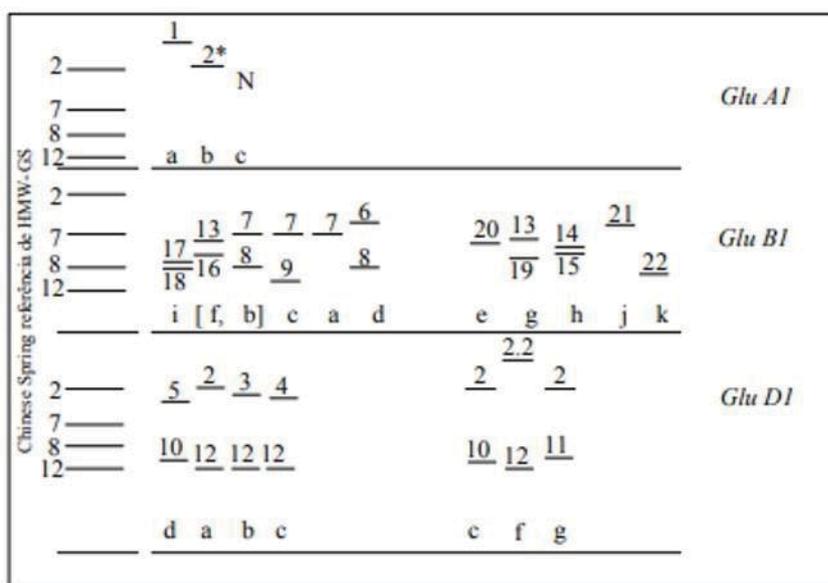
Quadro 2 – Subunidades de gluteninas de alto peso molecular tipo x e y presentes em genótipos de trigo

Locos <i>Glu-1</i>	Subunidades	
	x	y
<i>Glu-A1</i>	1Ax	-
<i>Glu-B1</i>	1Bx	1By
<i>Glu-D1</i>	1Dx	1Dy

Com o objetivo de uma uniformização mundial, Payne & Lawrence (1983) propuseram uma nomenclatura para as HMW-GS por meio de uma sequência de números em função da mobilidade eletroforética em SDS-PAGE. Esta técnica permite que variantes alélicas dos locos *Glu-1* sejam facilmente detectadas. Como as subunidades de tipo x apresentam baixa mobilidade em SDS-PAGE em relação as subunidades de tipo y, seus alelos são descritos anteriormente, com números menores, aos alelos de subunidades tipo y (KASARDA, 1989). Deste modo, os alelos do loco *Glu-1* estão divididos respectivamente em: *Glu-A1*, subunidades N (nulo), 1 e 2*; *Glu-B1*, subunidades 6+8,

7+8, 7+9, 7, 13+16, 14+15, 13+19, 17+18, 20, 21 e 22 e *Glu-D1*- subunidades 2+12, 3+12, 4+12, 2+10, 5+10, 2+11, 2.2+12. (Figura 1.) (SHEWRY, 2009, p. 254). Já os alelos gênicos são representados pelo loco seguido por letras minúsculas, por exemplo, os alelos gênicos que codificam as subunidades 1, 2* e N, respectivamente, do loco *Glu-A1* são denominados *Glu-A1a*, *Glu-A1b* e *Glu-A1c*, respectivamente.

Figura 1 – Alelos de HMW-GS, alelos gênicos e sua distribuição nos locos *Glu-1*, com relação aos às HMW-GS da cultivar de trigo Chinese Spring



Ambas subunidades, de tipo x e y, apresentam em sua estrutura um domínio repetitivo central e dois domínios repetitivos terminais (N-terminal e C-terminal) com elevado conteúdo de cisteína (GIANIBELLI, et al., 2001).

Todos os resíduos de cisteína estão localizados perto das extremidades das HMW-GS. Em contraste, o domínio central consiste de sequências repetitivas ricas em glutamina, prolina e glicina favorecendo uma estrutura mais rígida das HMW-GS (DELCOUR et al., 2012). As HMW-GS mantêm-se estáveis pelas pontes de dissulfeto a partir das ligações intra e intermoleculares dos resíduos de cisteína, sendo importante na sua estrutura, funcionalidade e na conformação das propriedades elásticas do glúten (EGELHAAF et al., 2003; OSZVALD et al., 2011). Um maior número de resíduos de

cisteína tem levado a melhor desempenho na qualidade de panificação, associando assim, a ligação das HMW-GS à QTT (PRIOZI et al., 2008; LI et al., 2015).

2.8 Combinações para qualidade tecnológica de trigo

A associação das HMW-GS com QTT já é bem documentada. Um trabalho realizado por Payne et al. (1981) avaliou a relação de HMW-GS com a qualidade tecnológica de variedades de trigo comum, na Inglaterra. Os resultados mostraram que os alelos codificadores das HMW-GS apresentam efeitos distintos sobre a qualidade da farinha. Foi observado que o loco *Glu-D1*, que produz alternativamente os pares de subunidades 5+10 (1Dx5 e 1Dy10) e 2+12 (1Dx2 e 1Dy12), estão associados a uma qualidade de panificação superior e inferior, respectivamente.

Em trabalhos subsequentes, vem sendo bem documentado que no processo de panificação a combinação dos alelos 5+10 está associada a uma força de glúten mais elevada (BRANLARD; DARDEVET, 1985; LAWRENCE et al., 1987; GIANIBELLI et al., 2001; COSTA et al., 2013). Também foi identificado o par de subunidades 5'+12 (1Dx5' e 1Dy12) que, quando presentes em um genótipo de trigo, apresentam qualidade superior em panificação (BIN-SHUANG et al., 2009), o que pode sugerir um envolvimento particular da subunidade 5' (1Dx5').

Outras combinações alélicas como o perfil N/7+8/2+12 dos locos *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*, respectivamente, foi associado à qualidade da produção de biscoitos tipo *cookie* na Argentina (MOIRAGH et al., 2013). O perfil com subunidades 1/7+9/2+12 tem sido associado com características de qualidade na produção de massas do tipo *noodle*, muito consumidas na China (JIN et al., 2013). Ambos os perfis carregam o alelo 2+12 para o loco *Glu-D1*. Mesmo não apresentando os alelos 5+10, preferível para produtos de panificação, perfis de HMW-GS com os alelos 2+12 estão associados à qualidade de diferentes produtos provenientes da farinha de trigo.

Quando avaliados individualmente, alelos do loco *Glu-B1*, como a subunidade By8 e a combinação de alelos 14+15 apresentaram massas com qualidade superior (YAN

et al., 2009; KAUR et al., 2015). No mesmo loco, os alelos 7+8 contribuem para características de produtos típicos do México como *tortillas* (TUNCIL et al., 2016). E os alelos 13+16 tem mostrado envolvimento na elasticidade e na viscosidade da massa proveniente de farinha de trigo (HERNANDEZ-ESTRADA et al., 2012).

Trabalhos realizados no Brasil, como o de Costa et al. (2013), ao avaliarem linhagens e cultivares brasileiras, observaram que os genótipos com os alelos 1 do loco *Glu-A1* e 5+10 do loco *Glu-D1* destacaram-se em relação aos demais, apresentando melhores características para a panificação. Já em outro trabalho com cultivares brasileiras, o loco *Glu-D1* foi o mais significativo em afetar características reológicas da farinha de trigo e pão. As cultivares com os alelos 5+10 apresentaram maior força de glúten, enquanto que os alelos 2+12 apresentaram menor força de glúten (COSTA et al., 2017). Para Chapla et al. (2017), avaliando genótipos nacionais e estrangeiros, aqueles com os alelos de HMW-GS 1 e 2* (*Glu-A1*), 7+8 e 17+18 (*Glu-B1*) e 5+10 (*Glu-D1*), foram os que apresentaram melhores médias para a força de glúten.

As LMW-GS também têm sido associadas com a QTT. Um trabalho realizado por Wang et al. (2016), associou a presença da subunidade *Glu-B3h* com força de glúten. Já os alelos *Glu-A3c*, *Glu-B3d*, *Glu-D3c* estão associados com a qualidade superior para viscoelasticidade da massa (JIN et al., 2013).

Em termos de participação das gluteninas para a QTT pode-se classificar as HMW-GS como fatores determinantes para a força de glúten e as LMW-GS como fatores determinantes para as características de extensibilidade da massa (RASHEED et al., 2014).

2.9 Escore para qualidade tecnológica de trigo

Por meio de um escore, Payne et al. (1987) pontuaram de 1 a 4 as combinações alélicas com base na associação encontrada com o volume de sedimentação em SDS, que é um teste baseado na precipitação das proteínas do trigo em meio ácido. Assim, considerando os três locos gênicos, um genótipo pode apresentar um escore total com pontuação mínima de 4 e máxima de 10.

Com o advento da biotecnologia e o uso de marcadores moleculares para as HMW-GS, foi identificada uma super expressão do alelo Bx7, sendo denominada de Bx7oe. Essa super expressão do alelo Bx7 combinada ao alelo By8, quando presente em um genótipo de trigo, tem mostrado características superiores para a qualidade de panificação (WRIGLEY et al., 2009, p. 597). Com isso, o escore de Payne et al. (1987) foi atualizado, conferindo-se à combinação de alelos 7oe+8 o valor de 5 pontos de escore (WRIGLEY et al., 2009, p. 598), como pode ser observado no Quadro 3.

Quadro 3 – Relação entre HMW-GS e os respectivos escores para qualidade de panificação

Escore (1)	Cromossomo/Genoma		
	1A	1B	1D
5	-	7oe+8	-
4	-	-	5+10
3	1	17+18	-
3	2*	14+15	-
3	-	13+16	-
3	-	7+8	-
3	-	7+ 9	-
2	-	-	2+12
2	-	-	3+12
1	N	20	4+12
1	-	7	2.2+12
1	-	6+8	-

(1) Determinação do escore *Glu-1* feita de acordo com Shewry et al. (2009), sendo que para a combinação 7oe+8 foi dado escore de 5, conforme Wrigley et al. (2009).

Com a nova pontuação de escores, um genótipo de trigo hexaploide pode apresentar o mínimo de 4 pontos e o máximo de 12 pontos. Como exemplo, a combinação dos alelos N/6+8/2+12 somaria 4 pontos, indicando uma menor força de glúten. Enquanto que a combinação dos alelos 2*/7oe+8/5+10, com a pontuação máxima de 12 pontos, seria caracterizado por uma maior força de glúten (Quadro 3).

Muitos estudos têm sido realizados em diferentes países reportando as frequências alélicas dos genes codificadores de HMW-GS e sua associação com qualidade de panificação (TOHVER, 2007; CARMONA, et al., 2010; ABUGLIEVA et al., 2015).

Estudos que associam os escores *Glu-1* com a qualidade de panificação no Brasil são incipientes. Em um estudo de Schuster et al. (1997), a correlação entre o escore *Glu-1* e o teste de sedimentação com SDS mostrou-se positiva. Deste modo, foram selecionados genótipos de trigo em etapas iniciais dos programas de melhoramento visando à características de qualidade de panificação. Porém, para Chapla et al. (2017), a correlação entre o escore *Glu-1* e parâmetros de qualidade de panificação, como a força de glúten (W), mostrou-se positiva e significativa somente para os genótipos que apresentavam escore com pontuação total de 10. Genótipos com pontuações menores não apresentaram correlações significativas.

Em estudo de Silva et al. (2004), com linhagens nacionais, avaliou-se a correlação entre o escore *Glu-1* e o caráter “stay-green”, responsável pelo aumento do período de permanência dos colmos e folhas verdes até o enchimento total dos grãos (WALULU et al., 1994). Os autores observaram que houve uma correlação forte de 87% entre os escores *Glu-1* e o caráter “stay-green” avaliado.

A translocação 1BL.1RS tem sido amplamente utilizada em programas de melhoramento de trigo em todo o mundo, por estar associada à resistência à doenças e pragas e a um maior potencial de produção de grãos (QI et al., 2016). A translocação 1BL.1RS, envolve o braço longo (L) do cromossomo 1 do genoma B de trigo, que é substituído pelo braço curto (S) do cromossomo 1 do centeio (R) (*Secale cereale* L.). Embora a introdução da translocação 1BL.1RS possa melhorar o desempenho agrônomo de uma cultivar, ela tem mostrado efeito negativo na força de glúten, conferindo defeitos graves na qualidade do pão, tais como tolerância de mistura fraca, viscosidade da massa superficial e baixo volume de pão (BOGGINI et al., 1998; GOBBA et al., 2008a, VÁZQUEZ et al., 2012). A causa do efeito deletério da translocação 1BL.1RS pode estar associada com a perda do loco *Glu-B3* das LMW-GS (GOBAA et al., 2008a). O braço do cromossomo 1RS contém o loco *Sec-1* responsável por codificar

a proteína de reserva α -secalina. A substituição de LMW-GS por secalinas pode estar associada à baixa qualidade de panificação. As secalinas são proteínas monoméricas, enquanto que LMW-GS do loco *Glu-3* podem formar ligações dissulfídicas intermoleculares, que é determinante para a força de glúten (SINGH et al., 1990). Além disso, as secalinas tem alta capacidade de ligação com a água, levando a características indesejáveis nas propriedades da massa da farinha de trigo (LELLEY et al., 2004).

Deste modo, quando há a presença da translocação 1BL.1RS em um genótipo de trigo são descontados três pontos quando seu escore total for de 10 a 8, dois pontos se o escore for de 7 a 5, e um ponto se o escore for de 4 ou 3 (PAYNE et al., 1987).

2.10 Marcadores moleculares de DNA

Marcadores moleculares auxiliam e aceleram o processo de seleção de um genótipo com características de interesse. A técnica denominada como SAM (seleção assistida por marcadores) caracteriza-se pela utilização de marcadores moleculares no processo de seleção, para suprir as limitações existentes no melhoramento convencional, como tempo e influência do ambiente (HE et al., 2014).

Os marcadores SNPs (*single nucleotide polymorphism*), ou polimorfismos de um único nucleotídeo, são caracterizados por alterações em uma única base nas sequências de DNA, e são a forma mais abundante de variação no genoma de plantas (EDWARDS et al., 2009). As mutações mais comuns caracterizam-se pela troca de uma purina por outra purina (adenina e guanina) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (citosina e timina). Pode ocorrer também, porém com menos frequência, a troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (CAETANO, 2009).

Entre os marcadores moleculares SNPs, o método KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*) tem sido muito utilizado devido ao baixo custo, alto rendimento e alta especificidade e sensibilidade. O método KASP é uma tecnologia baseada na PCR competitiva, para alelo específico, com a utilização da fluorescência. O DNA da amostra é amplificado em termociclador utilizando *primers* de alelos específicos. Os *primers* de

alelos específicos são ligados com corante fluorescente HEX e FAM na sua extremidade 3'. Quando o *primer* é hibridizado ao DNA, o corante emite a fluorescência correspondente. O genótipo é então detectado pela leitura de sinais fluorescentes (McCOUCH et al., 2010).

Têm sido relatados muitos estudos utilizando marcadores moleculares em trigo para diversas características morfológicas, de resistência a doenças, de qualidade tecnológica entre outras, com resultados favoráveis (BORDES et al., 2011; MACCAFERRI et al., 2015; SUKUMARAN et al., 2015; ZANKE et al., 2015).

2.11 Marcadores moleculares de DNA para HMW-GS

Atualmente, o perfil tecnológico de uma linhagem promissora só pode ser determinado em etapas avançadas do melhoramento. Análises completas para a caracterização da QTT demandam razoável quantidade de grãos (de 800 gramas até alguns quilogramas, dependendo do tipo de equipamentos e análises a serem realizadas).

O teste SDS-PAGE é muito utilizado para a caracterização do perfil de HMW-GS. Porém, este teste apresenta algumas limitações como a necessidade de obtenção de grãos (visto as proteínas de reserva serem específica e exclusivamente expressas no grão) e o fato de algumas HMW-GS terem mobilidade eletroforética similar, podendo resultar em identificação incorreta de alelos funcionalmente distintos (GIANIBELLI et al., 2002).

Primers para as principais combinações alélicas correlacionadas à qualidade tecnológica de trigo têm sido desenvolvidos, como para o loco *GluA-1* (subunidades 1, 2* e N) (BUSTOS et al., 2000). Para o loco *Glu-B1*, foram desenvolvidos marcadores que envolvem as subunidades 17+18 e 14+15, associadas a boa qualidade de panificação (XU et al., 2008) e também para o gene *Bx7oe*, que é a super expressão do alelo *Bx7* (RASHEED, 2016). Já para o loco *Glu-D1*, existem marcadores ligados a subunidades bem conhecidas, como 5+10 e 2+12 (LIU et al. 2008; WANG et al., 2016).

O loco *Glu-B1* é o mais polimórfico, sendo identificados e catalogados ao menos 20 alelos para HMW-GS em *T. aestivum*. A subunidade Bx7 é encontrada em três possibilidades de combinações de alelos: *Glu-B1a* (Bx7), *GluB1b* (7+8), e *Glu-B1c* (7+9) (PAYNE; LAWRENCE, 1983). Com a identificação de subunidades com diferença de mobilidade eletroforética e de peso molecular foram catalogadas mais três subunidades de HMW-GS no loco *Glu-B1*, *Glu-B1u* (Bx7*+By8), *Glu-B1ak* (Bx7* By8*) e *Glu-B1al* (Bx7oe+By8) (BUTOW et al., 2004; ESPÍ et al., 2012).

A subunidade Bx7oe é uma super expressão da HMW-GS Bx7. Duas cópias funcionais do gene codificam esta subunidade (LUKOW et al., 1992). Segundo a literatura, há dois fatores que levam à super expressão da subunidade Bx7: o primeiro fator trata da duplicação do gene Bx7 (BUTOW et al., 2004) e o segundo refere-se à inserção de nucleotídeos correspondentes a 43 pares de bases na região promotora (RADOVANOVIC; CLOUTIER 2003). Butow et al. (2004) argumentaram que a inserção de 43 pares de bases na região promotora não é crucial para a superexpressão da subunidade Bx7, uma vez que essa inserção foi encontrada também em genótipos expressando os alelos *Glu-B1ak* (Bx22) e *Glu-B1a* (Bx7). Para Ragupathy et al. (2008), a duplicação de genes também é determinante da super expressão da subunidade Bx7. Porém, em estudos realizados por Geng et al. (2014) concluiu-se que, além da duplicação gênica, a regulação transcricional também estaria relacionados à superexpressão da subunidade Bx7. Independentemente dos fatores determinantes para a superexpressão da Bx7, para uma correta identificação do alelo 7oe faz-se necessário o uso de marcadores moleculares de DNA específico para essa subunidade. A identificação da super expressão da subunidade Bx7 tem sido importante em programas de melhoramento de trigo, uma vez que essa subunidade pode estar associada com a força de glúten (CHO et al., 2017).

Também existem marcadores específicos para LMW-GS que envolvem genes do loco *Glu-B3* (ZHANG et al., 2011; SHARMA et al., 2013; WANG et al., 2016) e marcadores para genes que codificam as gliadinas (LI et al., 2014; SRINIVASAN et al., 2015).

Os marcadores moleculares ligados às HMW-GS têm sido desenvolvidos para facilitar a identificação de alelos muito próximos ou difíceis de serem separados por eletroforese. Em programas de melhoramento genético assistido, essas análises facilitam a identificação dos alelos de HMW-GS de modo preciso e mais rápido.

3 CAPÍTULO I

Inventário de alelos de gluteninas de alto peso molecular e análise da sua relação com a qualidade de uso final de trigo no Brasil

3.1 Resumo

O objetivo desse trabalho foi caracterizar as gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) e analisar sua relação com parâmetros de qualidade tecnológica de trigo (QTT) em uma coleção de genótipos de trigo com importância na introgressão de características de interesse pelos programas de melhoramento no Brasil. Foram avaliados 274 acessos de trigos por SDS-PAGE, sendo que para 219 acessos com homogeneidade para HMW-GS foram encontrados 53 perfis e 21 alelos. A combinação mais frequente foi 2*/7+9/5+10 (11,9%). Com base no perfil proteico de HMW-GS e na identificação da super expressão do alelo Bx7oe e da translocação 1BL.1RS através do uso de marcadores moleculares de DNA, o escore *Glu-1* foi calculado e as correlações com parâmetros de QTT foram analisadas. Os principais efeitos dos locos *Glu-1* e da 1BL.1RS foram estimados usando o algoritmo da máxima verossimilhança restrita (REML). O escore *Glu-1* mostrou correlações significativas com as análises de QTT: microssedimentação com dodecil sulfato de sódio (MS-SDS); alveografia com seus parâmetros: força de glúten (W), tenacidade (P), extensibilidade (L) e índice de elasticidade (Ie); e farinografia com o parâmetro estabilidade (EST), com valores de coeficiente de correlação (*r*) variando de 0,27 a 0,51. Os alelos 1, 7oe+8 e 5+10, localizados nos locos *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*, respectivamente, tiveram os maiores valores para W, Ie e EST. Os resultados indicaram que é necessário um ajuste no escore para os alelos do loco *Glu-A1* para as condições de cultivo no Brasil, bem como o uso de marcadores moleculares para a identificação da combinação 7oe+8.

Palavras-chave: 1. *Triticum aestivum*. 2. HMW-GS. 3. Qualidade tecnológica de trigo. 4. panificação. 5. Escore *Glu-1*.

3.2 Introdução

O trigo é um dos principais cereais produzidos no mundo, juntamente com arroz e milho, e com produção mundial de 761,3 milhões de toneladas em 2016/2017 (FAO, 2017). No Brasil, a estimativa da produção em 2017/2018 foi de 4,3 milhões de toneladas (CONAB, 2017), que atendem em cerca de 50% o consumo interno. Uma grande variedade de produtos finais é obtida na indústria de alimentos a partir da farinha de trigo. Historicamente, o melhoramento deste cereal no país esteve voltado para a seleção de

características de maior rendimento e resistência às doenças. Foi a partir dos anos 90, com a queda do subsídio do trigo pelo governo, que a qualidade tecnológica de trigo (QTT) passou a ser fator preponderante para a comercialização e, conseqüentemente, para os programas de melhoramento.

A aptidão da farinha de trigo para uso em diferentes produtos finais deriva especialmente da sua composição proteica. As proteínas de reserva constituem 50% do total de proteína do grão, e são classificadas em gliadinas e gluteninas. Estas últimas por sua vez, são classificadas em gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) e de baixo peso molecular (LMW-GS). Elas são os principais componentes do glúten, massa viscoelástica formada quando da mistura de farinha com água, e que tem relação direta com as propriedades reológicas e de panificação da farinha de trigo (MAUCHER et al., 2009). Variações na quantidade relativa e na composição de gluteninas e gliadinas tem efeitos sobre a funcionalidade do glúten, a viscoelasticidade da massa e a qualidade de uso final (DELCOUR et al., 2012).

Quantitativamente, as HMW-GS são as menos representadas (10%) entre as proteínas de reserva (BRANLARD et al., 2003). Porém, elas desempenham papel fundamental no processo de panificação, promovendo a formação de polímeros maiores que são determinantes para a força e a elasticidade do glúten (LIU et al., 2009). As HMW-GS são codificadas por seis genes situados em três locos (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*) dos braços longos dos cromossomos 1A, 1B e 1D, respectivamente. Em cada loco, há dois genes codificando para subunidades do tipo x e do tipo y. Devido ao silenciamento gênico e a variações alélicas, usualmente ocorrem de três a cinco HMW-GS em trigo, com a composição variando entre diferentes cultivares (RASHEED et al., 2014).

Com base na correlação entre subunidades específicas de HMW-GS e a qualidade tecnológica avaliada pelo teste de sedimentação com SDS foi proposto um escore para bandas individuais ou pares de bandas (PAYNE et al., 1987). O escore total *Glu-1* é calculado pela soma dos escores individuais dos alelos proteicos identificados. O cálculo do escore *Glu-1* é preconizado para a predição da QTT (e, conseqüentemente da farinha obtida) ao longo do processo de melhoramento genético.

Em cultivares de trigo, a substituição do braço longo do cromossomo 1B pelo braço curto do cromossomo 1R do centeio conferiu maior resistência a doenças e maior rendimento em grãos (ZHAO et al., 2012). Por estas razões, a translocação 1BL.1RS foi mundialmente empregada em programas de melhoramento. No entanto, materiais com a translocação são negativamente afetados quanto à qualidade de moagem (rendimento de farinha), têm reduzidos dureza de grão e volume de sedimentação, parâmetros que afetam a qualidade de uso final do trigo (ZHAO et al., 2012). Os efeitos sobre o rendimento e sobre a qualidade tecnológica podem variar dependendo da classe e do genótipo de trigo considerados. Usualmente, do escore *Glu-1* subtrai-se de 1 a 3 pontos, caso o acesso de trigo possua a translocação 1BL.1RS. Assume-se que seu efeito é tão mais pronunciado quanto maior a qualidade intrínseca do material.

A análise da variação alélica das HMW-GS pode fornecer informação tanto para a avaliação da QTT de trigo quanto da variabilidade genética do germoplasma. Neste trabalho, os objetivos foram caracterizar os alelos de HMW-GS e analisar sua relação com parâmetros de qualidade tecnológica em uma coleção de genótipos de trigo com importância na introgressão de características de interesse pelos programas de melhoramento no Brasil.

3.3 Material e Métodos

Material vegetal

Um total de 274 acessos de trigo foram obtidos junto ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo e analisados neste trabalho. Destes, 90 acessos de trigos brasileiros, 39 acessos de trigos sintéticos oriundos do CIMMYT e 145 acessos oriundos de 58 países. As cultivares Chinese Spring, Hope, Neepawa, Opata 85, Sappo, e Yecora Rojo foram também analisadas para fins de identificação dos alelos dos locos *Glu-1*.

Foram caracterizados quanto à QTT, 191 genótipos de trigo cultivados nas safras de 2010, 2011 e 2013, em Passo Fundo – RS. A colheita foi escalonada, conforme a maturação dos acessos. Os grãos colhidos foram encaminhados ao Laboratório de

Qualidade de Grãos da Embrapa Trigo para avaliação da qualidade tecnológica. Para obtenção das amostras de farinha de trigo, os grãos foram condicionados para 14% de umidade, deixados descansar por 16-24h e então moídos em Moinho Quadrumat Senior (Brabender, Alemanha), segundo método n° 26-10.02 da AACCI (2010).

Extração de proteína de reserva e eletroforese

Para a remoção das gliadinas, 20 miligramas de farinha foram tratados com solução de 50% propanol (v/v) na proporção de 5:1 (μ:mg). A mistura foi incubada a 65°C por 30 min e após centrifugação a 10.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi recuperado para análises posteriores. Este processo foi repetido duas vezes, para a remoção completa das gliadinas a fim de evitar contaminação.

Em seguida, à farinha foi acrescida 100ul de solução de 50% 1-propanol (v/v), 0,08M Tris-HCl (pH 8,0) e 1% ditioneitol (p/v). As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 30 min com agitação intermitente. Após 5 min de centrifugação a 10.000 rpm, adicionou-se ao sobrenadante 100 μl da solução de 50% propanol (v/v), 0,08M Tris-HCl (pH 8,0) e 1,4% vinylpyridina (v/v). As amostras foram incubadas a 65°C por 15 min, e centrifugadas a 10.000 rpm por 2 min. Aos extratos de gluteninas adicionou-se 1 volume de solução de 0,08 M Tris-HCl (pH 8,0), 2% SDS (p/v), 40% glicerol (v/v), 0,02% de azul de bromofenol (p/v) para aplicação em géis de poli(acrilamida) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Dez microlitros do extrato foram aplicados em gel de empilhamento com 4% acrilamida e 0,01% bisacrilamida (%T = 4%, %C=0,23%) com gel de separação com 11% acrilamida e 0,08% bisacrilamida (%T=11%, %C=0,75%). A eletroforese foi realizada por 6 horas a 20mA/gel constantes, e os géis foram em seguida corados em soluções de Coomassie Blue R250 (0,02% em TCA 10%) e G250 (0,2% em H₂SO₄ 2N, KOH 1N e TCA 12%).

Após descoloração, imagens digitalizadas dos géis foram obtidas em densitômetro (GS-800 Calibrated Densitometer, BioRad). A análise das imagens dos géis foi feita com uso do software Quantity One (Quantity One 1-D Analysis Software, version 4.6.1, BioRad).

A leitura dos perfis de HMW-GS foi feita com base no sistema de nomenclatura de acordo com Payne & Lawrence (1983).

Escore *Glu-1*

De acordo com a composição de HMW-GS foi calculado o escore *Glu-1*, com base em Shewry et al. (2009), onde atribuiu-se a pontuação máxima de 5 pontos quando encontrada a combinação 7+8. A presença da translocação do centeio foi considerada, descontando-se do escore um, dois ou três pontos se os valores estivessem entre 3 e 4, entre 5 e 7, ou entre 8 e 10, respectivamente (PAYNE et al., 1987).

Identificação de biótipos

Para se obter uma estimativa da homogeneidade dos perfis de HMW-GS, foram considerados individualmente até quatro grãos de cada acesso considerado no estudo. Para esta análise foi também levado em consideração o perfil global de LMW-GS.

Diversidade genética

O cálculo das frequências alélicas para os três locos *Glu-1* foi feito para os acessos que apresentaram composição em gluteninas homogênea. A diversidade genética de cada loco foi calculada de acordo com Nei (1973), $H = 1 - \sum p_i^2$, onde H é o índice de variação genética de Nei, e p_i é a frequência de um alelo num determinado loco.

Peso do hectolitro (PH) ou massa específica

O peso do hectolitro dos grãos de trigo foi determinado em aparelho Dalle Molle, pelo método nº 55.10.01 da AACCI (2010), sendo os resultados expressos em kg/hL.

Índice de dureza do grão

A textura dos grãos foi determinada usando equipamento SKCS - *Single Kernel Characterization System* (sistema de caracterização individual da semente), modelo 4100, da Perten Instruments, empregando amostra de 300 grãos para cada determinação, com três repetições para cada amostra, sendo considerado apenas o parâmetro índice de dureza do grão (IDG). A dureza do grão é a medida experimental da força necessária para triturar o grão de trigo.

Número de queda do grão (NQG)

O número de queda do grão de trigo foi determinado com correção de altitude (Passo Fundo, RS - 687 m) em equipamento *Falling Number*, modelo FN 1900, da Perten Instruments, sendo os resultados expressos em segundos.

Glúten

O glúten foi extraído manualmente por lixiviação da massa, formada pela farinha de trigo com água. O índice de glúten (IG) e os teores de glúten úmido (GU) e glúten seco (GS) foram determinados conforme método n° 38-10.01 da AACCI, sendo os resultados de GU e GS expressos em porcentagem.

Alveografia

As características viscoelásticas da farinha de trigo foram determinadas em alveógrafo de Chopin, modelo NG (Villeneuve-la-Garenne Cedex, França), pelo método n° 54-30.01, da AACCI. Os parâmetros do alveograma considerados foram: tenacidade (P), que mede a pressão máxima necessária para expandir a massa, expressa em milímetros; extensibilidade (L), que mede a capacidade de extensão da massa sem que ela se rompa, expressa em milímetros; força de glúten (W), que representa o trabalho de

deformação da massa, expressa em $10^{-4}J$ e índice de elasticidade ($I_e = P_{m\acute{a}x}/P_{200} \times 100$), que pode prever o comportamento reológico da massa.

Farinografia

As propriedades de mistura da massa de farinha de trigo foram determinadas em farinógrafo, marca Brabender, com cuba de 50 g, pelo método nº 54-21.01 da AACCI. Os parâmetros do farinograma considerados foram: absorção de água (AA) e estabilidade (EST).

Microssedimentação em SDS (MS-SDS)

O método de MS-SDS é baseado na precipitação das proteínas em meio ácido, ou seja, na medição do volume de sedimentação do trigo moído, após agitação com solução de SDS e ácido láctico.

O teste foi realizado de acordo com Peña et al. (1990). Para o teste de MS-SDS, foram preparadas a solução A, constituída de solução de azul de bromofenol em água destilada 0,001% ou com 10 mg/L (peso/volume), e a solução B obtida pela mistura de 17 ml de solução de ácido láctico 1:8 v/v (10 ml de ácido láctico a 85% + 80 ml de água destilada) com 480 ml de solução de dodecil sulfato de sódio 2% p/v (20g de SDS + água para completar 1 L). Em cilindro graduado de 25 mL com tampa, contendo 1 g de farinha de trigo foram adicionados 6 ml da solução A e realizada agitação manual para umedecer completamente a amostra (cerca de 10 segundos). O cronômetro foi acionado, e a mistura foi agitada nos tempos de 2,40 e de 4,45 minutos. Em seguida, foram adicionados 19 ml da solução B. O frasco foi deixado sob agitação oscilatória por um minuto (35 a 45 ciclos/minuto). E, após repouso de 14 minutos (isto é, até 20 min do início), foi feita a leitura do volume de sedimentação, com aproximação de 0,5 ml.

Extração de DNA e uso de marcadores moleculares

Foi realizada a extração de DNA e o uso de marcadores moleculares nos acessos de trigo para a identificação da super expressão do alelo 7oe do loco *Glu-B1* e a presença da translocação 1BL.1RS.

Para a extração de DNA as folhas foram coletadas de todos os genótipos (~ 40 mg), transferidas para uma placa de 1,2 ml de 96 poços de fundo redondo contendo três esferas de aço inoxidável (2,3 mm de diâmetro) e trituradas com 0,8 ml de tampão de extração (Tris-HCl 1 M pH 8,0, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM, CTAB 2% p/v, DTT 0,16% p/v) em um Mini Bead-Beater (Biospec Products) durante 4 minutos e incubadas a 65°C com agitação durante 90 minutos.

A placa foi centrifugada durante 15 minutos à temperatura ambiente a 3700 rpm, e 0,5 ml da fase superior foram transferidos para uma nova placa de 2,2 ml de 96 poços quadrados, contendo 0,25 ml de clorofórmio: álcool isopropílico (24:1), que foi agitada durante 15 minutos em um vortex. A placa foi centrifugada durante 30 minutos à temperatura ambiente a 3700 rpm e 0,35 ml da solução aquosa foram transferidos para uma nova placa de 2,2 ml de 96 poços quadrados. O DNA foi precipitado adicionando-se 0,15 ml de acetato de amônio (7,5 M) e 1,0 ml de etanol absoluto (-20°C). A placa foi agitada durante 15 minutos num vortex e centrifugada durante 20 minutos a 3700 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 0,7 ml de etanol a 70% sob agitação num vortex por 15 minutos. Em seguida, a placa foi centrifugada a 3700 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi seco a temperatura ambiente e dissolvido em 0,1 ml de TE + RNase (Tris -HCl 10 µl pH 8,0, EDTA 1 µl, 15 µg/µl de RNase). As amostras foram incubadas a 37°C por 1 h e, em seguida, armazenadas.

A quantificação do DNA foi realizada com o Quant-IT® PicoGreen Kit (Life Technologies) e a concentração do DNA foi padronizada para 25 ng/µl utilizando Tris 10 mM.

Para a identificação do alelo 7oe do loco *Glu-B1* foi usado um marcador STS (Quadro 4) pela metodologia descrita por Butow et al. (2004). A análise desse marcador foi realizada pela equipe do laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo.

Quadro 4 – Relação dos *primers* usados para análise de DNA

<i>Primers</i>	Caractere	Alelo FAM	Alelo HEX	<i>Primer</i> Comum	Referência
7OE_866	<i>Glu-B1</i> (7oe)	GTGGAAT ATTAGTG ATGGCGT GAG	GTGGAATA TTAGTGAT GGCGTGAC	TTCTTCTCTCGT TGGCCTTATCG C	Butow et al. (2004)
wMAS000011	1BL.1RS	GGAGCA GGTCCAG ATCGCG	CGGAGCAG GTCCAGAT CGCA	GAAGCTCCGGT AGATGGAGGCT A	Rasheed et al. (2016).

Para a identificação da translocação 1BL.1RS, foi usado um marcador do tipo SNP pelo método KASP (Quadro 4). O ensaio KASP consiste no uso de cinco *primers*. Dois deles são específicos ao polimorfismo SNP da espécie estudada, localizado na extremidade 3', e que são acrescidos de caudas padrão FAM (5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT- 3') ou HEX (5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT- 3') na extremidade 5', e um terceiro primer comum. Além desses, no kit KASP há dois *primers* marcados com os fluoróforos FAM e HEX, com sequências idênticas às caudas descritas anteriormente.

Os *primers* utilizados foram preparados formando um mix composto por 30 µl de *primer* comum, 12 µl do primer com HEX, 12 µl do primer com FAM e 46 µl de água MilliQ. Para cada reação é utilizado solução com 2 µl de KASP 2X Master Mix e 0,056 µl do mix preparado anteriormente. Os ensaios foram realizados em placas de 384 poços (MicroAmp Applied Biosystems). Para cada reação foram utilizados 2 µl de DNA e 2 µl da solução de primer mais KASP.

A PCR foi realizada em termociclador Veriti 384-well da Applied Biosystems. A PCR foi realizada utilizando-se o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C durante 15 minutos; dez ciclos de desnaturação (94°C durante 20 segundos) e anelamento/extensão (65-57°C por 60 segundos, com redução de 0,6°C por ciclo); 26

ciclos de desnaturação (94°C durante 20 segundos) e anelamento/extensão a 57°C por 60 segundos). Após o término dos ciclos, as amostras foram resfriadas a 10°C.

Após a PCR, as placas com as reações foram submetidas à leitura no Fluostar Omega BMG e os dados foram analisados usando macros presentes na planilha Excel assayauditor disponibilizada pela Millipore com o kit Amplifluor SNP HT Genotyping System (<http://millipore.com/userguides/tech1/mcproto177>).

A detecção da presença da translocação 1BL.1RS foi feita através da amplificação do alelo HEX, e a ausência da translocação foi detectada pela amplificação do alelo FAM.

Análise estatística

A análise de correlação de Pearson foi realizada entre os parâmetros de QTT e os valores do escore *Glu-1*. A abordagem Box-Cox foi usada para transformar os dados dos parâmetros: W, P, P/L, PTG, IDG e EST, que não apresentaram distribuição normal (Anexos – Tabela 8). Os principais efeitos das diferentes subunidades dos locos *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* e da translocação 1BL.1RS foram estimados usando o algoritmo de máxima verossimilhança restrita (REML) do pacote estatístico GENSTAT V. 19 (Payne et al., 2011). Os efeitos do ano e da interação loco x ano também foram estimados. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com número de repetições desbalanceadas.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Alelos e escore *Glu-1*

Duzentos e setenta e quatro acessos de trigo foram caracterizados quanto às HMW-GS. Destes, 226 acessos (83,6%) apresentaram homogeneidade de perfil de HMW-GS e de LMW-GS, quando considerados grãos de diferentes plantas (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição de gluteninas de alto peso molecular dos genótipos de trigo

(Continua)

Perfil			Escore <i>Glu-1</i>	Frequência (%)	Nº de genótipos	Genótipos de trigo
<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>				
1	13+16	2+12	8	0,9%	2	IAC 5, PF 87849
1	13+16	5+10	10	0,5%	1	INIA F 66
1	14+15	2+12	8	0,5%	1	GALEGO RAPADO
1	17+18	2+12	8	0,5%	1	HARTOG
1	17+18	5+10	10	1,4%	3	EMBRAPA 42, PF 980270, Trigo BR 18-Terena
1	6+8	5+10	8	0,5%	1	KARAKOLTOK-A
1	7+8	2+12	8	2,7%	6	JANZ, Malgorzatka Udy, Montjoie, NORIN 10 (CI 012699), T 50130, YUNG KWANG
1	7+8	5+10	10	1,8%	4	ANAHUAC 75, AUS 14113, EMBRAPA 10, RL 4137
1	7+9	2+12	8	1,8%	4	BRS GUABIJU, BRS TIMBAUVA (825507), KE FENG 2, TRIGO CHAPÉU
1	7+9	5+10	10	5,0%	11	BALKAN, BRS 207, HAR 604, Hesbignon, IPF 64732, KLEIBER, LOHMANN'S WEENDER GALIZISCHER KOLBEN, Marquis, NING 84 N 1406, RELIN, SICCO
1	7oe	2+12	6	0,9%	2	Dreadnought, Peragis I
1	7oe+8	2+12	10	1,4%	3	AC VISTA, KLEIN ATLAS, PF 93157
1	7oe+8	5+10	12	0,9%	2	EMBRAPA 22, ESTANZUELA DORADO
2*	13+16	2+12	8	5,0%	11	ABURAKOMUGHU, BET DAGAN 131, COLÔNIAS, FRONDOSO, IAC 24 TUCURUI, IPF 64768, JESUITA, LAGOA VERMELHA, MIRONOVSKAJA JUBILEINAJA 50, OPATA 85, PF 89326
2*	13+16	5+10	10	0,5%	1	CIGM921666
2*	17+18	2+12	8	1,8%	4	PF 010161, PF 9052, PF 93159, SIETE CERROS
2*	17+18	5+10	10	2,3%	5	Antizana SIB, BRS 194, PAMPEANO INTA, PF 040183, PILANCHO 80
2*	6+8	1.5+12		0,5%	1	CIGM93298

Tabela 1 – Composição de gluteninas de alto peso molecular dos genótipos de trigo

(Continuação)

Perfil			Escore <i>Glu-1</i>	Frequência (%)	Nº de genótipos	Genótipos de trigo
<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>				
2*	6+8	2+12	6	2,3%	5	CIGM93225, PF 87451, PF 90134, RUMINAHUI, SPRINGFIELD
2*	6+8	2+12.2		0,9%	2	CIGM921696, CIGM921698
2*	6+8	5+10	8	0,9%	2	Likafen, PF 781198
2*	7+8	2+12	8	5,5%	12	BRS UMBU, CRUZA 0454, GIZA, Hindi 62, Mania 43, PARAGUAI 281, PF 92393, PF 92482 (825518), PF 990522, SYRIMEX, Trigo BR 35, TRINTECINCO
2*	7+8	5+10	10	3,2%	7	BRS 179, BRS 49, MENCEKI, PF 022203, PF 9099, PI 181337, Rafaela Mag
2*	7+9	2+12	8	6,8%	15	BRS ANGICO, BRS GUAMIRIM, CAILLOUX, CNT 10, EMBRAPA 27, G 1179 37, HUANCA, MAYA 74, OR 1 (825535), PF 010069, PF 940110, PF 980078, SNOGG, SONALIKA, Trigo BR 33-Guará
2*	7+9	5+10	10	11,9%	26	1855 83, ARIANA 66, ATLAS 66, BRS 177, CEP 24 (825601), CBFusarium ENT014, DOBRUDZHA, EAGLE, FB 4200, GIGAS 1381, IPR 84, KENYA FARMER, Martonvasari 4, MELCHIOR, NEEPAWA, ÔNIX, PF 030019, RL 6004, RL 6009(LR 18), RL 6010(LR 9), RL 6043(LR 21), RL 6044(LR 22A), RL 6114, SAFIRA, SHANGHAI, Trigo BR 24
2*	7oe	2+12	6	1,8%	4	GRANAROLO, PELADINHO, PF 93158, TRIO
2*	7oe+8	2+12	10	2,7%	6	AGATHA, BRS 220, EMBRAPA 16, KLEIN LUCERO (825635), PF 926, TOROPI
2*	7oe+8	5+10	12	0,9%	2	ALTAR SIB, BUCK PONCHO
N	20	1.5+?			1	CIGM93306
N	20	2+?			1	CIGM93271

Tabela 1 – Composição de gluteninas de alto peso molecular dos genótipos de trigo

(Continuação)

Perfil			Escore <i>Glu-1</i>	Frequência (%)	Nº de genótipos	Genótipos de trigo
<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>				
N	20	2+12	4	0,5%	1	CIGM93268
N	20	3ou4+10			1	CIGM89538 0Y
N	13+16	2+12	6	0,9%	2	CHHOTI LERMA, Villaverde de Trucios
N	13+16	2+12.2		0,5%	1	M6 SYNTHETIC
N	14+15	1.5+12		0,9%	2	CASW94Y00054S, CIGM93406
N	14+15	1.5+12.2		0,9%	2	CIGM921682, CIGM93395
N	14+15	2+12.2		0,5%	1	CIGM93305
N	17+18	2+12	6	1,8%	4	BUL BUL, PF 020450, PUSA 62, SONORA
N	17+18	5+10	8	2,7%	6	ALONDRA SIB, CIGM93403, PF 9127, PF 973443, SEBAKWE, Trigo BR 32
N	6+8	1.5+?			1	CIGM93302
N	6+8	1.5+12		1,4%	3	CIGM921706, CIGM93267, CIGM93294
N	6+8	1.5+12.2		0,9%	2	CIGM90896, CIGM93205
N	6+8	2.1+10		0,5%	1	CIGM921713
N	6+8	2+10		0,9%	2	CIGM921849, CIGM93177
N	6+8	2+10ou12			1	CIGM921629
N	6+8	2+12	4	3,2%	7	ATLE, CIGM90892, CIGM921702, CIGM921712, Fenman, PANSAR III, PRIMUS
N	6+8	3+10		0,5%	1	CIGM921701
N	6+8	3ou4+10			2	CIGM881351_0B, CIGM90909
N	6+8	5+10	6	0,5%	1	PONCHEAU
N	7+8	1.5+12		0,9%	2	CIGM921680, CIGM93242
N	7+8	2.2+12	5	0,5%	1	SAIKAI 165
N	7+8	2+10		0,5%	1	CIGM93200

Tabela 1 – Composição de gluteninas de alto peso molecular dos genótipos de trigo

(Conclusão)

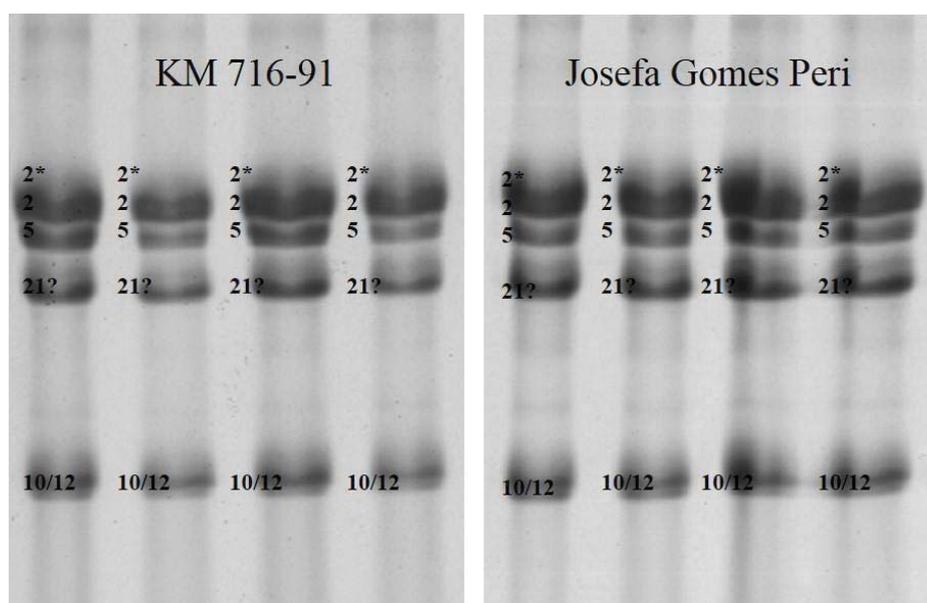
Perfil			Escore <i>Glu-1</i>	Frequência (%)	Nº de genótipos	Genótipos de trigo
<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>				
N	7+8	2+12	6	9,6%	21	BAGDAD, CHINESE SPRING, CIGM93244, CIGM93275, COTIPORÃ, FENG MAI 11, FRONTANA, GW 3, KARAMU, Morisco, NOBEOKA BOZU, NYU BAY, PATRIARCA, PHABING, Rashid, Sardah, SCHROEDER, SUMAI 3, TRANSFER, VEZHEN, WIEBE G A 18-3
N	7+8	3+10		0,5%	1	CIGM93266
N	7+8	5+10	8	1,4%	3	AFRICA 43, NARINO 59 (825562), W 185
N	7+9	2+12	6	1,8%	4	BRS LOURO, Diamant, ERYTHROSPERMUM LWOWIA, ZENITH
N	7+9	5+10	8	1,4%	3	KAVKAZ, PROBSTDORFER EXTREM, SILVANA
N	7oe	2+12	4	0,5%	1	CAMA
N	7oe+8	2+12	8	0,9%	2	BRS CAMBOATA, Novosadska Rana 1
				Total	226	

Dois genótipos avaliados, KM 716-91 e Josefa Gomes Peri, foram identificados como heterozigotos no loco *Glu-D1*, apresentando tanto os alelos 2+12 quanto 5+10. Em função de algumas subunidades de HMW-GS serem silenciadas, um genótipo de trigo pode apresentar 3, 4 ou 5 bandas em gel de SDS-PAGE (PAYNE et al., 1981; PAYNE, 1987). Se um genótipo apresenta, a partir da análise de grãos individualizados, mais de cinco bandas de HMW-GS, é indicativo de que os locos gênicos não estão em homozigose. A Figura 2 mostra os genótipos KM 716-91 e Josefa Gomes Peri, com as subunidades 2+12 e 5+10 para o loco *Glu-D1* no mesmo grão.

Outro caso a se destacar na Figura 2 seria o da possibilidade da presença da subunidade Bx21. Segundo a nomenclatura das HMW-GS proposta por Payne et al.

(1983) no loco *Glu-B1* somente as subunidades Bx7, Bx20, Bx21 e Bx22 podem aparecer sem a presença também de uma subunidade de tipo y. Devido a sua posição em SDS-PAGE a banda visualizada poderia ser a subunidade Bx21. As cultivares KM 716-91 e Josefa Gomes Peri foram lançadas em 1991 e em 1989, respectivamente, e seus perfis de HMW-GS não foram descritos na literatura. Por esse motivo, não se pode afirmar com certeza qual é a subunidade codificada pelo loco *Glu-B1* para essas cultivares. A subunidade Bx21 é de rara ocorrência em acessos de trigo, tendo sido reportada em países do continente asiático (VAPA 1989; WANG, 1993).

Figura 2 – SDS-PAGE de gluteninas de alto peso molecular de acessos de trigo com heterozigose do loco *Glu-D1*, com a presença simultânea dos pares de subunidades 2+12 e 5+10



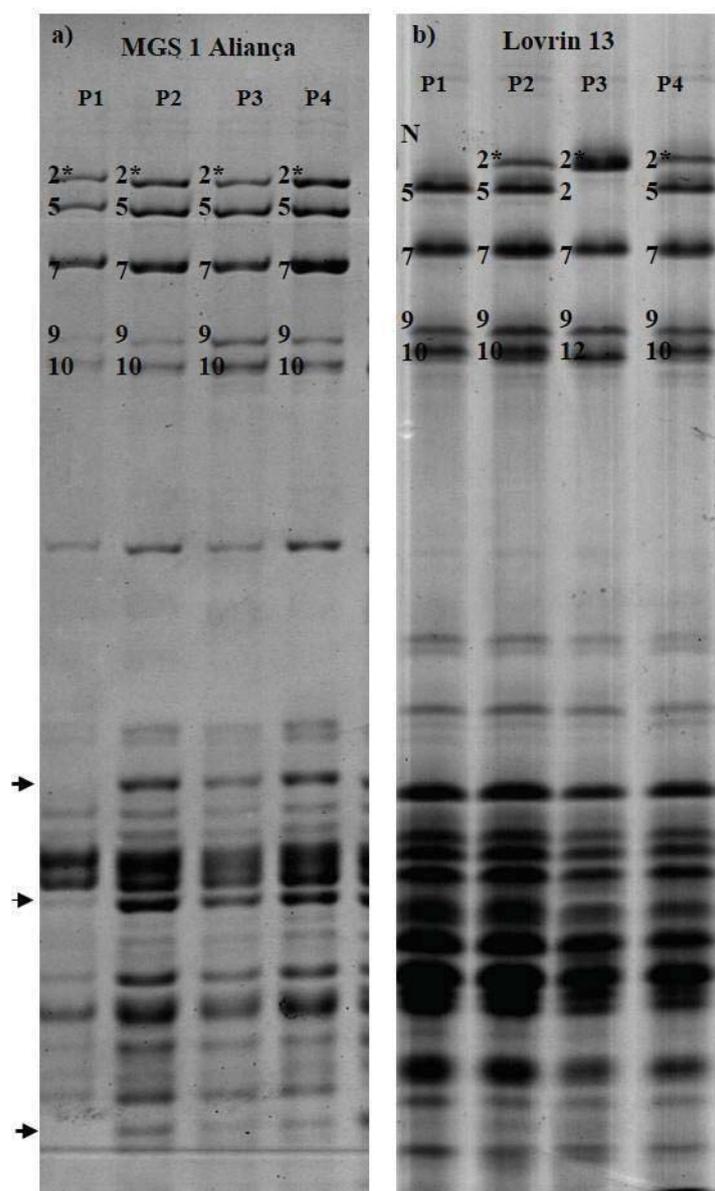
Nove acessos, apesar de apresentarem homogeneidade quanto à HMW-GS, tiveram diferenças quanto ao perfil de LMW-GS. Onze acessos apresentaram situação inversa, heterogeneidade para HMW-GS e homogeneidade para LMW-GS (Tabela 2). A Figura 3 mostra a cultivar MGS1 Aliança com o perfil das quatro plantas individuais analisadas, mostrando homogeneidade para HMW-GS e heterogeneidade para LMW-GS,

e a cultivar Lovrin com heterogeneidade para HMW-GS, e perfil homogêneo para LMW-GS.

Tabela 2 – Genótipos com diferenças de perfil de gluteninas de alto e de baixo peso molecular entre plantas

Acessos	Perfis de HMW-GS	Perfis de LMW-GS
MGS_1_ALIANÇA	igual	diferente
BH 1146	igual	diferente
Curzio	igual	diferente
Karl	igual	diferente
Londrina	igual	diferente
PAT 7392	igual	diferente
PEKING 8	igual	diferente
PF 940077	igual	diferente
WRT 238-5	igual	diferente
COLONISTA	diferente	igual
LOVRIN_13	diferente	igual
NOVOSIBIRSKAYA_67	diferente	igual
SW_89_2089	diferente	igual
ZAMBEZI	diferente	igual
CD 105	diferente	igual
ANGAS	diferente	igual
MAINTEN INIA	diferente	igual
PRECOZ PARANÁ INTA	diferente	igual
WW_9941	diferente	igual
RS_1_FENIX	diferente	igual

Figura 3 – SDS-PAGE de gluteninas das cultivares de trigo MGS 1 Aliança e Lovrin



Nota: A Figura 3a) mostra imagem de SDS-PAGE de gluteninas de plantas com homogeneidade de perfis de HMW-GS e heterogeneidade de perfis de LMW-GS (setas).

A Figura 3b) mostra imagem de SDS-PAGE de gluteninas de plantas com heterogeneidade de perfis de HMW-GS e homogeneidade de perfis de LMW-GS.

Os 26 acessos restantes apresentaram diferenças tanto em HMW-GS quanto em LMW-GS (Tabela 3). A presença de vários biótipos é frequentemente observada em acessos de cultivares antigas ou landraces (PIERGIOVANNI, 2013; ORMOLI et al.,

2015), indicando a conservação da heterogeneidade típica desses materiais ao longo do tempo. Considerando coleção de cultivares europeias obsoletas, a heterogeneidade de perfil de gluteninas foi observada para 72% das amostras (GREGOVÁ et al., 2004). Esta variabilidade genotípica do acesso já foi relatada no caso de cultivares de diferentes países, inclusive do Brasil, onde na análise de 211 acessos de trigo, 177 (83,9%) apresentaram uniformidade de perfil de HMW-GS e de LMW-GS e 34 (16,1%) dos acessos restantes apresentaram alguma diferença de perfil de HMW-GS e/ou de LMW-GS (VANCINI et al., 2016).

Tabela 3 – Composição de biótipos de HMW-GS e de LMW-GS de genótipos de trigo

(Continua)

Genótipos de trigo	Locos			Biótipos de HMW-GS	Biótipos de LMW-GS	Frequência (%)
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>			
AMIGO	2*	7+9	5+10	A	a	0,75
	2*	17+18	5+10	B	b	0,25
ANGAS	2*	7+8	2+12	A	a	0,50
	2*	7+9	2+12	B	a	0,25
BRS 208	2*	7+9	5+10	C	a	0,25
	1	7+9	2+12	A	a	0,25
	1	7+9	2+12	A	b	0,25
	1	17+18	5+10	B	c	0,25
BRS 209	1	7+8	2+12	C	d	0,25
	1	7+8	5+10	A	a	0,75
CD 105	2*	7+9	2+12	B	b	0,25
	1	7+8	5+10	A	a	0,75
COLONISTA	1	7+9	5+10	B	a	0,25
	2*	13+16	2+12	A	a	0,50
EMBRAPA 40	2*	7+8	2+12	B	a	0,50
	N	17+18	5+10	A	a	0,67
FLEISCHAMANN 481	2*	13+16	5+10	B	b	0,33
	2*	7+9	2+12	A	a	0,50
	2*	8	2+12	B	b	0,25
	1	7+9	2+12	C	c	0,25

Tabela 3 – Composição de biótipos de HMW-GS e de LMW-GS de genótipos de trigo

(Continuação)

Genótipos de trigo	Locos			Biótipos de HMW-GS	Biótipos de LMW-GS	Frequência (%)
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>			
FUNDACEP 30	1	13+16	2+12	A	a	0,50
	1	13+16	2+12/5+10	B	b	0,25
	2*	13+16	5+10	C	c	0,25
IAS 20	N	7+8	2+12	A	a	0,50
	2*	13+16	2+12	B	b	0,25
	2*	7+8	2+12	C	c	0,25
IPF 71349	N	7+9	5+10	A	a	0,75
	2*	7+9	5+10	B	b	0,25
IPR 85	1	17+18	5+10	A	a	0,75
	2*	17+18	5+10	B	b	0,25
ITAPUA 25	2*	7+9	5+10	A	a	0,75
	2*	7+9	2+12	B	b	0,25
JACUI	N	7+8	2+12	A	a	0,50
	N	7+8/17+18	2+12	B	b	0,25
	2*	7+9	2+12	C	c	0,25
LOVRIN 13	2*	7+9	5+10	A	a	0,50
	N	7+9	5+10	B	a	0,25
	2*	7+9	2+12	C	a	0,25
MAITEN INIA	2*	17+18	5+10	A	a	0,67
	2*	17+18	2+12	B	a	0,33
MOROCCO	2*	17+18	2+12	A	a	0,67
	1	17+18	5+10	B	b	0,33
NOVOSIBIRSKAJA 67	1	7+8	2+12	A	a	0,50
	2*	7+8	2+12	B	a	0,50
PF 010255	N	17+18	5+10	A	a	0,50
	2*	17+18	5+10	B	b	0,25
	2*	17+18	5+10	B	c	0,25
PF 020458	N	13+16	5+10	A	a	0,50
	N	7+8	2+12	B	b	0,25
	N	17+18	2+12	C	c	0,25
PF 89156	1	7+9	2+12	A	a	0,75
	1	7+9	5+10	B	b	0,25

Tabela 3 – Composição de biótipos de HMW-GS e de LMW-GS de genótipos de trigo

(Continuação)

Genótipos de trigo	Locos			Biótipos de HMW-GS	Biótipos de LMW-GS	Frequência (%)
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>			
PF 909	2*	7+9	2+12	A	a	0,75
	2*	17+18	2+12	B	b	0,25
PF 980354	2*	7+8	5+10	A	a	0,75
	2*	17+18	5+10	B	b	0,25
PF 990283	N	7+8	2+12	A	a	0,75
	2*	7+8	2+12	B	b	0,25
PF 990606	2*	7+9	5+10	A	a	0,50
	N	7+9	2+12	B	b	0,25
	1	13+16	2+12	C	c	0,25
PG 1	2*	13+16	2+12	A	a	0,67
	2*	7+8	2+12	B	b	0,33
PRECOZ PARANA INTA	2*	7+9	5+10	A	a	0,75
	2*	13+16	5+10	B	a	0,25
RL 6011 (LR 12)	2*	7+9	5+10	A	a	0,75
	2*	7+8	2+12	B	b	0,25
RS 1 Fênix	N	14+15	5+10	A	a	0,75
	2*	14+15	5+10	B	a	0,25
SW 89 2089	1	7+8	2+12	A	a	0,75
	N	14+15	2+12	B	a	0,25
TAMMI	N	7+9	5+10	A	a	0,50
	N	13+16	2+12	B	b	0,50
THATCHER	2*	7+9	5+10	A	a	0,50
	1	14+15	5+10	B	b	0,50
TOTA 63	2*	6+8	2+12	A	a	0,67
	2*	7+9	2+12	B	b	0,33
Trigo BR 23	N	17+18	2+12	A	a	0,75
	2*	7+8	2+12	B	b	0,25
WUHAN 3	N	7+9	2+12	A	a	0,50
	N	7+9	2+12	A	b	0,25
	2*	7+9	2+12/5+10	B	c	0,25
WW 9941	2*	6+8	2+12	A	a	0,75
	2*	6+7+8	2+12	B	a	0,25

Tabela 3 – Composição de biótipos de HMW-GS e de LMW-GS de genótipos de trigo

Genótipos de trigo	Locos			Biótipos de HMW-GS	Biótipos de LMW-GS	Frequência (%)
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>			
ZAMBEZI	N	7+9	2+12	A	a	0,75
	2*	7+9	2+12	B	a	0,25

(Conclusão)

Entre os 226 acessos com homogeneidade de perfil global de gluteninas, sete apresentaram dúvidas quanto à designação dos alelos no loco *Glu-D1*: CIGM88.1351-0B, CIGM89.538-0Y, CIGM90.909, CIGM92.1629, CIGM93.271, CIGM93.302, e CIGM93.306. Todos eles são trigos sintéticos oriundos do CIMMYT. Eles carecem de análises suplementares, e potencialmente possuem novos alelos até então não repertoriados.

Considerando os 219 acessos homocigotos, homogêneos quanto ao perfil de gluteninas, e sem ambiguidade de leitura, foram identificados 53 perfis diferentes, com um total de 21 alelos. Com a análise de 200 acessos franceses (BRANLARD et al., 2003), foram identificados 16 alelos nos locos *Glu-1*. Se considerarmos exclusivamente os 66 acessos brasileiros, 22 perfis foram identificados, com um total de 12 alelos. Os alelos 2*, 7+9 e 2+12 são os que predominam com 68,2%, 31,8% e 66,7% de frequência nos locos *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*, respectivamente. A combinação alélica mais frequente observada foi 2*/7+9/5+10 (11,9%), também relatada como uma das mais frequentes em coleção de trigos de inverno da Estônia (TOHVER, 2007).

Três alelos foram identificados no loco *Glu-A1*: 47% com a subunidade 2*, 34,2% com o alelo nulo (N) e 18,7% com o alelo 1. Em coleção de cultivares da Turquia e países europeus, Kilic et al. (2017) identificaram a presença do alelo 2* em 85,5% dos acessos e não identificaram o alelo nulo. Já em trigos avaliados em Portugal e na Espanha, os alelos apresentaram frequências similares (RIBEIRO et al., 2017). Em trigos espanhóis, o alelo nulo predominava entre landraces e cultivares antigas (57%) enquanto que nas cultivares modernas a frequência foi de 33% (SANCHEZ-GARCIA et al., 2015), similar à encontrada no presente trabalho. Esses valores refletem a relação que os alelos 1 e 2*

apresentam com parâmetros de QTT, recebendo pesos para a composição do escore superiores em relação ao alelo N.

Para o loco *Glu-B1*, foram identificados nove alelos, sendo os mais frequentes 7+9 (28,8%) e 7+8 (26,5%). Este resultado é diferente do observado para cultivares argentinas, onde foram avaliadas outras combinações, sendo a majoritária 7+8* com 35,9% (GIANIBELLI et al., 2002), com seis alelos identificados ao todo. O alelo 20 foi encontrado somente no trigo sintético CIGM93.268. Em trigos nórdicos e estonianos, as combinações dos alelos 13+16 e 17+18 foram consideradas raras (TOHVER, 2007), enquanto que no presente trabalho foram obtidas porcentagens de 8,2% e 10,5%, respectivamente.

O uso de marcador de DNA possibilitou a distinção do alelo 7oe (*GluB1a*) do 7 (*GluB1a*), que não podem ser diferenciados em SDS-PAGE. A super expressão do alelo 7oe, com maior acúmulo de proteína, tem uma influência positiva na qualidade (COOPER et al., 2016). Cultivares com esse alelo apresentam maior força de glúten com maiores tempos de mistura, maior resistência à extensão da massa e reduzida quebra de resistência (LIU et al. 2009). No conjunto dos 219 acessos considerados, 15 apresentaram a combinação 7oe+8 (com escore 5), e sete acessos apresentaram 7oe sozinha.

No loco *Glu-D1*, nove alelos foram identificados. As combinações majoritárias foram 2+12 (53,9%) e 5+10 (35,6%). Os alelos 2.1+10 e 2.2+12 foram encontrados exclusivamente em CIGM92.1713 e Saikai 165, respectivamente. A predominância dos alelos 2+12 foi observada ao serem consideradas landraces da Espanha e da Ásia (GIRALDO et al., 2010; TERASAWA et al., 2011). Já em cultivares argentinas (LERNER et al., 2009), em cultivares modernas da Espanha (SANCHEZ-GARCIA et al., 2015) e em cultivares marroquinas (HENKRAR et al., 2017), no loco *Glu-D1* são os alelos 5+10 que predominam com 94%, 77% e 85% de frequência, respectivamente. A combinação alélica 5+10 recebeu o maior escore nos trabalhos iniciais, indicando sua importância para as características de qualidade de panificação, o que pode explicar a elevada frequência relatada na literatura.

Para 194 (65 acessos brasileiros e 129 estrangeiros) dos 219 acessos homogêneos, foi possível calcular o escore *Glu-1* que foi corrigido pela presença da translocação 1BL.1RS. Os valores do escore corrigido variaram de 4 a 12, com uma média de 7,7. Em acessos brasileiros, a média foi de 7,4 e nos estrangeiros, 7,8. Nos acessos estrangeiros são os escores 8 e 10 que predominam, cada um com 29,5% da frequência, enquanto que 33,8% dos acessos oriundos do Brasil têm escore 8. Esse valor de escore condiz com a predominância tanto da combinação 2*/7+9/2+12 (40,9%), como dos alelos 2* (68,2%), 7+9 (31,8%) e 2+12 (66,7%), localizados nos locos *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*, respectivamente, que recebem escores 3, 3 e 2, respectivamente, e possuem ausência de translocação 1BL.1RS.

3.4.2 Diversidade genética

O valor médio da diversidade genética da coleção de 219 acessos avaliados para os três locos *Glu-1* foi de 0,67 (Tabela 4). Em avaliação de ampla coleção de 1139 trigos asiáticos, a diversidade genética dos locos *Glu-1* variou de 0,57 a 0,90, dependendo da região considerada (TERASAWA et al., 2011). Em trabalhos considerando tanto os locos *Glu-1* quanto os *Glu-3*, codificando para LMW-GS, foram estimados índices de 0,57 para 200 acessos franceses (BRANLARD et al., 2003), 0,59 para 119 acessos argentinos (LERNER et al., 2009), e 0,68 para 37 acessos portugueses e espanhóis (RIBEIRO et al., 2017).

Individualmente, a diversidade genética foi de 0,63, 0,81 e 0,58 respectivamente para os locos *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1* (Tabela 4). Entre os 219 acessos avaliados no presente estudo, 66 são oriundos do Brasil, 32 são trigos sintéticos oriundos do México (CIMMYT) e os demais 121 são oriundos de diferentes países. Os trigos sintéticos apresentaram maior diversidade genética no loco *Glu-D1* (0,84), seguido pelos locos *Glu-B1* (0,68) e *Glu-A1* (0,30). Nos demais acessos, a maior diversidade foi observada no loco *Glu-B1*, seguido pelos locos *Glu-A1* e *Glu-D1* (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de alelos e diversidade genética das gluteninas de alto peso molecular em acessos de trigo

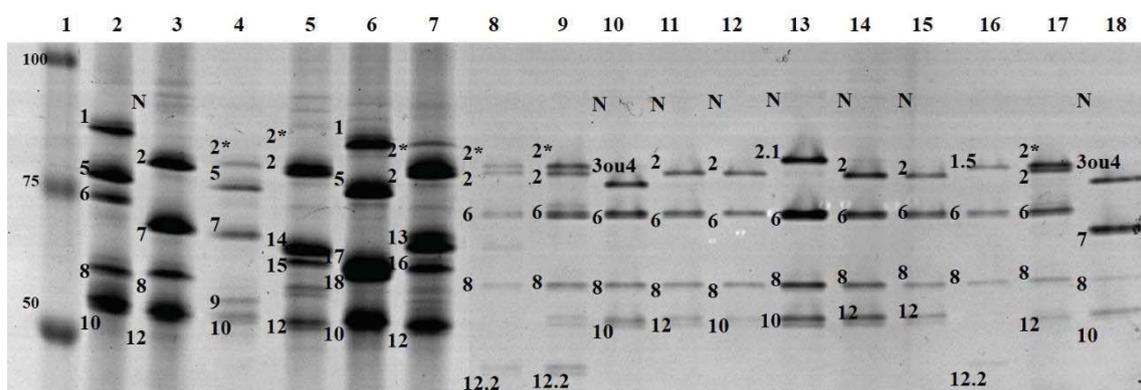
Acessos	<i>Glu-A1</i>		<i>Glu-B1</i>		<i>Glu-D1</i>		<i>Glu-1</i>
	Nº de alelos	Diversidade genética	Nº de alelos	Diversidade genética	Nº de alelos	Diversidade genética	Diversidade genética
219 acessos	3	0,63	9	0,81	9	0,58	0,67
66 acessos Brasil	3	0,48	7	0,79	2	0,44	0,57
32 trigos sintéticos	2	0,3	7	0,68	8	0,84	0,61
121 demais países	3	0,65	8	0,76	3	0,5	0,64

3.4.3 Trigos sintéticos

Trigos sintéticos são oriundos do cruzamento entre espécies tetraploides (genomas AABB) – *T. diccocom* ou *T. durum* com uma espécie diploide, principalmente *Ae. tauschii* (genoma DD). Os híbridos triploides produzidos (ABD) são estéreis. Para a restauração da fertilidade é necessário a duplicação dos cromossomos que produz um anfiploide, resultando na síntese artificial do trigo hexaploide. Os trigos sintéticos representam um produto novo, com o genoma da espécie afim tornando-se disponível por ser mais facilmente cruzado com a forma cultivada (CARDOSO, 2007).

Dos 39 trigos sintéticos estudados, 23 apresentaram alelos diferentes dos já comumente reportados (Figura 4). Trigos sintéticos são caracterizados pela alta diversidade genética, trazendo novos alelos e genes que podem apresentar características de interesse (RASHEED et al., 2012).

Figura 4 – SDS-PAGE de gluteninas de alto peso molecular de trigos sintéticos



Nota: No sentido da esquerda para direita 1, marcador de massa molecular (BioRad, número de catálogo 4110028); 2-7: cultivares internacionais usadas como referências para designação das HMW-GS; 2: Hope; 3: Chinese Spring; 4: Neepawa; 5: Sappo; 6: Yecora Rojo; 7: Opata 85; 8-18: trigos sintéticos; 8: CIGM92.1696; 9: CIGM92.1698; 10: CIGM92.1701; 11: CIGM92.1702; 12: CIGM92.1712; 13: CIGM92.1713; 14: CIGM92.1849; 15: CIGM93.177; 16: CIGM93.205; 17: CIGM93.225 e 18: CIGM93.266

A maior diversidade dos trigos sintéticos estudados neste trabalho foi apresentada pelo genoma D. Os alelos Dx1.5+Dy12 foram observadas em oito genótipos. A combinação Dx1.5+Dy2.12, foi observada em quatro acessos. Três acessos apresentaram os alelos Dx2+Dy12.2 e um acesso apresentou os alelos Dx2.1+Dy10. Em cinco acessos não foi possível distinguir entre as subunidades Dx3 e Dx4, pela proximidade das bandas SDS-PAGE, sendo representadas por Dx3ou4+Dy10. Em dois acessos foi possível identificar somente a subunidade 1.5 no loco *Glu-D1* (Tabela 5). Bibi et al. (2012), em um estudo com trigos sintéticos, observaram sete variantes alélicas para o loco *Glu-D1*. Entre eles, foi também observada a presença das combinações de alelos Dx2.1+Dy10, Dx1.5+Dy2.12 e Dx1.5+Dy12.

Tabela 5 – Composição de gluteninas de alto peso molecular de trigos sintéticos

(Continua)

Acesso	<i>GluA1</i>	<i>GluB1</i>	<i>GluD1</i>	Origem
CASW94Y00054S	N	14+15	1.5+12	CIMMYT
CIGM881351_0B	N	6+8	3ou4+10	CIMMYT
CIGM89538_0Y	N	20	3ou4+10	CIMMYT
CIGM90896	N	6+8	1.5+12.2	CIMMYT
CIGM90909	N	6+8	3ou4+10	CIMMYT
CIGM921680	N	7+8	1.5+12	CIMMYT

Tabela 5 – Composição de gluteninas de alto peso molecular de trigos sintéticos

(Conclusão)				
Acesso	<i>GluA1</i>	<i>GluB1</i>	<i>GluD1</i>	Origem
CIGM921682	N	14+15	1.5+12.2	CIMMYT
CIGM921696	2*	6+8	2+12.2	CIMMYT
CIGM921698	2*	6+8	2+12.2	CIMMYT
CIGM921701	N	6+8	3+10	CIMMYT
CIGM921706	N	6+8	1.5+12	CIMMYT
CIGM921713	N	6+8	2.1+10	CIMMYT
CIGM93205	N	6+8	1.5+12.2	CIMMYT
CIGM93242	N	7+8	1.5+12	CIMMYT
CIGM93266	N	7+8	3+10	CIMMYT
CIGM93267	N	6+8	1.5+12	CIMMYT
CIGM93294	N	6+8	1.5+12	CIMMYT
CIGM93298	2*	6+8	1.5+12	CIMMYT
CIGM93302	N	6+8	1.5+?	CIMMYT
CIGM93305	N	14+15	2+12.2	CIMMYT
CIGM93306	N	20	1.5+?	CIMMYT
CIGM93395	N	14+15	1.5+12.2	CIMMYT
CIGM93406	N	14+15	1.5+12	CIMMYT

Representações em figuras dos alelos de HMW-GS têm sido reportadas na literatura, porém nem todas apresentam os diferentes alelos presentes em trigos sintéticos. Com base em Payne et al. (1983) e tendo como referência os alelos de HMW-GS da cultivar Chinese Spring, cujo perfil de HMW-GS é mundialmente conhecido, uma nova figura foi elaborada com os alelos encontrados em trigos sintéticos por este trabalho (Figura 5).

Tabela 6 – Correlação de Pearson entre escore *Glu-1*, microsedimentação com SDS e parâmetros de qualidade tecnológica de trigo

	Escore <i>Glu-1</i>	MS-SDS	PH	W	P	L	P/L	IE	PTG	NQ	ID	GU	AA	EST
Escore <i>Glu-1</i>														
MS-SDS	0.36***													
PH	0.02	0.21**												
W	0.51***	0.49***	0.14											
P	0.32***	0.32***	0.15*	0.78***										
L	0.27***	0.33***	-0.09	0.24**	-0.24**									
P/L	0.05	-0.01	0.06	0.32***	0.79***	-0.68***								
IE	0.49***	0.37***	0.19*	0.79***	0.41***	0.21**	0.08							
PTG	-0.07	0.19*	-0.2**	-0.06	-0.04	0.1	-0.06	-0.16*						
NQ	0.06	0.13	0.09	0.11	0.15*	-0.09	0.16*	0	0.14					
ID	0.23**	0.24***	0.12	0.48***	0.62***	-0.11	0.45***	0.15*	-0.09	0.2**				
GU	-0.11	0.21**	-0.19**	-0.06	0	0.14	-0.05	-0.29***	0.79***	0.13	0.13			
AA	0.03	0.29***	0.09	0.36***	0.65***	-0.14	0.52***	-0.13	0.19**	0.16*	0.7***	0.38***		
EST	0.39***	0.39***	0.19**	0.71***	0.39***	0.27***	0.06	0.75***	-0.06	0.07	0.17*	-0.17*	0.01	

*** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, MS-SDS: microsedimentação com dodecil sulfato de sódio, PH: peso do hectolitro, W: força de glúten, P: tenacidade, L: extensibilidade, Ie: índice de elasticidade, PTG: proteína do grão, NQG: número de queda do grão, IDG: índice de dureza do grão, GU: glúten úmido, AA: absorção de água, EST: estabilidade.

Quanto à alveografia, houve correlação positiva do escore *Glu-1* com os parâmetros W, P, L e Ie. O valor da correlação positiva entre escore *Glu-1* e W foi de 0,51, semelhante à de estudos realizados por Kutlu et al. (2017), onde o valor encontrado foi de 0,45, e por Chapla et al. (2010) que encontraram o valor de 0,44. Esse resultado faz da caracterização da composição em HMW-GS uma prática viável e com potencial de uso para a avaliação da aptidão tecnológica de genótipos de trigo.

Para os outros parâmetros da alveografia, P (tenacidade) e L (elasticidade), a correlação positiva com o escore *Glu-1* foi de 0,32 e 0,27, respectivamente. Ambos parâmetros estão relacionados à expressão do equilíbrio da massa. Enquanto P está associada à capacidade da farinha quanto à absorção de água, L representa a capacidade de extensão da massa sem se romper. Juntos, P e L, contribuem para a predição do volume do pão (MÓDENES et al., 2009). Contudo, estes parâmetros são muito afetados pelo ambiente, como chuva e seca, durante o desenvolvimento da cultura. Não houve correlação significativa da relação P/L com o escore *Glu-1*. Ie é um parâmetro relacionado com resistência elástica e apresentou correlação positiva (0,49) com escore *Glu-1*, e elevada correlação (0,79) com W. Esses resultados indicam que o Ie está altamente relacionado com a qualidade das proteínas formadoras do glúten.

O escore *Glu-1* teve correlação positiva com EST (0,39), como no trabalho de Costa et al. (2017). No teste de farinografia, a EST é um parâmetro importante na predição da constância do desempenho dos genótipos. Ter uma elevada estabilidade da massa é um fator desejável. O parâmetro tempo de desenvolvimento da massa (TDM) prediz o ponto ótimo de energia necessária para o desenvolvimento mecânico da massa. Juntos, os parâmetros de farinografia AA, TDM e EST avaliam a qualidade de uma farinha quanto à capacidade de absorver água, tempo para essa massa se formar e para resistir durante o amassamento. Estes parâmetros são influenciados pelas proteínas do glúten, tendo sido encontradas correlações positivas com a MS-SDS em estudos anteriores (SAPIRSTEIN; SUCHY, 1999; OELOFSE; LABUSCHAGNE; VAN DEVENTER, 2010).

A MS-SDS teve correlação positiva com os parâmetros de alveografia W, P, L e Ie. Porém, da mesma forma que o escore *Glu-1*, não mostrou correlação com a relação P/L. A MS-

SDS mostrou correlação com W de 0,49. Correlações positivas têm sido encontradas em outros trabalhos, como o de Clarke et al. (2010), com 0,96 para linhagens de trigo do Canadá. Li et al. (2013) e Silva et al. (2015) obtiveram para genótipos de trigo do México correlação de 0,65 e do Brasil, 0,74, respectivamente.

As correlações positivas de MS-SDS com P e L foram de 0,32 e 0,33, respectivamente, semelhantes às correlações com o escore *Glu-1*. Houve correlações positivas de 0,19 e de 0,21 entre MS-SDS com PTG e com GU, respectivamente. Em trabalho de Dhaka & Khatka (2015), a correlação entre MS-SDS e PTG foi de 0,72 e valor semelhante de 0,25 com GU.

A MS-SDS também apresentou correlação positiva com Ie de 0,37 e com EST de 0,39. IDG apresentou correlação positiva tanto com o escore *Glu-1* como com MS-SDS com valores de 0,23 e 0,24, respectivamente. Em estudo de Costa et al. (2017) foi encontrada correlação positiva entre EST e MS-SDS, porém, não foi encontrada correlação positiva com IDG nem para o escore *Glu-1* nem para MS-SDS.

A correlação de EST com W foi de 0,71 mostrando que as proteínas do glúten influenciam significativamente as características de resistência da massa ao tratamento mecânico. As correlações positivas entre MS-SDS e parâmetros que envolvem o glúten já eram esperadas, pois o teste de MS-SDS foi significativamente influenciado pela concentração de proteínas na farinha.

No Brasil, a classificação comercial indicativa de cultivares de trigo leva em consideração os parâmetros W e EST. Apesar da aplicabilidade do escore para predição de qualidade panificativa, um terço dos genótipos brasileiros possui escore 8. Mesmo com um escore elevado (8) os valores de W e EST são baixos, visto haver com o escore *Glu-1* correlações de 0,51 e 0,39, respectivamente. Isso indica que o escore utilizado para os alelos *Glu-1* não é o mais adequado para as condições brasileiras.

3.4.5 Efeito dos locos *Glu-1*, da translocação 1BL.1RS, do ano e da interação com o ano sobre os parâmetros de qualidade tecnológica de trigo

Os genótipos de trigo foram agrupados de acordo com a composição alélica em cada um dos locos *Glu-1* (Tabela 7 e 8).

O PH, nos três locos, foi altamente influenciado pelo efeito do ano de cultivo dos trigos. Fatores ambientais como o excesso hídrico influenciam negativamente o PH (GUARIENTI, 2003). Trabalhos têm observado que não há correlação significativa entre parâmetros de QTT e PH (SCHMITID et al., 2009; SUMAR et al., 2012). Por esta razão, mesmo quando o efeito dos locos *Glu-A1* e *Glu-B1* sobre PH mostrou-se significativo, este não foi considerado como um parâmetro preditivo para as características de panificação.

Avaliando os três locos *Glu-1*, houve efeito significativo para W, P, Ie, IDG, GU e EST. Por outro lado, somente o loco *Glu-B1* teve influência sobre os valores de L, enquanto que a relação P/L sofreu influência dos locos *Glu-B1* e *Glu-D1*. Tanto o loco *Glu-A1* quanto *Glu-B1* tiveram efeito significativo sobre os valores da MS-SDS.

Para os três locos *Glu-1* e para a translocação 1BL.1RS, o efeito do ano fez-se altamente significativo sobre os parâmetros de QTT considerados. Considerando parâmetros de alveografia e de farinografia, verificou-se que o efeito do genótipo foi significativamente maior do que o efeito do ano (RAKSZEGI et al., 2008). E, especificamente sobre as variações de MS-SDS, o genótipo exerceu maior influência do que a interação genótipo x ambiente (OELOFSE; LABUSCHAGNE; VAN DEVENTER, 2010).

Tabela 7 – Análise do modelo linear misto para efeitos fixos dos locos, do ano e da interação locos x ano sobre os parâmetros de qualidade tecnológica de trigo

	GL	MS-SDS	PH	W	P	L	P/L
<i>GluA1</i>	2	21,19***	7,58***	18,68***	11,98***	1,90	2,39
Ano	2	-	50,95***	29,56***	89,38***	96,20***	97,63***
<i>GluA1</i> x ano	4	-	4,22**	0,49	0,28	0,90	0,88
<i>GluB1</i>	6	6,59***	15,88***	10,16***	6,10***	2,93**	2,34*
Ano	2	-	58,47***	32,25***	89,70***	96,95***	95,71***
<i>GluB1</i> x ano	12	-	1,27	0,72	0,60	1,76	1,26
<i>GluD1</i>	1	0,17	1,04	67,95***	31,29***	2,72	21,15***
Ano	2	-	68,17***	25,52***	79,86***	90,60***	93,88***
<i>GluD1</i> x ano	2	-	0,05	3,32*	0,07	7,28***	3,72*
1BL.1RS	1	13,13***	13,83***	5,62*	0,01	29,83***	13,54***
Ano	2	-	49,86***	27,85***	85,68***	100,77***	99,24***
1BL.1RS x ano	2	-	1,37	0,13	0,82	2,06	2,31

*** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, GL: graus de liberdade, MS-SDS: microssedimentação com dodecil sulfato de sódio, PH: peso do hectolitro, W: força de glúten, P: tenacidade, L: extensibilidade.

Tabela 8 – Análise do modelo linear misto para efeitos fixos dos locos, do ano e da interação locos x ano sobre os parâmetros de qualidade tecnológica de trigo

	GL	IE	PTG	NQG	IDG	GU	AA	EST
<i>GluA1</i>	2	23,73 ***	13,35 ***	0,59	23,82 ***	13,58 ***	19,62 ***	23,94 ***
Ano	2	3,78 *	11,83 ***	15,71 ***	10,18 ***	22,94 ***	85,13 ***	4,49 *
<i>GluA1</i> x ano	4	1,15	0,23	3,39 **	0,97	1,18	0,10	0,80
<i>GluB1</i>	6	11,47 ***	6,72 ***	4,48 ***	7,01 ***	9,58 ***	2,30 *	10,34 ***
Ano	2	3,14 *	11,15 ***	15,12 ***	10,11 ***	21,76 ***	81,56 ***	6,20 **
<i>GluB1</i> x ano	12	0,57	0,33	1,59	0,34	0,58	0,28	1,21
<i>GluD1</i>	1	159,12 ***	6,48 *	5,49 *	22,40 ***	19,41 ***	0,09	76,18 ***
Ano	2	4,51 *	7,96 ***	8,73 ***	10,70 ***	19,73 ***	71,03 ***	6,64 ***
<i>GluD1</i> x ano	2	1,55	0,48	1,29	0,33	0,41	0,07	0,12
1BL.1RS	1	0,02	0,06	11,73 ***	1,55	6,53 *	1,89	0,15
Ano	2	3,55 *	11,38 ***	15,68 ***	9,30 ***	22,32 ***	80,64 ***	4,03 *
1BL.1RS x ano	2	0,50	0,09	1,51	0,23	1,65	0,16	1,40

*** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, GL: graus de liberdade, Ie: índice de elasticidade, PTG: proteína do grão, NQG: número de queda do grão, IDG: índice de dureza do grão, GU: glúten úmido, AA: absorção de água, EST: estabilidade.

Interações significativas loco x ano foram observadas para vários dos parâmetros de QTT, os quais devem ser usados com cautela, visto sofrerem a influência do ambiente. O Ie apresentou interação significativa para os três locos *Glu-1*; enquanto que L e PTG tiveram interação significativa loco x ano para *Glu-B1* e *Glu-D1*. E ainda, *Glu-D1* x ano teve efeito significativo sobre W e sobre a relação P/L. Não houve interação entre a translocação 1BL.1RS x ano. Mesmo para parâmetros de qualidade de proteína, mais influenciados pelo genótipo, há relatos de efeito significativo do ambiente (VÁZQUEZ et al., 2012). Efeito significativo do local de plantio foi observado tanto sobre o conteúdo em proteína quanto sobre a MS-SDS (RIBEIRO et al., 2017).

3.4.6 Efeito dos alelos do loco *Glu-A1* sobre parâmetros de qualidade tecnológica de trigo

No loco *Glu-A1*, os alelos 1 e 2* são considerados como tendo o mesmo efeito sobre a qualidade tecnológica de trigo, com mesmo valor de escore. Porém, no presente trabalho os acessos apresentando o alelo 1 mostraram-se superiores àqueles com os alelos 2* e N, no que se refere a MS-SDS, W, P, IDG, AA e EST (Tabelas 9 e 10). Hernandez-Strada et al. (2014) ao verificarem os parâmetros MS-SDS, P e EST, encontraram melhores resultados para a subunidade 1 em relação à subunidade 2*. Em trabalho de Kaya & Akcura (2014), ao compararem a contribuição individual das subunidades do loco *Glu-A1*, encontraram melhores resultados para volume de sedimentação nos genótipos que continham a subunidade 1 do que os que tinham a subunidade 2*. Já Ribeiro et al. (2017) obtiveram resultados similares para acessos com os alelos 1 e 2* no que se refere a MS-SDS. Para Liang et al. (2010), não houve diferença estatística significativa entre os valores médios de W e de MS-SDS entre os acessos possuindo os alelos 1 e 2*. Já propriedades de mistura da massa revelaram-se melhores em acessos com 2* do que os com o alelo 1 (ZHENG et al., 2010). Quanto a Ie, os genótipos com alelos 1 e 2* não diferiram entre si, e tiveram médias significativamente superiores aos genótipos com o alelo N no loco *Glu-A1*. Os acessos portando o alelo N tiveram médias superiores em relação aos demais para os parâmetros PTG e GU.

Tabela 9 – Valor médio dos parâmetros de qualidade tecnológica de trigo testados para os locos *Glu*. Para os parâmetros W, P e P/L, que não apresentaram distribuição normal, foi utilizada a abordagem Box-Cox para transformar os dados

	MS-SDS	PH	W	P	L	P/L	Ie	
<i>Glu-A1</i>	1	13,30 a	79,23 a	8,894 a	2,796 a	95,76 a	-0,398 a	47,46 a
	2*	11,97 b	78,83 a	8,398 b	2,737 b	93,22 ab	-0,491 a	46,64 a
	N	10,66 c	78,03 b	8,101 c	2,735 b	89,42 b	-0,442 a	40,68 b
<i>Glu-B1</i>	13+16	12,97 (7+8)(7+9)(6+8)(14+15)	78,31 (17+18)(7+9)(14+15)(6+8)	8,697 (7oe+8)(7+8)(6+8)(14+15)	2,771 (6+8)(14+15)	96,68	-0,464 (6+8)	46,29 (7oe+8)(6+8)(14+15)
	14+15	9,11 (7oe+8)(13+16)(17+18)(7+8)(7+9)	76,08 (17+18)(7+9)(7oe+8)(7+8)(13+16)(7+8)(7+9)	7,186 (7oe+8)(13+16)(17+18)(7+9)(7+8)(6+8)	2,661 (7oe+8)(13+16)(17+18)(7+9)(7+8)(6+8)	85,64 (6+8)(7oe+8)	-0,644 (7+9)	31,71 (7oe+8)(17+18)(13+16)(7+9)(7+8)(6+8)
17+18	11,92 (7oe+8)(6+8)(14+15)	79,70 (7+8)(13+16)(14+15)(6+8)	8,579 (7oe+8)(6+8)(14+15)	2,757 (7oe+8)(6+8)(14+15)	90,44 (6+8)(7oe+8)	-0,420 (6+8)	47,78 (7oe+8)(7+8)(6+8)(14+15)	
6+8	10,14 (7oe+8)(13+16)(17+18)(7+8)(7+9)	75,55 (17+18)(7+9)(7oe+8)(7+8)(13+16)(7+8)(7+9)	8,002 (7oe+8)(13+16)(17+18)(7+9)(14+15)	2,681 (7oe+8)(13+16)(17+18)(7+9)(7+8)(14+15)	104,04 (7+8)(7oe+8)(13+16)(17+18)(7+9)(7+8)(14+15)	-0,672 (7oe+8)(17+18)(7+9)	40,36 (7oe+8)(17+18)(13+16)(7+9)(14+15)	
7+8	11,92 (7oe+8)(13+16)(14+15)	78,70 (17+18)(7+9)(14+15)(6+8)	8,307 (7oe+8)(13+16)(14+15)	2,746 (7oe+8)(6+8)(14+15)	91,85 (6+8)(7oe+8)	-0,455 (6+8)	43,56 (7oe+8)(17+18)(7+9)(14+15)	
7+9	11,76 (7oe+8)(13+16)(6+8)(14+15)	79,53 (7+8)(13+16)(14+15)(6+8)	8,385 (7oe+8)(6+8)(14+15)	2,748 (7oe+8)(6+8)(14+15)	89,57 (6+8)(7oe+8)	-0,426 (14+15)(6+8)	45,96 (7oe+8)(7+8)(6+8)(14+15)	
7oe+8	13,63 (17+18)(7+8)(7+9)(6+8)(14+15)	79,18 (14+15)(6+8)(17+18)(7+8)(7+9)(6+8)(14+15)	9,303 (13+16)(17+18)(7+9)(7+8)(6+8)(14+15)	2,816 (17+18)(7+9)(7+8)(6+8)(14+15)	102,13 (7+8)(17+18)(7+9)(7+8)(6+8)(14+15)	-0,409 (6+8)	52,33 (17+18)(13+16)(7+9)(7+8)(6+8)(14+15)	
<i>Glu-D1</i>	2+12	11,99 a	78,87 a	8,134 b	2,726 b	93,15 a	-0,513 b	41,90 b
	5+10	12,11 a	79,16 a	8,884 a	2,785 a	89,10 a	-0,344 a	51,97 a

(Continua)

Tabela 9 – Valor médio dos parâmetros de qualidade tecnológica de trigo testados para os locos *Glu-1*. Para os parâmetros W, P e P/L, que não apresentaram distribuição normal, foi utilizada a abordagem Box-Cox para transformar os dados

								(Conclusão)
	MS-SDS	PH	W	P	L	P/L	Ie	
1BL-IRS	Ausente	78,38 b	8,470 a	2,747 a	95,83 a	-0,493 b	45,14 a	
	Presente	79,59 a	8,211 b	2,748 a	82,14 b	-0,346 a	45,26 a	

MS-SDS: microssedimentação com dodecil sulfato de sódio (mL), PH: peso do hectolitro (kg/hL), W: força de glúten ($\times 10^{-4}$ J), P: tenacidade (mm), L: extensibilidade (mm), P/L: relação tenacidade/extensibilidade, Ie: índice de elasticidade (%).

Letras diferentes para o mesmo loco são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Para *Glu-B1*, alelos significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), em comparações aos pares, são indicados.

Tabela 10 – Valor médio dos parâmetros de qualidade tecnológica de trigo testados para os locos *Glu-1*. Para os parâmetros PTG, IDG e EST, que não apresentaram distribuição normal, foi utilizada a abordagem Box-Cox para transformar os dados

								(Continua)
	PTG	NQG	IDG	GU	AA	EST		
<i>Glu-A1</i>	1	386,9 a	12,87 a	29,76 b	56,89 a	1,032 a		
	2*	395,0 a	10,86 b	29,19 b	55,23 b	0,901 b		
	N	396,7 a	10,76 b	31,87 a	55,70 b	0,737 c		
<i>Glu-B1</i>	13+16	417,9 (7+9)(6+8)	11,28 (6+8)	32,88 (7+8)(7oe+8)(7+9)(17+18)	56,25 (7+8)(6+8)	0,935 (7oe+8)(14+15)		
	14+15	396,3	9,96 (7+9)(7oe+8)(17+18)	33,07 (7+8)(7oe+8)(7+9)(17+18)	55,69	0,518 (7oe+8)(17+18)(13+16)(7+9)(7+8)(6+8)		
17+18	0,856 (14+15)(13+16)(6+8)(7+8)(7oe+8)	374,3 (7oe+8)(7+9)(7+8)	11,70 (7+8)(14+15)(6+8)	27,73 (6+8)(14+15)(13+16)(7+8)	56,13 (7+8)(6+8)	1,004 (7oe+8)(7+9)(7+8)(6+8)(14+15)		

Tabela 10 – Valor médio dos parâmetros de qualidade tecnológica de trigo testados para os locos *Glu-1*. Para os parâmetros PTG, IDG e EST, que não apresentaram distribuição normal, foi utilizada a abordagem Box-Cox para transformar os dados

	PTG	NQG	IDG	GU	AA	EST	(Conclusão)
<i>Glu-B1</i>	6+8	0,860 (7+9) (17+18)	371,9 (13+16) (7oe+8) (7+9)	9,83 (7+9) (7oe+8) (17+18) (13+16)	33,38 (7+8) (7oe+8) (7+9) (17+18)	54,93 (13+16) (17+18) (7oe+8) (7+9)	0,785 (7oe+8) (17+18) (14+15)
	7+8	0,860 (7+9) (17+18)	395,0 (17+18)	10,44 (7+9) (7oe+8) (17+18)	30,22 (6+8) (14+15) (13+16) (17+18)	55,39 (13+16) (17+18)	0,853 (7oe+8) (17+18) (14+15)
	7+9	0,857 (14+15) (13+16) (6+8) (7+8)	395,3 (13+16) (17+18) (6+8)	12,13 (7+8) (14+15) (6+8)	28,79 (6+8) (14+15) (13+16)	55,8 (6+8)	0,864 (7oe+8) (17+18) (14+15)
	7oe+8	0,859 (17+18)	415,4 (17+18) (6+8)	12,03 (7+8) (14+15) (6+8)	29,29 (6+8) (14+15) (13+16)	56,09 (6+8)	1,155 (17+18) (13+16) (7+9) (7+8) (6+8) (14+15)
<i>Glu-D1</i>	2+12	0,859 a	400,1 a	10,86 b	30,45 a	55,69 a	0,799 b
	5+10	0,858 a	386,8 b	12,13 a	28,24 b	55,62 a	1,063 a
IBL-IRS	Ausente	0,859 a	398,3 a	11,29 a	30,40 a	55,60 a	0,883 a
	Presente	0,859 a	375,2 b	10,91 a	28,92 b	55,94 a	0,895 a

PTG: proteína do grão, NQG: número de queda do grão (s), IDG: índice de dureza do grão, GU: glúten úmido (%), AA: absorção de água (%), EST: estabilidade.

Letras diferentes para o mesmo loco são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Para *Glu-B1*, alelos significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), em comparações aos pares, são indicados.

Em relação aos alelos do loco *Glu-A1*, genótipos com o alelo 1 mostraram os melhores resultados para seis dos 13 parâmetros de QTT avaliados nesse trabalho, destacando a importância desse alelo. Com base nos resultados de parâmetros de QTT, a contribuição dos diferentes alelos do loco *Glu-A1* pode ser classificada como 1>2*>N. Essa mesma classificação foi sugerida em trabalhos realizados por Wrigley et al. (2009) e Li et al. (2010) ao estudarem a contribuição individual dos alelos *Glu-1* para parâmetros de QTT.

3.4.7 Efeito dos alelos do loco *Glu-B1* sobre parâmetros de qualidade tecnológica de trigo

O efeito do loco *Glu-B1* foi significativo sobre a maioria dos parâmetros de QTT, à exceção de L, relação P/L e AA (Tabelas 9 e 10). O loco *Glu-B1* contém a maior variação de alelos dos locos *Glu-1*, e estes têm sido associados a parâmetros reológicos da massa da farinha de trigo (GAO et al., 2016).

De forma geral, os alelos 7^{0e+8} e 13+16 apresentaram as maiores médias para a maioria dos parâmetros avaliados. Em acessos chineses, os melhores resultados em estabilidade e volume de sedimentação foram obtidos com a combinação 13+16, diferindo estatisticamente dos demais alelos (LI et al., 2009).

No presente trabalho, acessos com os alelos 7^{0e+8} apresentaram as maiores médias para MS-SDS, W, P, Ie e EST, diferenciando-se dos demais. Relatos anteriores apontam a associação de 7^{0e+8} com maior qualidade de glúten (LI et al., 2014) e com maior força de glúten (COOPER et al., 2016).

Quando comparada a diferença das subunidades Bx7 e Bx6, ambas combinadas com a subunidade By8, quanto a parâmetros de qualidade, a combinação 7+8 mostrou-se superior à combinação 6+8 para os parâmetros W, P, relação P/L, Ie, NQG, IDG e EST. Magallanes-López et al. (2017) ao comparem as diferenças dessas duas possibilidades de combinação com a subunidade By8, também verificaram a superioridade da combinação

7+8 para parâmetros de alveografia. Deste modo, pode-se observar um envolvimento particular da subunidade 1Bx7 em boa qualidade de panificação.

Os resultados aqui obtidos também indicaram diferença estatística entre os alelos 7+9 e 6+8 para MS-SDS, bem como para todos os demais parâmetros avaliados, exceto para a EST. Wurschum et al. (2016) encontraram valores significativamente superiores para 7+9 do que os com os alelos 6+8 para a MS-SDS. Em relação a P, L, relação P/L e Ie, a presença do alelo Bx7 mostrou-se significativo. Esses são importantes parâmetros da alveografia, indicando maior tenacidade (>L) e viscoelasticidade da massa. Grupo de linhagens do CIMMYT portando os alelos 7+9 tiveram resultados intermediários para parâmetros relacionados à força de glúten, e efeito negativo sobre a relação P/L (balanceamento do glúten) quando avaliadas para fins de panificação (LIANG et al., 2010).

Um estudo realizado por Priози et al. (2008) observou a diferença do número de resíduos de cisteína entre os alelos do loco *Glu-B1*. Foi observado que os alelos 1Bx20 e 1Bx26 tinham dois resíduos de cisteína a menos do que os alelos 1Bx7. Os autores concluíram que menor número de resíduos de cisteínas resultou em impactos negativos para a força de glúten. Gupta e MacRitchie (1994) também estudaram o efeito do número de resíduos de cisteína dos alelos do loco *Glu-B1*. O alelo 1Bx17 com maior número de cisteínas apresentou maior produção de polímeros de HMW-GS, do que o alelo 1Bx20 com menor número de cisteínas.

Os alelos 14+15, 6+8 e 17+18 não se destacaram para os parâmetros testados, apresentando as menores médias. Porém, para Gao et al. (2016) os alelos 14+15 foram os que apresentaram melhores resultados para as propriedades de viscoelasticidade. E em trabalho de Liang et al. (2010) destaca-se grupo de genótipos com a combinação 17+18 como sendo superiores para MS-SDS, PTG e para o tempo de mistura da massa.

3.4.8 Efeito dos alelos do loco *Glu-D1* sobre parâmetros de qualidade tecnológica de trigo

Foram formados dois grupos quanto ao loco *Glu-D1*, os genótipos que continham a combinação de subunidades 2+12 e os que continham a combinação 5+10.

O efeito do loco *Glu-D1* foi altamente significativo sobre W, P, relação P/L, Ie, IDG, GU e EST, e significativo para PTG e NQG. Para L, NQG, GU e AA, os acessos com os alelos 2+12 tiveram média superior, enquanto que os demais parâmetros de QTT tiveram valores superiores em acessos com os alelos 5+10 (Tabelas 9 e 10).

León et al. (2010) ao estudarem o efeito de plantas transformadas com a combinação 5+10 observaram incremento de W. Esses dados estão de acordo com a associação dos alelos 5+10 a uma melhor qualidade panificativa (VÁZQUEZ et al., 2012; LANGNER et al., 2017). O alelo 1Dx5 possui um resíduo de cisteína adicional na região adjacente ao domínio N-terminal. Essa característica favorece maiores ligações entre as microestruturas do glúten, conferindo maior força de glúten (KASSARDA, 1989; LI et al., 2016).

Houve efeito significativo do loco *Glu-D1* sobre GU, sendo que os genótipos com os alelos 2+12 apresentaram maiores médias do que os com alelos 5+10, o que corrobora com outros (HERNÁNDEZ-STRADA et al., 2014; MOHAN; GUPTA, 2015). Elevados teores de glúten úmido tendem a produzir as farinhas maior força de glúten, as quais apresentam maior elasticidade e maior teor de proteínas apresentando qualidades desejáveis para a panificação (COSTA et al., 2008).

Em estudo realizado na Índia foi constatado que as subunidades 2 + 12 também podem ser igualmente eficientes na fabricação de pão. Os trigos que carregavam os alelos 5 + 10 exercem melhor qualidade de pão apenas na região peninsular central, enquanto que em outras regiões, os grãos com as subunidades 5 + 10 não registraram maior volume de pão do que os que continham as subunidades 2 + 12. Assim, há casos em que essas

subunidades podem ser preferíveis às subunidades 5 + 10, dependendo da região considerada (MOHAN; GUPTA, 2015).

3.4.9 Efeito da translocação 1BL.1RS sobre parâmetros de qualidade tecnológica de trigo

Genótipos de trigo com a translocação 1BL.1RS apresentaram médias inferiores de MS-SDS, L, NQG e GU, e médias superiores de PH e de relação P/L do que genótipos sem a translocação (Tabelas 9 e 10). Em parte, concordando com estes resultados Gobaa et al. (2008b) observaram que genótipos de trigo com a translocação apresentaram valores significativamente menores para W, P, L e NQG, e maiores para a relação P/L. Em acessos chineses, a presença da translocação 1BL.1RS teve efeito significativo na redução do volume de MS-SDS e da estabilidade (LI et al., 2009). Quando estudado o efeito da translocação em trigo duro verificou-se que a presença da 1BL.1RS não alterou o conteúdo de proteína do grão, porém diminuiu significativamente o valor de MS-SDS (OAK; TAMHANKAR; 2017).

A translocação 1BL.1RS envolve o braço longo do cromossomo 1 do genoma B de trigo, que é substituído pelo braço curto do cromossomo 1 do centeio. Deste modo, a diminuição dos valores de parâmetros reológicos é consequência da perda de LMW-GS codificadas pelo loco *Glu-B3* localizado no braço curto do cromossomo 1B. O braço do cromossomo 1RS contém o loco *Sec-1* responsável por codificar secalinas. Essa troca leva à perda de características como força de glúten e afeta as propriedades da massa da farinha de trigo (LELLEY et al., 2004; GOBAA et al., 2008a).

Os resultados das interações dos locos *Glu-1* e da translocação 1BL.1RS podem ser visualizados na Tabela 8.

3.5 Conclusões

A coleção de acessos de trigo avaliada apresenta 53 perfis de gluteninas de alto peso molecular diferentes, com um total de 21 alelos, sendo a combinação alélica mais frequente 2*/7+9/5+10 (11,9%) e o valor médio de diversidade genética de 0,67.

O escore *Glu-1* apresenta correlação positiva com MS-SDS, força de glúten (W), tenacidade (P), extensibilidade (L), índice de elasticidade (Ie) e estabilidade (EST) da massa, podendo ser empregado para predição da qualidade panificativa.

Os alelos que mais positivamente influenciaram a W, o Ie e a EST são 1, 7oe+8 e 5+10, dos locos *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*, respectivamente, o que indica a necessidade de ajuste no peso dos alelos do loco *Glu-A1* para o cálculo do escore para as condições brasileiras, e justifica o elevado peso descrito para a combinação de alelos 7oe+8.

A superioridade da combinação 7oe+8 para MS-SDS, W, P, Ie e EST determina a importância da sua identificação por marcadores moleculares para a composição do escore, visto ser difícil sua identificação em SDS-PAGE.

4 CAPÍTULO II

Análise de marcadores moleculares de DNA para alelos de HMW-GS e para translocação 1BL.1RS em genótipos de trigo

4.1 Resumo

O objetivo do trabalho foi usar marcadores moleculares para determinar a composição alélica em quatro locos relacionados com a qualidade de uso final. Para isso, foram avaliados 467 acessos de trigos por marcadores moleculares do tipo SNP pelo método KASP para alelos dos locos *Glu-A1* e *Glu-D1* e para a presença da translocação 1BL.1RS. Para o alelo que confere super expressão da subunidade 7 (7oe – over expressed) do loco *Glu-B1* foi usado um marcador STS. A análise de gluteninas em SDS-PAGE possibilitou a comparação dos resultados com as análises de DNA para 270 acessos de trigo. Para os marcadores de alelos do loco *Glu-A1* houve 91,8% de concordância com o perfil proteico de HMW-GS e para o loco *Glu-D1*, 98,8%. Com o marcador da super expressão 7oe do loco *Glu-B1* foram identificados 22 (10%) acessos com este alelo. A presença da translocação 1BL.1RS foi identificada em 83 (18%) dos 467 acessos de trigo avaliados. Os resultados indicaram a eficiência do uso de marcadores moleculares de DNA para os locos *Glu-1*.

Palavras-chave: 1. Gluteninas de alto peso molecular. 2. Marcador de DNA. 3. Marcador SNP. 4. *Triticum aestivum*. 5. *Bx7oe*.

4.2 Introdução

Os programas de melhoramento de trigo têm desenvolvido cada vez mais pesquisas para a caracterização de alelos gênicos relacionados à qualidade tecnológica. O diferencial do trigo é a capacidade de sua farinha ser transformada em diferentes produtos alimentares, característica esta atribuída pelas proteínas formadoras de glúten (ORTH; BUSHUK, 1972), gliadinas e gluteninas.

As gluteninas são proteínas poliméricas que se mantêm estáveis por pontes de dissulfeto que se formam a partir da ligação dos resíduos de cisteína. Elas estão associadas a características de elasticidade da massa, e apresentam propriedades de resistência à extensão (HOSNEY, 1994). Estas proteínas são classificadas em função da massa molecular, em gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS, *high-molecular weight glutenin subunits*), com massa molecular variando de 77 a 160 kDa, e gluteninas de baixo peso molecular (LMW-GS, *low-molecular weight glutenin subunits*) com massa molecular entre 23 e 68 kDa (SHEWRY et al., 1986; KASARDA, 1999).

Os genes das HMW-GS são codificados nos locos *Glu-1* no braço longo dos cromossomos 1A, 1B e 1D. As subunidades de HMW-GS estão divididas em tipos “x” e “y”. Algumas subunidades são silenciadas, como a subunidade 1Ay que nunca é expressa, enquanto que 1Ax e 1By podem não ser expressas. Já as subunidades 1Bx, 1Dx e 1Dy estão presentes em todos os genótipos de trigo. Deste modo um genótipo de trigo hexaploide pode apresentar de 3 a 5 HMW-GS (SHEWRY et al., 2003). Os polimorfismos dessas subunidades são identificados pela diferença quanto à mobilidade eletroforética em SDS-PAGE.

Os alelos proteicos das subunidades de gluteninas de alto peso molecular são representados por números e estão divididos respectivamente em: *Glu-A1*, subunidades N (nulo), 1 e 2*; *Glu-B1*, subunidades 6+8, 7+8, 7+9, 7, 13+16, 14+15, 13+19, 17+18, 20, 21 e 22, e *Glu-D1*, subunidades 2+12, 3+12, 4+12, 2+10, 5+10, 2+11 e 2.2+12 (PAYNE et al., 1981; PAYNE, 1987).

Atualmente, o perfil tecnológico de uma linhagem promissora só pode ser determinado em etapas avançadas do melhoramento genético de trigo. Análises de parâmetros do perfil tecnológico demandam quantidade de grãos de alguns quilogramas. O teste SDS-PAGE é muito utilizado para a caracterização do perfil de HMW-GS, porém, este teste apresenta algumas limitações pela necessidade da obtenção de grãos, visto as proteínas de reserva serem expressas exclusivamente nos grãos de trigo. Além disso, algumas HMW-GS apresentam mobilidade eletroforética similar, podendo resultar na

identificação incorreta de alelos funcionalmente distintos (GIANIBELLI et al., 2002; FENG et al., 2011).

Os marcadores moleculares também podem discriminar os alelos HMW-GS, proporcionando uma ferramenta conveniente para análises genéticas rápidas e precisas (YIN et al., 2017).

Foram desenvolvidos marcadores de DNA específicos para os genes que codificam HMW-GS. *Primers* foram desenhados para distinguir genes que codificam os alelos *Glu-D1x2*, *Glu-D1x5*, *Glu-D1y10*, e *Glu-D1y12* por codominância, o que facilita a identificação de heterozigotos em retrocruzamentos (SMITH et al., 1994). Marcadores do tipo codominante também foram desenvolvidos para o loco *Glu-B1* facilitando a diferenciação de *B1x7* e *B1x17* (AHMAD, 2000). Para *Glu-A1*, foram igualmente desenvolvidos marcadores tanto para *A1x1* e *A1x2** como para o *A1xN* que não é expresso (BUSTOS et al., 2000).

O alelo *GluB1a1* (*Bx7oe*) é uma super expressão da subunidade Bx7 de HMW-GS. Ocorrem duas cópias funcionais do gene que codifica esta subunidade (LUKOW et al., 1992). A identificação da super expressão da subunidade Bx7 tem sido importante em programas de melhoramento, visto ela poder estar associada com força de glúten (CHO et al., 2017).

Por outro lado, um fator sugerido como tendo envolvimento com baixa qualidade tecnológica é a presença da translocação 1BL.1RS. Essa translocação tem sido amplamente utilizada em programas de melhoramento de trigo em todo o mundo, como fonte de resistência à doenças e pragas, além de maior potencial de produção de grãos (QI et al., 2016). Entretanto, defeitos graves na qualidade do pão, tais como fraca tolerância de mistura, viscosidade superficial da massa e baixo volume de pão foram associados à presença da translocação (GOBBA et al., 2008a).

A maioria dos marcadores desenvolvidos para as HMW-GS são baseados na técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) com a utilização de *primers* específicos nas

regiões dos genes de gluteninas apresentando polimorfismos de tamanho (STS – *Sequence-Tagged Sites*). Esse tipo de marcador produz produtos de amplificação de tamanhos diferentes entre os genótipos, visualizados em sistemas de eletroforese.

Outro tipo de polimorfismo que vem sendo muito utilizado devido a sua dispersão pelo genoma, são os do tipo SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*), caracterizados por alterações em uma única base entre as sequências de DNA de diferentes cultivares. Entre os diferentes métodos disponíveis para a detecção de SNPs, o método KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*) tem mostrado resultados promissores (MACCAFERRI et al., 2015; ZANKE et al., 2015; RASHEED et al., 2016). Essa metodologia é baseada na PCR competitiva, para alelos específicos, com a utilização de fluorescência, dispensando a técnica de eletroforese. Os *primers* de alelos específicos são ligados com moléculas fluorescentes na extremidade 3'. Quando o *primer* é hibridizado ao DNA, e a sequência que está acrescida com uma molécula fluorescente é sintetizada, ocorre a emissão da fluorescência. O genótipo é, então, facilmente detectado pela leitura de sinais fluorescentes (McCOUCH et al., 2010).

Deste modo, os objetivos do presente trabalho foram: i) verificar a eficiência dos marcadores KASP na determinação dos alelos para os locos *Glu-A1* e *Glu-D1*; ii) determinar a presença do alelo 7oe e da translocação 1BL.1RS.

4.3 Material e Métodos

Material vegetal

Um total de 467 acessos de trigo foram obtidos junto ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo e analisados neste trabalho. Destes, 270 acessos foram também avaliados quanto ao perfil de HMW-GS em SDS-PAGE, que serviram à análise de eficiência na identificação dos alelos de HMW-GS por marcadores moleculares de DNA.

Marcadores moleculares de DNA

A extração de DNA e a identificação do alelo 7oe e da presença da translocação 1BL.1RS estão descritas no item 3.3 do Capítulo I.

Além desses, foram usados marcadores moleculares para a identificação dos alelos do loco *Glu-A1* e *Glu-D1* pelo método KASP descrito no item 3.3 do Capítulo I. As sequências dos *primers* dos diferentes alelos foram recuperadas da literatura, e estão apresentadas no Quadro 5.

Quadro 5 – Relação dos *primers* KASP dos marcadores de DNA para os alelos dos locos *Glu-A1* e *Glu-D1*

<i>Primers</i>	Caractere	Alelo FAM	Alelo HEX	<i>Primer</i> Comum	Referência
wMAS000012	<i>Glu-A1</i> (2*/N ou 1)	GAGCGCGA GCTCCAGG AG	GAGCGCG AGCTCCA GGAA	GGCATGCC TTAAGCGA GTG	Liu et al. (2008)
wMAS000013	<i>Glu-A1</i> (2*/1 ou N)	AAGTGTA CTTCTCCG CAACA	AAGTGTA ACTTCTC CGCAACG	GGCCTGGA TAGTATGA AACC	Liu et al. (2008)
wMAS000014	<i>Glu-D1</i> (5+10 ou 2+12/outros)	ATAGTATG AAACCTGC TGCGGAG	ATAGTAT GAAACCT GCTGCGG AC	TACTAAAA AGGTATTA CCCAAGTG TAACTT	Ishikawa and Nakamura (2007)

As PCRs foram realizadas em termocicladores Veriti 384-well da Applied Biosystems. As PCRs para os *primers* wMAS000012, wMAS000013 e wMAS000014 foram realizadas utilizando-se o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C durante 15 minutos; dez ciclos de desnaturação (94°C durante 20 segundos) e anelamento/extensão (61-55°C por 60 segundos, com redução de 0,6°C por ciclo); 26 ciclos de desnaturação (94°C durante 20 segundos) e anelamento/extensão a 55°C por 60 segundos). Após o término dos ciclos, as amostras foram resfriadas a 10°C.

Leitura dos marcadores moleculares de DNA

Para a leitura dos alelos do loco *Glu-A1* foram utilizados dois marcadores (wMAS000012 e wMAS000013). A amplificação do alelo FAM para o marcador

wMAS000012 identificava a presença dos alelos $Ax2^*$ ou AxN , e a amplificação do alelo HEX indicava a presença do alelo $Ax1$. Já para o marcador wMAS000013, a amplificação do alelo FAM indicava a presença dos alelos $Ax2^*$ ou AxN e a amplificação do alelo HEX indicava a presença do alelo $Ax1$ (Quadro 6). Desse modo, foi utilizada a leitura conjunta dos dois marcadores para identificar o alelo presente no loco *Glu-A1*.

Quadro 6 - Exemplo da leitura da amplificação dos alelos FAM e HEX para os marcadores de DNA do loco *Glu-A1*

Marcador wMAS000012 (FAM-2*/N ou HEX-1)	Marcador wMAS000013 (FAM-2*/1 ou HEX-N)	Subunidade de HMW-GS correspondente
FAM	FAM	2*
FAM	HEX	N
HEX	FAM	1

Para a leitura dos alelos do loco *Glu-D1* foi utilizado o marcador wMAS000014. A amplificação do alelo FAM indicava a presença dos alelos 2+12 ou outros, e a amplificação do alelo HEX indicava a presença dos alelos 5+10.

4.4 Resultados e Discussão

Os marcadores de DNA foram utilizados em uma coleção de 467 genótipos de trigo. Para confirmar a eficiência na detecção dos alelos codificando HMW-GS, os resultados dos marcadores moleculares foram comparados com os resultados de 270 perfis de HMW-GS obtidos através da análise de SDS-PAGE. Muitos estudos têm sido realizados para a validação de marcadores de genes que codificam as HMW-GS, mostrando-se ser um método mais rápido e efetivo na detecção das subunidades tanto para gluteninas de alto como de baixo peso molecular (JIN et al., 2011; RAVEL et al., 2014).

4.4.1 Marcador molecular de DNA para o loco *Glu-A1*

Para detecção dos alelos codificando para as subunidades presentes no loco *Glu-A1* foram usados dois marcadores. O primeiro marcador (wMAS000012) detectava a presença do alelo Ax1, amplificando o alelo devido ao anelamento do *primer* com o fluoróforo HEX. Na ausência do alelo Ax1, era detectado o fluoróforo FAM, indicando a presença de Ax2* ou AxN. O segundo marcador (wMAS000013) detectava a presença do alelo AxN quando detectado o fluoróforo HEX. A detecção do fluoróforo FAM indicava a presença dos alelos Ax1 ou Ax2*. Deste modo, foi necessária a análise conjunta dos dois marcadores para a identificação do alelo codificando para as diferentes subunidades do loco *Glu-A1*. Nas Figuras 7 e 8, estão os gráficos representativos de leitura dos marcadores para o loco *Glu-A1*.

Figura 7 – Gráfico representativo da amplificação dos alelos marcados com os corantes fluorescentes FAM e HEX do marcador molecular wMAS000012 pelo método KASP

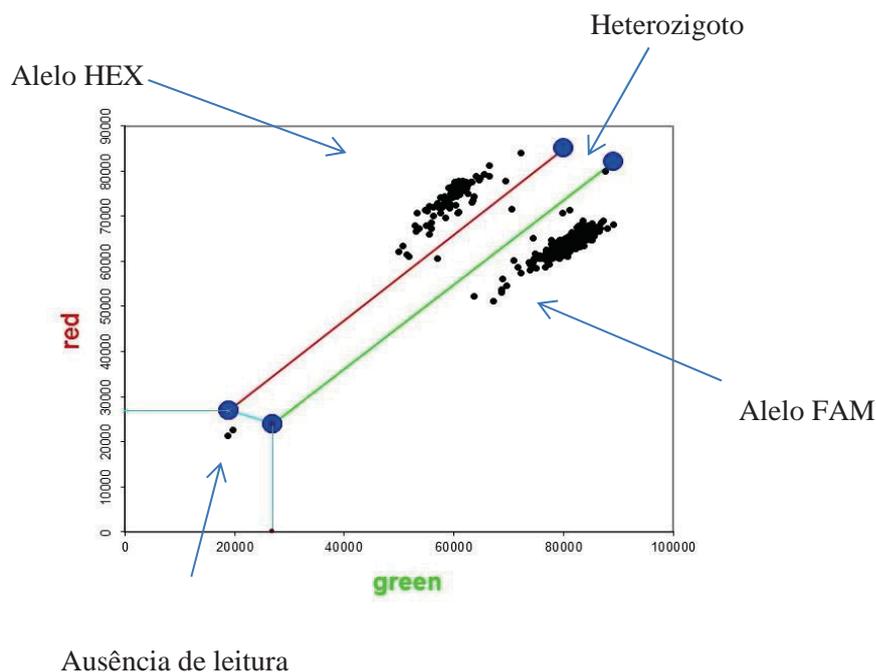
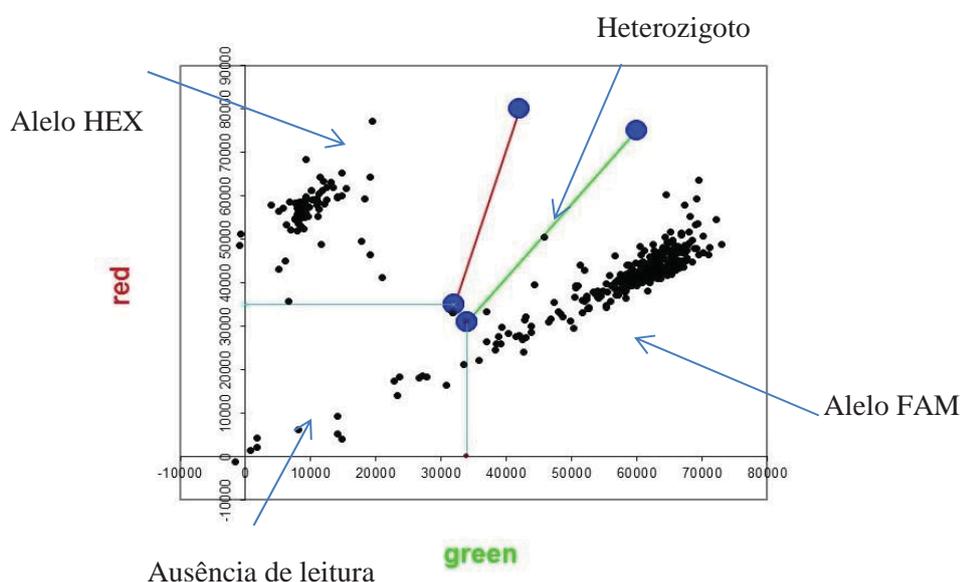


Figura 8 – Gráfico representativo da amplificação dos alelos marcados com os corantes fluorescentes FAM e HEX do marcador molecular wMAS000013 pelo método KASP



Os resultados para os 467 genótipos de trigo para os marcadores wMAS000012 e wMAS000013 para o loco *Glu-A1* estão apresentados na Tabela 11. A análise conjunta dos dois marcadores indicou que 121 (26%) dos genótipos tinham a subunidade de HMW-GS Ax1, 224 (48%) tinham a subunidade Ax2* e 84 (18%) tinham o alelo nulo. Em 38 (8,1%) genótipos não houve leitura pelos marcadores de DNA.

Tabela 11 – Relação do total de genótipos de trigo identificado pelos marcadores wMAS000012 e wMAS000013 para o loco *Glu-A1*

HMW-GS	Alelos amplificados	Nº de genótipos (%)
1	HEX - FAM	84 (18%)
2*	FAM - FAM	224 (48%)
N	FAM - HEX	121 (26%)
-	Sem leitura	38 (8,1%)
Total		467

Foi feita a comparação entre os resultados dos 270 acessos que tinham tanto resultado de perfil de HMW-GS por SDS-PAGE como resultado de marcadores de DNA. Entre os 270 acessos avaliados, para 25 não houve leitura com os marcadores de DNA.

Deste modo, a comparação foi realizada com os 245 acessos que tinham leitura com ambos os métodos.

A concordância entre perfil de proteína e marcador de DNA foi de 91,8% para o loco *Glu-A1*. Diferentes subunidades são identificadas em função da mobilidade eletroforética em SDS-PAGE. Por outro lado, e apesar da agilidade do processo de caracterização dos genótipos pelo uso de marcadores moleculares para a presença do alelo Ax2* (GOUTAM et al., 2015), os resultados obtidos nesse trabalho indicam alguns casos de inconsistências de identificação. Houve casos de identificação do alelo AxN usando-se marcador molecular de DNA, sendo que em SDS-PAGE foi verificada a presença de alelo proteico. Uma variação entre as amostragens realizadas para a extração de proteínas e a de DNA poderia explicar, em parte, as inconsistências encontradas, inclusive pela presença de biótipos nos acessos estudados.

4.4.2 Marcador molecular de DNA para *GluBx7oe*

Conforme descrito no Capítulo I item 3.4.1, 219 acessos de trigo com homogeneidade de perfil de HMW-GS e sem ambiguidade de leitura foram caracterizados com o marcador para o alelo 7oe. Utilizando-se o marcador de DNA para o alelo *GluBx7oe*, verificou-se que 22 (10%) dos genótipos estudados possuíam este alelo, 15 acessos tiveram a combinação 7oe+8 e sete deles, o alelo 7oe sozinho (Tabela 12).

Tabela 12 – Relação dos genótipos com a presença do alelo Bx7oe e país de origem

(Continua)

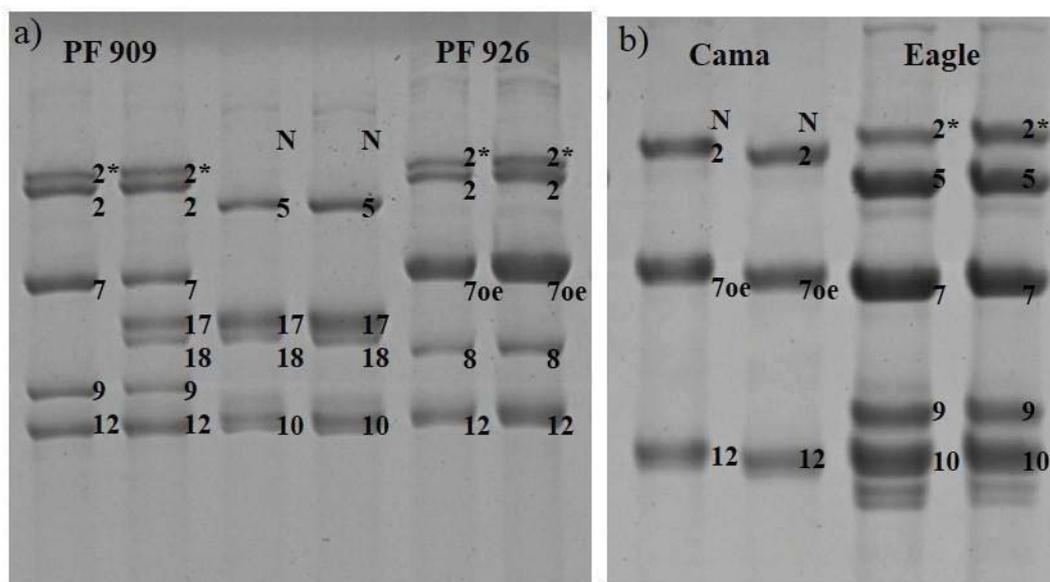
Acessos	<i>GluA1</i>	<i>GluB1</i>	<i>GluD1</i>	País
AC_VISTA	1	7oe+8	2+12	Canadá
AGATHA	2*	7oe+8	2+12	Canadá
ALTAR_SIB	2*	7oe+8	5+10	Equador
BRS_220	2*	7oe+8	2+12	Brasil
BRS_CAMBOATA	N	7oe+8	2+12	Brasil
BUCK_PONCHO	2*	7oe+8	5+10	Argentina
CAMA	N	7oe	2+12	Bélgica

Tabela 12 – Relação dos genótipos com a presença do alelo Bx7oe e país de origem

Acessos	<i>GluA1</i>	<i>GluB1</i>	<i>GluD1</i>	(Conclusão)
				País
Dreadnought	1	7oe	2+12	Nova Zelândia
EMBRAPA_16	2*	7oe+8	2+12	Brasil
EMBRAPA_22	1	7oe+8	5+10	Brasil
ESTANZUELA_DORADO	1	7oe+8	5+10	Uruguai
GRANAROLO	2*	7oe	2+12	Itália
KLEIN_ATLAS	1	7oe+8	2+12	Argentina
KLEIN_LUCERO (825635)	2*	7oe+8	2+12	Argentina
Novosadska_Rana_1	N	7oe+8	2+12	Sérvia
PELADINHO	2*	7oe	2+12	Brasil
Peragis_I	1	7oe	2+12	Alemanha
PF_926	2*	7oe+8	2+12	Brasil
PF_93157	1	7oe+8	2+12	Brasil
PF_93158	2*	7oe	2+12	Brasil
TOROPI	2*	7oe+8	2+12	Brasil
TRIO	2*	7oe	2+12	França

Em alguns casos, a super expressão do alelo 7oe pode ser vista em SDS-PAGE, caracterizando-se como uma banda proteica mais intensa. Porém, isso nem sempre ocorre. Na Figura 6, são apresentados exemplos de acessos com forte ou fraca intensidade de bandas, que não necessariamente correspondem à presença ou à ausência do alelo 7oe, segundo dados do marcador de DNA. Butow et al. (2004) questionam a avaliação da presença desse alelo em SDS-PAGE, visto que, em seus estudos, as bandas de acessos de trigo com a presença ou a ausência da subunidade 7oe apresentaram a mesma intensidade em SDS-PAGE.

Figura 6 – Imagens de SDS-PAGE de gluteninas de alto peso molecular de genótipos de trigo com intensidades diferentes para subunidade 7oe



Fonte: Gisele A. M. Torres

Nota: A Figura 6a) ilustra exemplo da linhagem PF 926 com o alelo *Bx7oe* e com intensidade maior de banda em SDS-PAGE do que a linhagem PF 909 que não o possui.

A Figura 6b) ilustra exemplo em que a maior intensidade de banda é observada na cultivar Eagle que não possui a subunidade 7oe, contrastando com o perfil da cultivar Cama, que a possui.

Li et al. (2014), ao avaliarem um conjunto de 325 genótipos de trigo para o alelo *Bx7oe*, observaram que 9,5% (31) dos genótipos possuíam o alelo, frequência próxima à encontrada neste estudo. Os autores também constaram que a grande parte dos genótipos com a presença do alelo *Bx7oe* eram originários do continente Americano (Canadá, Argentina, Estados Unidos, México, Uruguai e Brasil). Três cultivares presentes neste trabalho, Ac Vista (Canadá), Klein Atlas (Argentina) e Toropi (Brasil) também foram avaliadas por Li et al. (2014). Para essas três cultivares cujos perfis estão descritos na Tabela 12, ambos os trabalhos identificaram a presença do alelo *Bx7oe*.

A super expressão do alelo *Bx7oe*, com maior acúmulo de proteína, tem uma influência positiva na qualidade de panificação (VAWSER; CORNISH, 2004). Cultivares com esse alelo apresentam maior força de glúten, com maiores tempos de mistura, maior resistência à extensão da massa e reduzida quebra de resistência (COOPER et al., 2016).

4.4.3 Marcador molecular de DNA para o loco *Glu-D1*

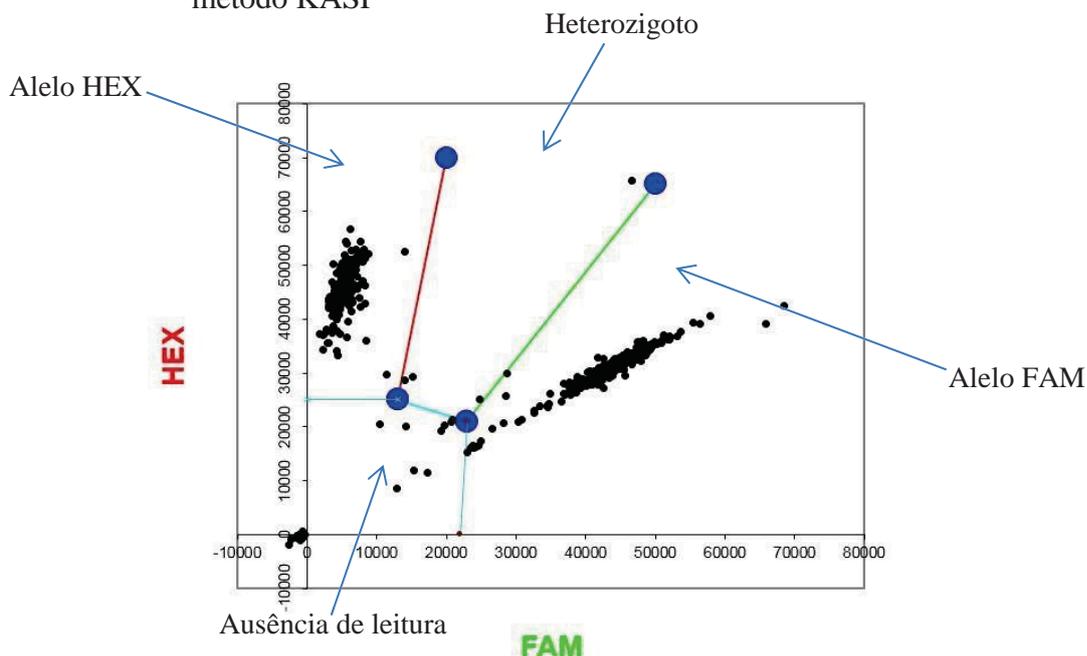
Os resultados da análise de 467 genótipos com o marcador de DNA wMAS000014 para o loco *Glu-D1* estão apresentados na Tabela 13. Na Figura 9, está um exemplo de leitura feita através dos gráficos, com a amplificação dos alelos FAM e HEX.

Tabela 13 – Relação do total de genótipos de trigo identificado pelo marcador wMAS000014 para o loco *Glu-D1*

HMW-GS	Fluoróforo amplificado	Nº de genótipos (%)
2+12 ou outros	FAM	279 (59,7%)
5+10	HEX	170 (36,4%)
-	Sem leitura	18 (3,8%)
Total		467

O marcador molecular utilizado para o loco *Glu-D1* diferencia a presença dos alelos 5+10, amplificando o alelo marcado com HEX, e a amplificação do alelo marcado com FAM indica a presença dos alelos 2+12 ou outros. Do total de genótipos avaliados, 59,7% (279) indicaram a presença dos alelos 2+12 ou outros, 36,4% (170) indicaram a presença dos alelos 5+10, e para 3,8% (18), não houve leitura do marcador de DNA.

Figura 9 – Gráfico representativo da amplificação dos alelos marcados com os corantes fluorescentes FAM e HEX do marcador molecular wMAS000014 pelo método KASP



Foram comparados os resultados de perfil de HMW-GS em SDS-PAGE de 270 genótipos de trigo com os resultados de marcadores de DNA para o loco *Glu-D1*. Entre estes, para 16 acessos não houve leitura com os marcadores de DNA. Deste modo, comparando-se os 254 acessos com leitura com ambos os métodos, houve 98,8% de concordância. Paro (2011) ao comparar os resultados das análises de SDS-PAGE e marcadores moleculares DNA para o loco *Glu-D1* obteve concordância de 91%.

Pequenas discrepâncias entre os resultados de perfis de HMW-GS em SDS-PAGE com resultados de marcadores de DNA são comuns. Em trabalho de Gao et al. (2010), com uma coleção de 60 acessos de trigo, três cultivares continham o alelo *Dx5* do loco *Glu-D1* com base no marcador PCR, mas o alelo proteico não foi identificado em SDS-PAGE. Os autores concluíram que essa discrepância foi devida a massas moleculares superestimadas e baixa resolução.

A alta eficiência de 98,8% do marcador de DNA de alelos do loco *Glu-D1*, encontrada neste trabalho, concorda com o estudo realizado por Rasheed et al. (2016),

que também utilizaram esses marcadores específicos pelo método KASP. Uma vez que os alelos 5+10 de HMW-GS têm mostrado maior influência na qualidade de panificação e força de glúten, a identificação de marcadores moleculares para os alelos *Dx5+Dy10* é de grande importância em programas de melhoramento (HEIM et al., 2017).

4.4.4 Marcador para translocação 1BL.1RS

A amplificação do alelo HEX indicava a presença da translocação 1BL.1RS e a amplificação do alelo FAM indicava a ausência. Na coleção de 467 acessos de trigo, houve a presença da translocação em 83 (18%) genótipos, 380 (81%) genótipos não apresentaram a translocação, e para 13 (3%) não foi possível fazer a leitura desse marcador (Tabela 14).

Tabela 14 – Relação do total de genótipos de trigo identificado pelo marcador wMAS000011 para translocação 1BL.1RS

Presença da 1BL.1RS	Fluoróforo amplificado	Nº de genótipos (%)
Não	FAM	380 (81%)
Sim	HEX	83 (18%)
-	Sem leitura	13 (3%)
Total		467

A translocação 1BL.1RS está envolvida com a resistência a doenças e pragas e ao maior potencial de produção de grãos (QI et al., 2016). Entretanto, a presença dessa translocação em genótipos de trigo tem mostrado efeito negativo na força do glúten e consequentemente diminuição da qualidade de panificação (VAZQUEZ et al., 2012). O uso de marcadores moleculares para a detecção da translocação 1BL.1RS tem sido reportado em trabalhos que buscam genótipos com características adequadas para panificação (HENKRAR et al., 2017; MA; BAIK, 2018). Os marcadores moleculares para a identificação da translocação 1BL.1RS tornam-se ferramentas importantes para programas de melhoramento que visem à qualidade de uso final a partir de trigo.

4.5 Conclusões

Os marcadores moleculares para os locos *Glu-A1* e *Glu-D1* mostram-se efetivos para a detecção dos alelos codificadores de gluteninas. A alta porcentagem de concordância com o perfil proteico em SDS-PAGE, de 91,8% para *Glu-A1* e de 98,8% para *Glu-D1*, mostra a eficiência do uso dos marcadores KASP relacionados com ambos os locos.

O marcador do alelo 7oe do loco *Glu-B1* identificou a presença da super expressão desse alelo em 22 (10%) dos acessos avaliados. O uso desse marcador de DNA é importante, pois a presença da super expressão 7oe é dificilmente identificada em SDS-PAGE.

O marcador molecular de DNA para a translocação 1BL.1RS identificou a presença dessa translocação em 18% dos genótipos avaliados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nos dois capítulos são de grande interesse para programas de melhoramento sendo apresentados os perfis de HMW-GS de 274 genótipos de trigo.

A identificação dos alelos de HMW-GS 1, 7^{oe}+8 e 5+10 associados com melhores médias para parâmetros de qualidade tecnológica de trigo de interesse (W, I_e e EST) faz da caracterização de HMW-GS uma ferramenta importante na busca de genótipos com aptidão tecnológica para diferentes usos finais.

Apesar da técnica de SDS-PAGE para a identificação dos perfis de HMW-GS ser de praticidade e de baixo custo, ela apresenta limitações na identificação de subunidades com mobilidade eletroforética semelhante e da super expressão do alelo 7^{oe} que quando presente em genótipos de trigo apresentou características de interesse para a panificação. Especificamente para este alelo, faz-se necessário o uso de marcadores moleculares de DNA para sua identificação. Outro fator importante é a detecção da translocação 1BL.1RS em genótipos de trigo, uma vez que esta é associada com a diminuição da qualidade panificativa de trigo, pela diminuição da força de glúten.

O uso de marcadores moleculares para as subunidades dos locos *Glu-A1* e *Glu-D1* mostraram no presente trabalho alta porcentagem de concordância com os resultados de SDS-PAGE demonstrando a eficiência do uso de marcadores moleculares de DNA para a caracterização de alelos codificadores de HMW-GS. Os marcadores de DNA para os locos *Glu-1* podem ser aplicados em programas de melhoramento a fim de acelerar o processo de caracterização de genótipos de trigo.

As sugestões para trabalhos futuros são:

A implementação de marcadores moleculares de DNA para a detecção da super expressão do alelo 7^{oe} e da translocação 1BL.1RS.

A proposta de um novo escore para os alelos do loco *Glu-A1* para genótipos de trigo no Brasil. No escore *Glu-1*, os alelos 1 e 2 tem a mesma nota de 3 pontos. No presente trabalho, foram encontradas diferenças entre a contribuição individual dos alelos do loco *Glu-A1*, sendo que os genótipos que tinham o alelo 1 mostraram médias superiores de parâmetros de qualidade do que os com os alelos 2* e N.

6 CONCLUSÃO GERAL

A coleção de acessos de trigo avaliada apresentou 53 perfis de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) diferentes, com um total de 21 alelos, sendo que a combinação alélica mais frequente foi 2*/7+9/5+10, e o valor médio da diversidade genética foi de 0,67.

O escore *Glu-1* apresentou correlação positiva com MS-SDS, força de glúten (W), tenacidade (P), extensibilidade (L), índice de elasticidade (Ie) e estabilidade (EST) da massa, podendo ser empregado para predição da qualidade panificativa.

Os alelos que mais positivamente influenciaram a força de glúten (W), o índice de elasticidade (Ie) e a estabilidade (EST) foram 1, 70e+8 e 5+10, localizados nos locos *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*, respectivamente. Estes resultados indicam a necessidade de ajuste do peso dos alelos do loco *Glu-A1* no cálculo do escore para as condições brasileiras, e justificam o elevado peso descrito para o alelo 70e+8. A superioridade da combinação 70e+8 para MS-SDS, W, P, Ie e EST, justifica a importância da sua identificação por marcadores moleculares de DNA para a composição do escore, visto ser difícil sua identificação em SDS-PAGE.

Os marcadores moleculares para os locos *Glu-A1* e *Glu-D1* mostraram-se efetivos para a detecção dos alelos codificadores de gluteninas. Ambos apresentaram alta porcentagem de concordância com o perfil proteico em SDS-PAGE, *Glu-A1* teve 91,8% de concordância e *Glu-D1* teve 98,8%. O marcador da super expressão do alelo 70e do loco *Glu-B1* detectou a presença desse alelo em 10% dos genótipos estudados. O marcador molecular de DNA para a translocação 1BL.1RS identificou a presença dessa translocação em 18% dos genótipos avaliados.

REFERÊNCIAS

AACCI. **Approved methods of analysis**. 11 ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists International, 2010. Disponível em: <<http://methods.aaccnet.org/toc.aspx>> Acesso em: 14 jan. 2018.

ABITRIGO – Associação Brasileira da Indústria de Trigo. **Farinha de Trigo**. Copyrights, 2016. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/farinha-de-trigo.php>> Acesso: 29 jan. 2018.

ABUGALIEVA, A.; MORGOUNOV, A.; PENA, J. P.; VOLKOVINSKAYA, N.; SAVIN, T. KASIB spring common wheat genotype identification on glutenin and gliadin subunits. **Journal of Crop Breeding and Genetics**, p. 1-2, 2015.

AHMAD, M. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 5-6, p. 892-896, 2000.

BAUMGRATZ, E. I.; MERA, C. M. P. D.; FIORIN, J.; DE CASTRO, N. L. M.; DE CASTRO, R. Produção de trigo. A decisão por análise econômico-financeira. **Revista de Política Agrícola**, v.26, n. 3, p. 8-21. 2017.

BEAN, S. R.; CHUNG, O. K.; TUINSTRA, M. R.; PEDERSEN, J. F.; ERPELDING, J. Evaluation of the single kernel characterization system (SKCS) for measurement of sorghum grain attributes. **Cereal Chemistry**, v. 83, n. 1, p. 108-113, 2006.

BIBI, A. S.; AJMAL, A.; RASHEED, A.; GUL-KAZI A.; A. MUJEEB-KAZI. High molecular weight (HMW) glutenin subunit compositions of the Elite-II synthetic hexaploid wheat sub-set (*Triticum turgidum* × *Aegilops tauschii*; 2n=6x=42; AABBDD). **Plant Genetic Resources**, v. 10, n. 3, p. 1-4, 2012.

BIN-SHUANG, P. A. N. G.; YU-SHUANG, Y. A. N. G.; LAN-FEN, W. A. N. G.; ZHANG, X. Y.; YUAN-JIE, Y. U. Complementary effect of high-molecular-weight glutenin subunits on bread-making quality in common wheat. **Acta Agronomica Sinica**, v. 35, n. 8, p. 1379-1385, 2009.

BOGGINI, G.; DOUST, M.A.; ANNICCHIARICO, P.; PECETTI, L. Yielding ability, yield stability, and quality of exotic durum wheat germplasm in Sicily. **Plant Breeding**, v.116, p. 541-545, 1998.

BORDES, J.; RAVEL, C.; LE GOUIS, J.; LAPIERRE, A.; CHARMET, G.; BALFOURIER, F. Use of a global wheat core collection for association analysis of flour and dough quality traits. **Journal of Cereal Science**, v. 54, p. 137-147, 2011.

BRANLARD, G.; DARDEVET, M. Diversity of grain protein and bread wheat quality: II. Correlation between high molecular weight subunits of glutenin and flour quality characteristics. **Journal of Cereal Science**, v. 3, n. 4, p. 345-354, 1985.

BRANLARD, G.; DARDEVET, M.; AMIOUR, N.; IGREJAS, G. Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 669-679, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 2010.

BUSHUK, W. Wheat breeding for end-product use. In: **Wheat: Prospects for global improvement**. Springer, p. 203-211, 1997.

BUTOW, B. J.; GALE, K. R.; IKEA, J.; JUHASZ, A.; BEDÖ, Z.; TAMAS, L.; GIANIBELLI, M. C. Dissemination of the highly expressed Bx7 glutenin subunit (*Glu-B1a1* allele) in wheat as revealed by novel PCR markers and RP-HPLC. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 7, p. 1525-1535. 2004.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 64-71, 2009.

CALDEIRA, M. T. M.; LIMA, A. L. V.; SEKI, A. H.; RUMJANEK, D. F. Diversidade de trigos, tipificação de farinhas e genotipagem. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, p. 44-48, 2003.

CARDOSO, M. B. Análises citogenéticas em linhagens sintéticas de *Triticum aestivum* L. em Thell. (*T. durum* L. X *Aegilops tauschii* Coss) e seus cruzamentos com cultivares de trigo, visando a introgressão de resistência à ferrugem da folha. 2007. 100 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007

CARMONA, S.; ALVAREZ, J. B.; CABALLERO, L. Genetic diversity for morphological traits and seed storage proteins in Spanish rivet wheat. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 69-75, 2010.

CHAPLA, P. I.; VIEIRA, E. S. N.; FRANCO, F. A.; LINDE, G. A.; SILVA, G. J.; COLAUTO, N. B.; MARCHIORO, V. S.; SCHUSTER, I. High molecular weight glutenin subunits and the classification used in Brazilian wheat industry. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017.

CHARMET, G. Wheat domestication: lessons for the future. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 3, p. 212-220, 2011.

CHO, S. W.; ROY, S. K.; CHUN, J. B.; CHO, K.; PARK, C. S. Overexpression of the Bx7 high molecular weight glutenin subunit on the *Glu-B1* locus in a Korean wheat landrace. **Plant Biotechnology Reports**, v. 11, n. 2, p. 97-105, 2017.

CLARKE, F. R.; CLARKE, J. M.; AMES, N. A.; KNOX, R. E.; ROSS, R. J. Gluten index compared with SDS-sedimentation volume for early generation selection for gluten strength in durum wheat. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 90, n. 1, p. 1-11, 2010.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Trigo Brasil**: série histórica de área plantada, produtividade e produção. 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso: 29 jan. 2018.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra Brasileira**: grãos, quinto levantamento fevereiro 2018. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>> Acesso: 16 mar. 2018.

COOPER, J.K.; STROMBERGER, J.A.; MORRIS, C.F.; BAI, G.; HALEY, S.D. End-use quality and agronomic characteristics associated with the high-molecular-weight glutenin allele in US hard winter wheat. **Crop Science**, v. 56, p. 2348–2353, 2016.

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.

COSTA, M.S.; SCHOLZ, M.B. dos S.; MIRANDA, M.Z. de; FRANCO, C.M.L. Effect of glutenin subunits on the baking quality of Brazilian wheat genotypes. **Bragantia**, v. 76, p. 11-22, 2017;

DA COSTA, M. D. G.; SOUZA, E. L. de; MONTENEGRO STAMFORD, T. L.; ALVACHIAN CARDOSO ANDRADE, S. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 221-225, 2008.

DA SILVA, C. L.; BORNHOFEN, E.; TODESCHINI, M. H.; MILIOLI, A. S.; TREVISAN, D. M.; BENIN, G. Seleção de genótipos de trigo para rendimento de grãos e qualidade de panificação em ensaios multiambientais¹. **Revista Ceres**, v. 62, n. 4, p. 360-371, 2015.

DE BUSTOS, A.; RUBIO, P.; JOUVE, N. Molecular characterisation of the inactive allele of the gene *Glu-A1* and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenins of wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 7, p. 1085-1094, 2000.

De MORI, C. **Aspectos Econômicos Da Produção e Utilização** In: BÓREM, A.; SCHEEREN, P. L. Trigo: do plantio à colheita, ed. 22. UFV, p. 260. 2015.

DELCOUR JA; HOSENEY RC. Dry milling. **Principles of Cereal Science and Technology, third ed.** AACC International, St. Paul, MN, p. 71-85, 2010.

DELCOUR, J. A.; JOYE, I.J.; PAREYT, B.; WILDERJANS, E.; BRIJS, K.; LAGRAIN, B. Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 469-492, 2012.

DHAKA, V.; KHATKAR, B. S. Effects of gliadin/glutenin and HMW-GS/LMW-GS ratio on dough rheological properties and bread-making potential of wheat varieties. **Journal of Food Quality**, v. 38, p. 71-82, 2015.

EDWARDS, K. J.; REID, A. L.; COGHILL, J. A.; BERRY, S. T.; BARKER, G. L. A. Multiplex single nucleotide polymorphism (SNP)-based genotyping in allohexaploid wheat using padlock probes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, p. 375-390, 2009.

EGELHAAF, S. U., SWIETEN, E. V., BOSMA, T., BOEF, E. D., DIJK, A. A. V., & ROBILLARD, G. T. Size and shape of the repetitive domain of high molecular weight wheat gluten proteins. I. Small- angle neutron scattering. **Biopolymers**, v. 69, n. 3, p. 311-324, 2003.

EMBRAPA, **Informações técnicas para trigo e triticale** – safra 2017 / 10^a Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, p. 43, 2017.

ESPÍ, A., GIRALDO, P., RODRIGUEZ QUIJANO, M., & CARRILLO, J. M. A PCR-based method for discriminating between high molecular weight glutenin subunits Bx7 and Bx7* in *Triticum aestivum* L. **Plant Breeding**, v. 131, n. 5, p. 571-573, 2012.

FAO. Food and Agriculture of the United Nations. **World Food Situation**. Disponível em <<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>> Acesso: 15 fev. 2018.

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.

GAO, L.Y.; MA, W. J.; CHEN, J.; WANG, K.; LI, J.; WANG, S. L.; BEKES, F.; APPELS R.; YAN, Y. M. Characterization and comparative analysis of wheat high molecular weight glutenin subunits by SDS-PAGE, RP-HPLC, HPCE, and MALDI-TOF-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2777–2786, 2010.

GAO, X.; LIU, T.; YU, J.; LI, L.; FENG, Y. X. Li. Influence of high-molecular-weight glutenin subunit composition at *Glu-B1* locus on secondary and micro structures of gluten in wheat (*Triticum aestivum* L.) **Food Chemistry**, v. 197, p. 1184-1190. 2016.

GENG, Y.; PANG, B., HAO, C.; TANG, S.; ZHANG, X.; LI, T. Expression of wheat high molecular weight glutenin subunit 1Bx is affected by large insertions and deletions located in the upstream flanking sequences. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. 105-363, 2014.

GIANIBELLI, M.C.; ECHAIDE, M.; LARROQUE, O.R.; CARRILLO, J.M.; DUBCOVSKY, J. Biochemical and molecular characterization of *Glu-1* loci in Argentinean wheat cultivars. **Euphytica**, v.128, p.61-73, 2002.

GIANIBELLI, M. C.; LARROQUE, O. R.; MACRITCHIE, F.; WRIGLEY, C. W. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 6, p. 635-646, 2001.

GIL-HUMANES, J.; PISTÓN, F.; ROSELL, C. M.; BARRO, F. Significant down-regulation of γ -gliadins has minor effect on gluten and starch properties of bread wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 161-170, 2012.

GIRALDO, P.; RODRIGUEZ-QUIJANO, M.; SIMON, C.; VAZQUEZ, J.F.; CARRILLO, J.M. Allelic variation in HMW glutenins in Spanish wheat landraces and their relationship with bread quality. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 1012-1023, 2010.

GOBAA, S.; BANCEL, E.; BRANLARD, G.; KLEIJER, G.; STAMP, P. Proteomic analysis of wheat recombinant inbred lines: variations in prolamin and dough rheology. **Journal of Cereal Science**, v. 47, p.610–619, 2008a.

GOBAA, S.; BRABANT, C.; KLEIJER, G.; STAMP, P. Effect of the 1BL.1RS translocation and of the Glu-B3 variation on fifteen quality tests in a doubled haploid population of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Cereal Science**, v. 48, p. 598-603, 2008b.

GOUTAM, U.; TIWARI, R.; GUPTA, R. K.; KUKREJA, S.; CHAUDHURY, A. Allelic variations of functional markers for high molecular weight glutenin genes in Indian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and their correlation with bread loaf volume. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 1, p. 97-102, 2015.

GREGOVÁ, E.; HERMUTH, J.; KRAIC, J.; DOTLACIL, L. Protein heterogeneity in European wheat landraces and obsolete cultivars: Additional information. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.51, p.569-575, 2004.

GUARIENTI, E. M. Qualidade industrial de trigo. Embrapa Trigo, 1993.

GUARIENTI, E. M. **Qualidade industrial de trigo**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, Documentos, ed. 2, v. 27, p. 36, 1996.

GUARIENTI, E. M.; CIACCO, C. F.; CUNHA, G. D.; DUCA, L. J. D.; CAMARGO, C. M. O. Avaliação do efeito de variáveis meteorológicas na qualidade industrial e no rendimento de grãos de trigo pelo emprego de análise de componentes principais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 500-510, 2003.

GUARIENTI, E.M.; MIRANDA, M.Z. de Qualidade Tecnológica de Trigo. In: De MORI, C.; ANTUNES, J.M.; FAÉ, G.S.; ACOSTA, A.S. (Ed.) **Trigo: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, Cap. 14, p. 271, 2016.

GUPTA, R. B.; MACRITCHIE, F. 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. **Journal of Cereal Science** v. 19, p. 19–29, 1994.

GUPTA, P. K.; MIR, R. R.; A. MOHAN, A.; KUMAR, J. Wheat genomics: present status and future prospects. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 2-36, 2008.

GUPTA, R. B.; SHEPHERD, K. W. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutelin. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, n. 1, p. 65-74, 1990.

GUTKOSKI, L. C.; JACOBSEN, R. Procedure to laboratorial test of bread making: form bread type. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 873-879, 2002.

HAGBERG, S. Modified Wohlgemuth methods for alpha-amylase activity of wheat and rye. **Cereal Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 241-250, 1961.

HARBERD, N. P.; BARTELS, D.; THOMPSON, R. D. DNA restriction-fragment variation in the gene family encoding high molecular weight (HMW) glutenin subunits of wheat. **Biochemical Genetics**, v. 24, p. 579-596. 1986.

HE, J.; ZHAO, X.; LAROCHE, A.; LU, Z.; LIU, H.; LI, Z. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-8, 2014.

HEIM, H. N.; VIEIRA, E. S. N.; POLO, L. R. T.; LIMA, N. K.; SILVA, G. J.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N.B.; SCHUSTER, I. Internal amplification control of PCR for the *Glu1-Dx5* allele in wheat. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017.

HENKRAR, F.; EL-HADDOURY, J.; IRAQI, D.; BENDAOU, N.; UDUPA, S. M. Allelic variation at high-molecular weight and low-molecular weight glutenin subunit genes in Moroccan bread wheat and durum wheat cultivars. **3 Biotech**, v. 7, n. 5, p. 287, 2017.

HERNÁNDEZ, Z. J. E.; FIGUEROA, J. D. C.; RAYAS-DUARTE, P.; MARTÍNEZ-FLORES, H. E.; ARÁMBULA, G. V.; LUNA, G. B.; PEÑA, R. J. Influence of high and low molecular weight glutenins on stress relaxation of wheat kernels and the relation to sedimentation and rheological properties. **Journal of Cereal Science**, v. 55, n. 3, p. 344-350, 2012.

HERNÁNDEZ-ESTRADA, Z. J.; RAYAS-DUARTE, P.; FIGUEROA, J. D. C.; MORALES-SANCHEZ, E. Creep recovery tests to measure the effects of wheat glutenins on doughs and the relationships to rheological and breadmaking properties. **Journal of Food Engineering**, v. 143, p. 62-68, 2014.

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

IKEDA, T. M.; BRANLARD, G.; PEÑA, R. J., TAKATA, K.; LIU, L.; HE, Z. H.; LENER, SE; KOLMAN, MA; ROGERS, W. J. International collaboration for unifying *Glu-3* nomenclature system in common wheats. **Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium**, Brisbane, Australia (2008) p. 24–29 2008.

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**, v. 103, p. 1-4, 2007.

JIN, H.; YAN, J.; PEÑA, R. J.; XIA, X. C.; MORGOUNOV, A.; HAN, L. M.; ZHANG Y.; He, Z. Molecular detection of high-and low-molecular-weight glutenin subunit genes in common wheat cultivars from 20 countries using allele-specific markers. **Crop and Pasture Science**, v. 62, n. 9, p. 746-754, 2011.

JIN, H.; ZHANG, Y.; LI, G.; MU, P.; FAN, Z.; XIA, X.; HE, Z. Effects of allelic variation of HMW-GS and LMW-GS on mixograph properties and Chinese noodle and steamed bread qualities in a set of Aroona near-isogenic wheat lines. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 1, p. 146-152, 2013.

KASARDA, D. D. Glutenin structure in relation to wheat quality. **Wheat is unique**, p. 277-302, 1989.

KASARDA, D. D. Glutenin polymers: the *in vitro* to *in vivo* transition. **Cereal Foods World**, 1999.

KAUR, A.; SINGH, N.; KAUR, S.; KATYAL, M.; VIRDI, A. S., KAUR; D.; AHLAWAT, A.K; SINGH, A. M. Relationship of various flour properties with noodle making characteristics among durum wheat varieties. **Food Chemistry**, v. 188, p. 517-526, 2015.

KAYA, Y.; AKCURA, M. Effects of genotype and environment on grain yield and quality traits in bread wheat (*T. aestivum* L.). **Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 386-393, 2014.

KHATKAR, B. S.; BARAK, S.; MUDGIL, D. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 38-41, 2013.

KILIC, H.; SANAL, T.; ERDEMCI, I.; KARACA, K. Screening bread wheat genotypes for high molecular weight glutenin subunits and some quality parameters. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 19, p. 1393-1404, 2017.

KUTLU, I.; CARIKCI, M.; YORGANCILAR, O.; YORGANCILAR, A.; KARADUMAN, Y.; SIREL Z. Glutenin subunits, gliadin patterns and glutopeak characteristics of Turkey's doubled haploid wheat lines. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n.5, p. 1925–1932, 2017.

LANGNER, M.; KRYSKOWIAK, K.; SALMANOWICZ, B.P.; ADAMSKI, T.; KRAJEWSKI, P.; KACZMAREK, Z.; SURMA, M. The influence of *Glu-1* and *Glu-3* loci on dough rheology and bread-making properties in wheat (*Triticum aestivum* L.) doubled haploid lines. **Journal of the Science Food and Agriculture**, 2017.

LAWRENCE, G. J.; MOSS, H. J.; SHEPHERD, K. W.; WRIGLEY, C. W. Dough quality of biotypes of eleven Australian wheat cultivars that differ in high-molecular-weight glutenin subunit composition. **Journal of Cereal Science**, v. 6, n. 1, p. 99-101, 1987.

LELLEY, T; EDER, C; GRAUSGRUBER, H. Influence of 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation on genotype by environment interaction. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 313-320, 2004.

LEÓN, E.; AOUNI, R.; PISTON, F.; RODRÍGUEZ-QUIJANO, M.; SHEWRY, P.R.; MARTÍN, A.; BARRO, F. Stacking HMW-GS transgenes in bread wheat: Combining subunit 1Dy10 gives improved mixing properties and dough functionality. **Journal of Cereal Science**, v.51, p.13-20, 2010.

LERNER, S.E.; KOLMAN, M.A.; ROGERS, W.J. Quality and endosperm storage protein variation in Argentinean grown bread wheat. I. Allelic diversity and discrimination between cultivars. **Journal of Cereal Science**, v.49, p.337-345, 2009.

LI, J.; HAN, C.; ZHEN, S.; LI, X.; YAN, Y. Characterization of HMW glutenin subunit Bx7 OE and its distribution in common wheat and related species. *Plant Genetic Resources*, v. 12, n. 2, p. 191-198, 2014.

LI, Y.; HUANG, CH.; SUI, X.; FAN, Q.; LI, G.; CHU, X. Genetic variation of wheat glutenin subunits between landraces and varieties and their contributions to wheat quality improvement in China. *Euphytica*, v.169, p.159-168, 2009.

LI, X.; LIU, T.; SONG, L.; ZHANG, H.; LI, L.; GAO, X. Influence of high-molecular-weight glutenin subunit composition at *Glu-A1* and *Glu-D1* loci on secondary and micro structures of gluten in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Food Chemistry*, v. 213, p. 728-734, 2016.

LI, X.; LIU, D. C.; SUN, J. Z.; YANG, W. L.; GUO, X. L.; WANG, D. W.; ZHANG, A. M Characterization of novel high-molecular-weight glutenin subunits and their coding sequences in *Aegilops markgrafii*. *Journal of Cereal Science*, v. 65, p. 9-18, 2015.

LI, Y.; WU, Y.; HERNANDEZ-ESPINOSA, N.; PEÑA, R. J. The influence of drought and heat stress on the expression of end-use quality parameters of common wheat. *Journal of Cereal Science*, v. 57, n. 1, p. 73-78, 2013.

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.

LIANG, D.; TANG, J.; PEÑA, R.J.; SINGH, R.; HE, X.; SHEN, X.; YAO, D.; XIA, X.; HE, Z. Characterization of CIMMYT bread wheats for high- and low-molecular weight glutenin subunits and other quality-related genes with SDS-PAGE, RP-HPLC and molecular markers. *Euphytica*, v. 172, p. 235-250, 2010.

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

LIU, L.; WANG, A.; APPELS, R.; MA, J.; XIA, X.; LAN, P.; HE, Z.; BEKES, F.; YAN, Y.; MA, W. A MALDI-TOF based analysis of high molecular weight glutenin subunits for wheat breeding. *Journal of Cereal Science*, v. 50, p. 295-301, 2009.

LUKOW, O. M.; FORSYTH, S. A.; PAYNE, P. I. Over-production of HMW [High Molecular Weight] glutenin subunits coded on chromosome 1B in common wheat-*Triticum aestivum* [in Israel and Canada]. **Journal of Genetics and Breeding**, v. 46, p. 187-192, 1992.

MA, F; BAIK, B. Soft wheat quality characteristics required for making baking powder biscuits. **Journal of Cereal Science**, v. 79, p. 127-133, 2018.

MACCAFERRI, M.; ZHANG, J.; BULLI, P.; ABATE, Z.; CHAO, S.; CANTU, D.; DUBCOVSKY, J. A genome-wide association study of resistance to stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici) in a worldwide collection of hexaploid spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n. 3, p. 449-465, 2015.

MAGALLANES-LÓPEZ, A. M.; AMMAR, K.; MORALES-DORANTES, A.; GONZÁLEZ-SANTOYO, H.; CROSSA, J.; GUZMÁN, C. Grain quality traits of commercial durum wheat varieties and their relationships with drought stress and glutenins composition. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 1-9, 2017.

MANDARINO, J.M.G. **Aspectos importantes para a qualidade do trigo**, 1993.

MAUCHER, T.; FIGUEROA, J. D. C.; REULE, W.; PENA, R. J. Influence of low molecular weight glutenins on viscoelastic properties of intact wheat kernels and their relation to functional properties of wheat dough. **Cereal Chemistry Journal**, v. 86, p. 372-375. 2009.

MCCOUCH, S. R.; ZHAO, K.; WRIGHT, M.; TUNG, C. W.; EBANA, K.; THOMSON, M.; REYNOLDS, A.; WANG, D.; DECLERCK, G.; ALI, L.; MCCLUNG, A.; EIZENGA, G.; BUSTAMANTE, C. Development of genome-wide SNP assays for rice. **Breeding Science**, v. 60, n. 5, p. 524-535, 2010.

MIRANDA, M. Z. de; DE MORI, C.; LORINI, I. **Qualidade comercial do trigo brasileiro: safra 2007**. Embrapa Trigo, 2010.

MÓDENES, A.N.; SILVA, A.M. da; TRIGUEROS, D.E.G. Avaliação das propriedades reológicas do trigo armazenado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 508- 512, 2009.

MOHAN, D.; GUPTA, R. K. Gluten characteristics imparting bread quality in wheats differing for high molecular weight glutenin subunits at *Glu-D1* locus. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 21, n. 3, p. 447-451, 2015.

MOIRAGHI, M.; VANZETTI, L.; PFLÜGER, L.; HELGUERA, M.; PÉREZ, G. T. Effect of high molecular weight glutenins and rye translocations on soft wheat flour cookie quality. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 3, p. 424-430, 2013.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

OAK, M. D.; TAMHANKAR, S. A. 1BL/1RS translocation in durum wheat and its effect on end use quality traits. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 91-96, 2017.

OELOFSE, R. M.; LABUSCHAGNE; M. T.; DEVENTER, C. S. Influencing factors of sodium dodecyl sulfate sedimentation in bread wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 52, p. 96-99, 2010.

ORMOLI, L.; COSTA, C.; NEGRI, S.; PERENZIN, M.; VACCINO, P. Diversity trends in bread wheat in Italy during the 20th century assessed by traditional and multivariate approaches. **Scientific Reports**, v. 5, n. 8574, p. 1-7, 2015.

ORTH, R. A.; BUSHUK, W. Comparative study of the proteins of wheats of diverse baking qualities. **Cereal Chemistry**, v. 49, p. 286-275, 1972.

OSZVALD, M.; BALÁZS, G.; TOMOSKOZI, S.; BÉKÉS, F.; TAMÁS, L Comparative study of the effect of incorporated individual wheat storage proteins on mixing properties of rice and wheat doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9664-9672, 2011.

PARO P. Associação de gluteninas de alta massa molecular e qualidade de panificação em trigo: análise de proteínas e marcadores moleculares. 2011. 46f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon. 2011.

PAYNE, P. I.; CORFIELD, K. G.; HOLT, L. M.; BLACKMAN, J. A. Correlations between the inheritance of certain high-molecular weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, n. 1, p. 51-60, 1981.

PAYNE, P. I.; LAWRENCE, G. L. 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. **Cereal Research Communications**, v.11, p.29-35, 1983.

PAYNE, P. I.; NIGHTINGALE, M. A.; KRATTIGER, A. F.; HOLT, L. M. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.40, p.51-65, 1987.

PAYNE, R. W.; MURRAY, D. A.; HARDING, S. A.; BAIRD, D. B.; SOUTAR, D. M. An Introduction to GenStat for Windows (14th Edition). **VSN International**, Hemel Hempstead, UK, 2011.

PEÑA, R. J. **Wheat for bread and other foods**. Bread wheat improvement and production. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: FAO, 2002. Disponível em: <www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e00.htm#Contents> Acesso em: 30 maio 2016.

PERTEN, H. Application of the falling number method for evaluating alpha-amylase activity. **Cereal Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 127-140, 1964.

PIERGIOVANNI, A. R. Evaluation of genetic variation and grain quality of old bread wheat varieties introduced in north-western Italian environments. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, p. 325-333, 2013.

PRIOZI, M. R.; MARGIOTTA, B.; LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 117-122, 2008.

QI, W.; TANG, Y.; ZHU, W.; LI, D.; DIAO, C.; XU, L.; ZENG, J.; WANG, Y.; FAN, X.; SHA, L.; ZHANG, H. Molecular cytogenetic characterization of a new wheat-rye 1BL•1RS translocation line expressing superior stripe rust resistance and enhanced grain yield. **Planta**, v. 244, n. 2, p. 405-416, 2016.

RADOVANOVIC, N.; CLOUTIER S. Gene-assisted selection for high molecular weight glutenin subunits in wheat doubled haploid breeding programs. **Molecular Breeding**, n. 12, p. 51–59, 2003.

RAGUPATHY, R.; NAEEM, H. A.; REIMER, E.; LUKOW O.M.; SAPIRSTEIN, H.D.; CLOUTIER, S. Evolutionary origin of the segmental duplication encompassing the wheat *GLU-B1* locus encoding the overexpressed Bx7 (Bx7 OE) high molecular weight glutenin subunit. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, n. 2, p. 283-296, 2008.

RAKSZEGI, M.; PASTORI, G.; JONES, H. D.; BÉKÉS, F.; BUTOW, B.; LANG, L.; BEDO, Z.; SHEWRY, P. R. Technological quality of field grown transgenic lines of commercial wheat cultivars expressing the 1Ax1 HMW glutenin subunit gene. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 2, p. 310-321, 2008.

RASHEED, A.; T. MAHMOOD, A.; GUL-KAZI, A.; GHAFOOR, A.; MUJEEB-KAZI, A. Allelic variation and composition of HMW-GS in advanced derivatives from D-genome synthetic hexaploid × Bread wheat cross combinations. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 15, n.1, p. 1-7, 2012.

RASHEED, A.; XIA, X. YAN, Y.; APPELS, R.; MAHMOOD, T.; HE, Z. Wheat seed storage proteins: Advances in molecular genetics, diversity and breeding applications. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 11-24, 2014.

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.

RAVEL, C.; FIQUET, S.; BOUDET, J.; DARDEVET, M.; VINCENT, J.; MERLINO, M.; MICHARD, R.; MARTRE, P. Conserved cis-regulatory modules in promoters of genes encoding wheat high-molecular-weight glutenin subunits. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 621, 2014.

RIBEIRO, M.; RODRÍGUEZ-QUIJANO, M.; GIRALDO, P.; PINTO, L.; VÁZQUEZ, J.F.; CARRILLO, J.M.; IGREJAS, G. Effect of allelic variation at glutenin and puroindoline loci on bread-making quality: favorable combinations occur in less toxic varieties of wheat for celiac patients. **European Food Research Technology**, v. 243, p. 743-752, 2017.

SANCHEZ-GARCIA, M.; ÁLVARO, F.; PEREMARTI, A.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.A. Changes in bread-making quality attributes of bread wheat varieties cultivated in Spain during the 20th century. **European Journal of Agronomy**, v.63, p.79-88, 2015.

SAPIRSTEIN, H. D.; SUCHY, J. SDS-protein gel test for prediction of bread loaf volume. **Cereal Chemistry**, n. 76, p. 164-172, 1999.

SCHEUER, P. M.; FRANCISCO, A. D.; MIRANDA, M. D.; LIMBERGER, V. M. Trigo: Características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 211-222, 2011.

SHARMA, S.; RAM, S.; GUPTA, R.; SHARMA, I. Development of functional marker for distinguishing Glu-B3b allele of LMW-GS found in Indian common wheat cultivars. **Journal of Cereal Science**, v. 3, n. 57, p. 245-248, 2013.

SHEWRY, P. R.; D'OVIDIO, R.; LAFIANDRA, D.; JENKINS, J.A.; MILLS, E. C.; BÉKÉS, F. Wheat grain proteins. In: , P.R. (Ed.) **Wheat: chemistry and technology**, p. 223-298, AACC International Inc., 2009.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; TATHAM, A. S.; POPINEAU, Y.; LAFIANDRA, D.; BELTON, P. S The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties, **IACR- Long Ashton Research Station Department of Agricultural Sciences**, p. 219-302. 2003.

SHEWRY, P. R.; POPINEAU, Y.; LAFIANDRA, D.; BELTON, P. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 12, p. 433-441, 2001b.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. Biotechnology of wheat quality. **Journal of the Science and Food Agriculture**, n. 73, p. 397-406, 1997.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S.; FORDE, J., KREIS, M.; MIFLIN, B. J. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. **Journal of Cereal Science**, v. 4, n. 2, p. 97-106, 1986.

SCHMIDT, D. A. M.; CARVALHO, F. I. F. D.; OLIVEIRA, A. C. D.; SILVA, J. A. G. D.; BERTAN, I.; VALÉRIO, I. P.; HARTWIG, I.; DA SILVEIRA, G.; GUTKOSKI, L. C. Variabilidade genética em trigos brasileiros a partir de caracteres componentes da qualidade industrial e produção de grãos. **Bragantia**, v. 68, n. 1, p. 43-52, 2009.

SILVA, A. S.; NEDEL, J. L.; SCHÜSSLER DE VASCONCELLOS, N. J.; CRUZ, P. J.; SIMIONI, D. Composição de subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW) em trigos portadores do caráter stay-green. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, 2004.

SINGH, N.K., DONOVAN, R. AND MACRITCHIE, F. Use of genetical studies on the high-molecular-weight subunits sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. II. Relative quantity of glutenin as a measure of bread- making quality. **Cereal Chemistry**, n. 68, p. 161–170, 1990.

SINGH, S.; SINGH, N. N.; MAC RITCHIE, F.. Relationship of polymeric proteins with pasting, gel dynamic-and dough empirical-rheology in different Indian wheat varieties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 19-24, 2011.

SCHUSTER, I.; SOUZA, M. A. D.; CARDOSO, A. A.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A. Correlation between high molecular weight gluten subunits composition and bread-making quality in Brazilian wheat. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 4, 1997.

SMITH, R. L.; SCHWEDER, M. E.; BARNETT, R. D. Identification of glutenin alleles in wheat and triticale using PCR-generated DNA markers. **Crop Science**, v. 34, n. 5, p. 1373-1378, 1994.

SRINIVASAN, B.; FOCKE-TEJKL, M.; WEBER, M.; PAHR, S.; BAAR, A.; ATREYA, R.; NEURATH, M. F.; VOGELANG, H.; WUBER, W. D.; VALENTA, R. Usefulness of recombinant γ -gliadin 1 for identifying patients with celiac disease and monitoring adherence to a gluten-free diet. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 6, p. 1607-1618. e3, 2015.

STUDNICKI, M.; WIJATA, M.; SOBCZYŃSKI, G.; SAMBORSKI, S.; GOZDOWSKI, D.; ROZBICKI, J. Effect of genotype, environment and crop management on yield and quality traits in spring wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 72, p. 30-37, 2016.

SUKUMARAN, S.; DREISIGACKER, S.; LOPES, M.; CHAVEZ, P.; REYNOLDS, M. P. Genome wide association study for grain yield and related traits in an elite spring wheat population grown in temperate irrigated environments. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 353-363, 2015.

SURMA, M.; ADAMSKI, T.; BANASZAK, Z.; KACZMAREK, Z.; KUCZYNSKA, A.; MAJCHER, M.; KRYSKOWIAK, K. Effect of genotype, environment and their interaction on quality parameters of wheat breeding lines of diverse grain hardness. **Plant Production Science**, v. 15, n. 3, p. 192-203, 2012.

TERASAWA, Y.; TAKATA, K.; HIRANO, H.; KATO, K.; KAWAHARA, T.; SASAKUMA, T.; SASANUMA, T. Genetic variation of high-molecular-weight glutenin subunit composition in Asian wheat. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, p. 283-289, 2011.

TOHVER, M. High molecular weight (HMW) glutenin subunit composition of some Nordic and Middle European wheats. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 67-81, 2007.

TUNCIL, Y. E.; JONDIKO, T.; TILLEY, M.; HAYS, D. B.; AWIKA, J. M. Combination of null alleles with 7+ 9 allelic pair at *Glu-B1* locus on the long arm of group 1 chromosome improves wheat dough functionality for tortillas. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 683-688, 2016.

USDA. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Databases: production, supply and distribution online. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>> Acesso: 29 jan. 2018.

VAPA L. Genetic variability of HMW glutenins in Yugoslav winter wheat cultivars. **Podravka**. v. 7, p. 31-43, 1989.

VANCINI, C.; TORRES, G.A.M.; CONSOLI, L.; BONOW, S.; GRANDO, M. F. **Efetividade de método para distinção de cultivares de trigo e avaliação de homogeneidade genética**. Embrapa Trigo, 2016. (Embrapa Trigo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento online, 84).

VAWSER, M. J.; CORNISH, G. B. Over-expression of HMW glutenin subunit *Glu-B1* 7x in hexaploid wheat varieties (*Triticum aestivum*). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, n. 5, p. 577-588, 2004.

VÁZQUEZ, D.; BERGER, A. G.; CUNIBERTI, M.; BAINOTTI, C.; MIRANDA, M. Z.de; SCHEEREN, P.L.; JOBET, C.; ZÚÑIGA, J.; CABRERA, G.; VERGES, R.; PEÑA, R.J. Influence of cultivar and environment on quality of Latin American wheats. **Journal of Cereal Science**, v. 56, p. 196-203, 2012.

VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to bread-making functionality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 179-208, 2002.

VIOLA, R.; BENIN, G.; CASSOL, L. C.; PINNOW, C.; FLORES, M. F.; BORNHOFEN, E. Adubação verde e nitrogenada na cultura do trigo em plantio direto. **Bragantia, Campinas**, v. 72, p. 1-11, 2013.

VOSS-FELS, K.; FRISCH, M.; QIAN, L.; KONTOWSKI, S.; FRIEDT, W.; GOTTWALD, S.; SNOWDON, R. J. Subgenomic diversity patterns caused by directional selection in bread wheat gene pools. **The Plant Genome**, v. 8, n. 2, p. 1195- 1206, 2015.

WALULU, R. S.; ROSENOW, D. T.; WESTER, D. B.; NGUYEN, H. T. Inheritance of the stay green trait in sorghum. **Crop Science**, v. 34, n. 4, p. 970-972, 1994.

WANG G.; SNAPE J.W.; HU H.; ROGERS W. J. The high-molecular-weight glutenin subunit compositions of Chinese bread wheat varieties and their relationship with bread-making quality. **Euphytica**, n. 68, p. 205–212. 1993.

WANG, C.; SHEN, X.; WANG, K.; LIU, Y.; ZHOU, J.; HU, Y.; ZELLER, F. J.; HSAM, S. L. K.; YAN, Y. Molecular characterization and functional properties of two novel x-type HMW-GS from wheat line CNU608 derived from Chinese Spring× *Ae. caudata* cross. **Journal of Cereal Science**, v. 68, p. 16-24, 2016.

WANG, J. J.; LIU, G.; HUANG, Y. B.; ZENG, Q. H.; SONG, G. S.; HOU, Y.; HU, S. Q. Role of N-terminal domain of HMW 1Dx5 in the functional and structural properties of wheat dough. **Food Chemistry**, v. 213, p. 682-690, 2016.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115-119, 2007.

WRIGLEY, C.; ASENSTORFER, R.; BATEY, I.; CORNISH, G.; DAY, L.; MARES, D.; MRVA, K. The biochemical and molecular basis of wheat quality. In: **Wheat Science and Trade**. Wiley-Blackwell, p.495-520. 2009.

WURSCHUM, T.; LEISER, W.L.; KAZMAN, E.; LONGIN, C.F.H. Genetic control of protein content and sedimentation volume in European winter wheat cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 196, p. 1685-1696, 2016.

XU, Q.; XU, J.; LIU, C. L.; CHANG, C.; WANG, C. P.; YOU, M. S.; LI, B. Y.; LIU, G. T. PCR-based markers for identification of HMW-GS at *Glu-B1x* loci in common wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 3, p. 394-398, 2008.

YAN, Y. M.; JIANG, Y.; AN, X. L.; PEI, Y. H.; LI, X. H., ZHANG, Y. Z.; WANG, A. L.; HE, Z.; XIA, X.; BEKES, F.; MA, W. Cloning, expression and functional analysis of HMW glutenin subunit 1By8 gene from Italy pasta wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum). **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 398-406, 2009.

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.

ZANKE, C. D., LING, J., PLIESKE, J., KOLLERS, S., EBMEYER, E., KORZUN, V.; ARGILLIER, O.; STIWIE, G.; HINZE, M.; NEUMANN, F.; EICHHORN, A.; POLLEY, A.; JAENECKE, C.; GANAL, M. W.; EICHHORN, A. Analysis of main effect QTL for thousand grain weight in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by genome-wide association mapping. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 644, 2015.

ZHANG, X.; LIU, D.; YANG, W.; LIU, K.; SUN, J.; GUO, X.; ZHANG, A. Development of a new marker system for identifying the complex members of the low-molecular-weight glutenin subunit gene family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, n. 8, p. 1503-1516, 2011.

ZHAO, C.; CUI, F.; WANG, X.; SHAN, S.; LI, X.; BAO, Y.; WANG, H. Effects of 1BL/1RS translocation in wheat on agronomic performance and quality characteristics. **Field Crops Research**, v.127, p.79-84, 2012.

ZHENG, S.; BYRNE, P. F.; HALEY, S. D.; SHAN, X.; REID, S. D. Glutenin allelic variation and 1AL.1RS effects on dough mixing properties of wheat grown in irrigated and rainfed environments. **Euphytica**, v.176, p.357-369, 2010.



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV