

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

PATRICIA PARO

**ASSOCIAÇÃO DE GLUTENINAS DE ALTA MASSA MOLECULAR E QUALIDADE
DE PANIFICAÇÃO EM TRIGO: ANÁLISE DE PROTEÍNAS E MARCADORES
MOLECULARES**

Marechal Cândido Rondon

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

PATRICIA PARO

**ASSOCIAÇÃO DE GLUTENINAS DE ALTA MASSA MOLECULAR E QUALIDADE
DE PANIFICAÇÃO EM TRIGO: ANÁLISE DE PROTEÍNAS E MARCADORES
MOLECULARES**

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do grau de mestre no programa de pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa

Marechal Cândido Rondon

2011

Aos meus pais Claudecir e Maria de Lourdes
Às minhas irmãs Fernanda e Cristiane

AGRADECIMENTOS

Meu profundo agradecimento a todas as pessoas que estiveram presentes no decorrer do mestrado, colegas de classe e de trabalho, professores, amigos, familiares, cada um tornou-se parte do alicerce desse projeto e com toda a certeza sem a presença de vocês não teria sido concretizado.

A Deus pela vida e toda a energia que nos rege!

Ao professor Doutor Ivan Schuster pela orientação, confiança, atenção e aprendizado.

Ao Professor Doutor Antônio Carlos Torres da Costa pela orientação e ajuda no decorrer do mestrado.

À Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola por disponibilizar todas as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade de aprendizado.

À Fundação Araucária pela concessão de bolsa de estudo.

À toda equipe do Laboratório de Biotecnologia da COODETEC pela ajuda nas análises e desenvolvimento do projeto.

Ao Projeto Trigo pela iniciativa, incentivo e confiança em mim depositada.

A minhas amigas Laura, Crisleine, Mônica, Joselaine, Patricia, Andressa, Lorena, Cristiane e Monise pela força, apoio e carinho.

Ao meu amigo conselheiro, companheiro de viagem e estudo Thiago Roberto Zibetti Gonçalves.

A Gilmar Savi pelo companheirismo, paciência, compreensão e carinho.
Á minha família pela confiança, amor, presença e apoio.

ASSOCIAÇÃO DE GLUTENINAS DE ALTA MASSA MOLECULAR E QUALIDADE DE PANIFICAÇÃO EM TRIGO: ANÁLISE DE PROTEÍNAS E MARCADORES MOLECULARES

RESUMO

O trigo é uma espécie de grande importância na alimentação humana, de seus grãos é extraída a farinha de trigo utilizada no preparo de diversos produtos alimentícios. As propriedades reológicas da farinha de trigo são características que determinam o destino final da farinha, sendo de grande importância a sua avaliação. Em programas de melhoramento genético do trigo a determinação da qualidade de farinha é indispensável para o desenvolvimento de cultivares, e é necessário que a leitura dos parâmetros de qualidade sejam realizados precocemente, com a utilização de pouca quantidade de amostra, confiáveis e a nível de genótipo. Este trabalho teve por objetivo a validação de marcadores moleculares para a seleção de genótipos a partir de gluteninas de alta massa molecular, visto que apresentam grande influência na qualidade de panificação da farinha de trigo e verificar a correlação existente entre parâmetros de qualidade de farinha e as gluteninas de alta massa molecular. As análises foram realizadas no laboratório de biotecnologia da COODETEC utilizando 77 amostras de trigo (linhagens e cultivares) provenientes do programa de melhoramento genético de trigo da instituição, com dados de qualidade tecnológica da farinha de trigo já caracterizados. O conjunto de primers denominados Glu1-Dx5-Dx2 foi utilizado para selecionar indivíduos que continham o conjunto de subunidades Glu1-Dx5+Dy10 através da técnica de PCR, porém foram necessários ajustes para que o marcador amplificasse o fragmento correspondente ao alelo Glu1-Dx5. Para verificar a confiabilidade do marcador molecular todas as amostras foram caracterizadas através de eletroforese de proteínas pelo método SDS-PAGE, e escoreadas em função das subunidades de gluteninas de alta massa molecular que apresentam. Os resultados entre a análise de proteína e molecular apontam divergências, indicando que para a utilização do marcador molecular deve ser utilizada com algum controle na reação de PCR. A partir dos dados coletados e os de qualidade de farinha os resultados foram submetidos a análise de correlação de Pearson. Verifica-se que o escore de proteína é positivamente correlacionado com W, P e P/L, indicando que a composição de gluteninas de alta massa molecular apresentam influência significativa na qualidade de farinha de trigo. Os alelos Glu1-Dx5 e as subunidades do genoma A estão positivamente correlacionados com escore de proteína e conseqüentemente com a qualidade e panificação do trigo. Os variantes alélicos do genoma A foram positivamente correlacionados com W e P. A partir dos resultados conclui-se que a seleção de genótipos de trigo com qualidade superior de farinha podem ser realizados levando em consideração as gluteninas de alta massa molecular codificadas pelos genomas A e D do trigo.

Palavras-chave: eletroforese por SDS-PAGE, *Triticum aestivum*, PCR, alveografia.

ASSOCIATION OF HIGH MOLECULAR GLUTENIN AND BAKING QUALITY OF WHEAT: ANALYSIS OF PROTEINS AND MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT

The wheat is a species of great importance in human nutrition, wheat grain is extracted from wheat flour used in the preparation of various food products. The rheological properties of wheat flour is a feature that determines the fate of the flour, being of great importance to this assessment. In breeding programs for wheat determining the quality of flour is essential for the development of cultivars, and it is necessary that the reading of the quality parameters are carried out early, with the use of small amounts of sample, reliable and the level of genotype. The development of this work aimed at the validation of molecular markers for selection of genotypes from high molecular weight glutenin, given their great influence on baking quality of wheat flour and check the correlation between parameters of quality of flour and the high molecular weight glutenin. Analyses were performed in the laboratory of biotechnology COODETEC using 77 samples of wheat (cultivars and lines) from program for wheat breeding of the institution, with data quality technology of wheat flour has characterized. The set of primers called Glu1-DX2-DX5 was used to select individuals that contained subunits Glu1-DX5 + Dy10 by PCR, nevertheless was necessary to make adjustments so that the marker amplified a fragment corresponding to allele Glu1-DX5. To check the reliability of molecular marker, all samples were characterized by electrophoresis of proteins by SDS-PAGE method and scores as a function of the subunits of glutenin high molecular weight they have. The results of the analysis of protein and molecular differ, indicating that the use of molecular markers should be used with any control in the PCR reaction. From the data collected and the quality of flour, the results were submitted to Pearson correlation analysis. It appears that the score of the protein is positively correlated with W, P and P / L, indicating that the composition of glutenin high molecular weight have significant influence on quality of wheat flour. Alleles Glu1-DX5 and the subunits of the A genome are positively correlated with protein scores and consequently with the wheat breadmaking. The allelic variants of the A genome were positively correlated with W and P. From the results it is concluded that the selection of genotypes with superior quality of flour can be made taking into account the high molecular weight glutenin encoded by the A and D genomes of wheat.

Key-words: electrophoresis on SDS-PAGE, *Triticum aestivum*, PCR, alveography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Alveograma. Ilustração da curva de alveografia, indicando suas características	17
Figura 2: Estrutura de gluteninas de alta massa molecular.....	20
Figura 3: Característica estrutural das gluteninas de alta massa molecular	21
Figura 4: Localização cromossômica dos locos que codificam as proteínas formadoras de glúten	22
Figura 5: Perfil de gluteninas de alta massa molecular proposto por Payne, 1987...	23
Figura 6: Amplificação do loco Glu1-Dx5 utilizando diferentes temperaturas de anelamento.....	31
Figura 7: Perfil de gluteninas de alta massa molecular (HMW) das amostras utilizadas como padrão, pelo método SDS-PAGE.	32
Figura 8: Amplificação com o marcador molecular Glu1-Dx5 em parte da população analisada.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de trigo no Brasil, conforme a atual legislação nacional.....	19
Tabela 2: Classificação de trigo no Brasil prevista a vigorar a partir de Julho de 2011	19
Tabela 3: Escore qualitativo das subunidades de gluteninas de alta massa molecular ¹	30
Tabela 4: Coeficientes de correlação simples entre subunidades de gluteninas de alta massa molecular, alelo 1D5x e dados reológicos em farinha de trigo.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Origem e Domesticação do Trigo.....	12
2.2 O Trigo e sua Importância Econômica	13
2.3 Características do Grão de Trigo	14
2.4 Proteínas do Trigo	15
2.5 Qualidade Tecnológica da Farinha de Trigo	16
2.5.1 Alveografia.....	17
2.5.2 Classificação da qualidade da farinha de trigo no Brasil.....	18
2.6 Contribuição de Gluteninas de Alta Massa Molecular na Qualidade de Farinha de Trigo	20
2.7 Marcadores Moleculares na Seleção de Gluteninas de Alta Massa Molecular	25
3.1 Alveografia	26
3.2 Extração de DNA e Análise de PCR.....	26
3.3 Extração de Gluteninas de Alta Massa Molecular	28
3.4 Eletroforese de Gluteninas de Alta Massa Molecular	28
3.5 Análise dos Dados.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Correlação de Escore com W, P, P/L.....	35
4.2 Influência do Genoma D em Parâmetros de Qualidade da Farinha de Trigo	37
4.3 Influência do Genoma A em Parâmetros de Qualidade de Farinha de Trigo	38
5 CONCLUSÕES	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O trigo é um importante cereal cultivado para a alimentação humana. É fonte de carboidratos, proteínas e minerais. Possui em sua estrutura as proteínas formadoras do glúten, uma característica peculiar da espécie. O glúten propicia que a farinha de trigo seja utilizada para preparar pães fermentados, massas alimentícias, biscoitos entre outros produtos, pois, quando hidratado forma uma rede viscoelástica capaz de reter gás carbônico formado durante o processo de fermentação. Existem análises que verificam a qualidade do glúten como a alveografia, que apresentam parâmetros da força de glúten. Em função dos resultados do teste de alveografia o trigo é destinado à produção de determinado produto. Por exemplo, há produtos como biscoitos que necessitam de farinha com baixa força de glúten ou para a fabricação de pão que necessitam de farinha com alta força de glúten.

O glúten é formado por duas proteínas as gliadinas e gluteninas, que influenciam na qualidade do glúten. As gliadinas conferem a extensibilidade da massa e as gluteninas conferem a elasticidade. As gluteninas são divididas em gluteninas de alta e baixa massa molecular, de acordo com a sua mobilidade em gel SDS-PAGE enquanto que gliadinas são classificadas como α -, β -, γ - e ω -gliadinas com base na sua mobilidade eletroforética em sistema A-PAGE.

As proteínas formadoras do glúten são produtos diretos da transcrição e tradução dos genes o que possibilita realizar a identificação varietal através das proteínas ou mesmo através dos locos que as codificam. Técnicas como a eletroforese de proteínas e análise molecular tem sido utilizadas na identificação de gluteninas e gliadinas.

A importância das gluteninas na qualidade de farinha de trigo tem sido relatada em diversos estudos. A associação de gluteninas e qualidade de farinha de trigo têm sido intensamente estudadas por instituições de pesquisa, principalmente pelas entidades de melhoramento genético de trigo.

Os objetivos deste trabalho foram identificar gluteninas de alta massa molecular através da técnica de eletroforese de proteínas e por marcadores moleculares, verificar a influência de tais alelos/proteínas na qualidade tecnológica da farinha de trigo através da análise de correlação e validar marcadores

moleculares a serem utilizados no programa de melhoramento genético assistido do trigo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem e Domesticação do Trigo

O trigo foi o responsável pelo surgimento da agricultura e o responsável pela sobrevivência do *Homo sapiens* na região do Crescente Fértil, que compreende a porção africana ao Norte do Vale do Nilo e a parcela asiática, na Mesopotâmia, dos rios Tigre e Eufrates hoje Iraque e Kuwait e o corredor sírio-palestiniano, agora Líbano, Jordânia, Israel, Síria e Palestina (RAE, 2008).

A domesticação do trigo selvagem foi um processo que modificou drasticamente esta espécie. A planta de trigo foi sem dúvida uma das primeiras espécies a ser cultivada e originou-se do cruzamento natural entre gramíneas silvestres que existiam nas proximidades dos rios Tigre e Eufrates (SILVA et al, 1996). Botanicamente o trigo faz parte da família Poaceae (gramíneas) pertencendo ao gênero *Triticum*. Conforme o número de cromossomos que possui é dividido em diplóide ($2n=2x=14$, AA), tetraplóide ($2n=4x=28$ = AABB) e hexaplóide ($2n=6x=42$ =AABBDD).

Evidências apontam que a espécie doadora do genoma A do trigo é uma gramínea selvagem encontrada no Crescente Fértil, *Triticum boeoticum*, pois juntamente com restos deste trigo selvagem foram encontrados os trigos diplóides domesticados (AA) conhecido como *Triticum monococcum*, caracterizada por apresentar apenas um grão por espiguetas. Essa espécie apareceu em diversas regiões no Irã e Turquia. Juntamente com o trigo selvagem diplóide, porém em ambientes mais restritos, encontrou-se uma espécie de gramínea a *Aegilops speltoides* que é tida como a possível doadora do genoma B do trigo. *A. speltoides* é uma gramínea de polinização cruzada e foi o parental feminino do cruzamento com trigo selvagem que pode ter dado origem ao trigo tetraplóide selvagem, *T. dicoccoides* (AABB). Possivelmente, o progenitor selvagem do genoma D do trigo é *Aegilops squarrosa*, uma gramínea pouco robusta com ampla adaptação, particularmente a climas frios. Acredita-se que o pólen de *A. squarrosa* polinizou a espécie materna tetraplóide (*T. didocoides*) para dar origem ao trigo hexaplóide (AABBDD) (EVANS, 1998). Desde então, o trigo hexaplóide vem sendo manipulado pelo homem e sofrendo uma grande alteração em sua base genética (BERED et al.,

2000). Os trigos hexaplóides são os mais variáveis e adaptados para diferentes regiões climáticas e nichos edáficos que os trigos tetraplóides, e representam atualmente cerca de 90% da produção total de trigo no mundo (MAC KEY, 2005; PIANA & CARVALHO, 2008). Seu cultivo se espalhou rapidamente ao redor do mundo em diversos tipos de ambiente. A ampla adaptação do trigo dá-se principalmente pela introdução do genoma D, que também conferiu a característica de pão da espécie *T. vulgare* (EVANS, 1998).

Existem diversas espécies diferenciadas de trigo silvestres ou cultivados, porém atualmente apenas duas apresentam grande importância econômica, o trigo comum *Triticum aestivum* sin. *Triticum vulgare*, e o trigo duro, *T. turgidum* var. *durum* (ROSSI & NEVES, 2004; PIANA & CARVALHO, 2008; BRAMMER et al., 2001). O trigo comum representa 90% da produção mundial de trigo sendo, o restante a produção do trigo duro.

2.2 O Trigo e sua Importância Econômica

A cultura do trigo alimenta toda a humanidade e está presente em praticamente todos os alimentos que consumimos (FRANCO, 2011), é fonte de carboidratos, proteínas, sais e minerais. A espécie dispersou-se pelo mundo tornando-se o principal cereal cultivado (PIANA & CARVALHO, 2008). Dos grãos de trigo é extraída a farinha que pode ser utilizada para o preparo de diversos tipos de alimentos como pães, massas alimentícias, bolos, biscoitos, entre outros.

Segundo EMBRAPA (2008), a história do trigo no Brasil iniciou em 1534 na antiga Capitania de São Vicente. Em 1940 foi disseminada comercialmente para o Rio Grande do Sul. O cultivo no Paraná teve início nessa mesma época realizado pelos colonos do Sul do estado que plantavam sementes de trigo trazidas da Europa em solos relativamente pobres.

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2010) a FAO (Food and Agriculture Organization) divulgou que a produção mundial do cereal está estimada em aproximadamente 651 milhões de toneladas na safra 2010/11 enquanto a demanda está em torno de 661 milhões de toneladas, que será suprida pelos estoques mundiais que atualmente está em torno de 187 milhões de toneladas. O Brasil estima ter colhido cerca de 5,6 milhões de toneladas do cereal

(2010/11) um aumento de 11,5% em relação a safra anterior. Contudo, tal produção não supre a demanda nacional em torno de 10,4 milhões de toneladas do grão, suprida por importações do produto. A área total de cultivo de trigo no Brasil na safra 2009/2010 foi de 2,428 milhões de hectares, e a previsão para a safra 2010/2011 é de que a área cultivada sofra uma redução de 11,8% ou seja, 2.142,7 milhões de hectares. Apesar da diminuição da área cultivada, espera-se que o rendimento seja 11,5% maior que da safra anterior.

2.3 Características do Grão de Trigo

Existem variados tipos de grãos de trigo em relação ao tamanho, formato e cor, mas de forma geral, apresentam forma oval com as extremidades arredondadas, sendo que em uma das extremidades encontra-se o germe e na outra, os tricomas. O fruto do cereal é denominado grão ou cariopse. A cariopse é formada por uma cobertura do fruto, o pericarpo, o qual envolve a semente e se adere fortemente a ela. Esta por sua vez é constituída pelo embrião e pelo endosperma, cercados pelas camadas de hialina e testa (onde estão os pigmentos que dão cor ao grão) (GERMANI, 2008; GUTKOSKI, 2009).

O endosperma representa mais de 80% do volume da cariopse do trigo, sendo constituído de amido e proteínas de reserva. A camada mais externa do endosperma, chamada camada de aleurona, contém reservas de proteína e lipídios, e reveste o endosperma amiláceo e o embrião ou gérmen (MCKEVITH, 2004).

A composição do grão de trigo é variada dependendo da porção em questão. O pericarpo representa aproximadamente 5% do peso do grão, é rico em pentosanas, celulose, cinzas e proteína. A aleurona (7%) é uma camada rica em cinza (fósforo, fitato), proteína, lipídios, vitaminas (niacina, tiamina, riboflavina) e enzimas. O endosperma (82%) é composto basicamente de amido, mas sua parte mais externa (subaleurona) contém mais proteína que a porção interna. O gérmen (3%) tem alto conteúdo de proteína, lipídios, açúcares redutores e cinzas (GERMANI, 2008).

2.4 Proteínas do Trigo

A farinha de trigo é a única entre outros tipos de farinha que possui em sua composição as proteínas formadoras do glúten. O grão de trigo pode apresentar de 6 a 21% de proteína em sua composição (MIRANDA, 2000a). As proteínas do trigo podem ser classificadas, conforme a sua solubilidade, em: gluteninas (glutelinas), gliadinas (prolaminas), albuminas e globulinas. As albuminas são solúveis em água, as globulinas em soluções diluídas de sal, as prolaminas (gliadinas) são solúveis em soluções alcoólicas e as gluteninas são solúveis em soluções ácidas ou alcalinas diluídas (PIZZINATTO, 1997; MIRANDA, 2000a; GERMANI, 2008).

As albuminas e globulinas representam aproximadamente 15% do total de proteínas do trigo e encontram-se concentradas no aleurona, farelo e gérmen, e não possuem a capacidade de formar glúten. As prolaminas e glutelinas constituem aproximadamente 85% do total de proteína e proteínas de reserva, sendo dispostas basicamente no endosperma do grão (MIRANDA, 2000b).

O glúten é formado pelas proteínas gliadinas e gluteninas que conferem a massa hidratada características viscoelásticas, sendo importante na qualidade tecnológica da farinha de trigo. O glúten é uma substância fibrosa, elástica, pegajosa que ao contato com a água é capaz de absorvê-la três vezes seu peso, sendo, portanto responsável pela retenção de maior parte da umidade na massa e no pão assado, servindo como elemento de conservação e maciez dos produtos acabados (MIRANDA, 2000b).

As gliadinas conferem a extensibilidade da massa e as gluteninas conferem a elasticidade sendo responsáveis, portanto, pela estrutura do pão, formando uma rede elástica (SILVA et al, 2004). Quando a farinha de trigo é hidratada e sofre ação mecânica gluteninas e gliadinas interagem e formam uma rede viscoelástica, a rede de glúten (GERMANI, 2008). Essa característica permite que o trigo seja utilizado para preparar pães fermentados, pois essa rede de glúten propicia o armazenamento do gás carbônico formado durante a fermentação, dando então forma ao pão (BRAMMER, 2000). A viscoelasticidade apresentada pela massa de farinha de trigo também propicia a produção de macarrão, massas, biscoitos e bolos, sendo que para cada tipo de alimento é necessário um determinado tipo de farinha, de acordo com a força do glúten.

É interessante que haja proteína em quantidade e qualidade adequadas para formar o glúten, sendo necessário ser avaliado tal parâmetro qualitativa e quantitativamente (GERMANI, 2008). Parâmetros como conteúdo de proteína e a proporção de gluteninas e gliadinas estão relacionados com a qualidade de panificação (DELLAVALLE et al., 2006; PELTONEN, 1992). A qualidade do glúten é em grande parte definida por característica varietal, mas também sofre influência pelo ambiente como descrito por Cazzeta et al. (2008), que verificou que a quantidade de proteína aumenta de forma linear com adubação nitrogenada aumentando também a força geral do glúten. A qualidade tecnológica do trigo (principalmente força de glúten e atividade da enzima alfa amilase) também são afetadas por variações meteorológicas (chuva, granizo, geada, etc) e tipo de solo (MIRANDA, 2000). O conteúdo de proteínas é uma característica complexa, controlado por fatores quantitativos poligênicos com baixa herdabilidade e alta influência do ambiente (RUIZ, et al., 2005; MIRANDA, 2000b).

As proteínas formadoras do glúten são produtos diretos da transcrição e tradução dos genes, podendo-se dessa forma realizar a identificação varietal através dessas proteínas, pois, elas refletem o genótipo e a história do trigo (RUIZ et al. 2005).

2.5 Qualidade Tecnológica da Farinha de Trigo

As propriedades reológicas da farinha de trigo estão entre os principais fatores que influenciam a produção de novas cultivares, pois determinam o uso final da farinha de trigo. A qualidade da farinha de trigo é uma característica complexa que é influenciada pela interação genótipo x ambiente, e sendo controlada por vários genes.

Existem várias técnicas para verificar a qualidade do trigo. A composição física, química e reológica é avaliada usualmente para a determinação da qualidade do trigo, verificando-se o conteúdo de proteína, de glúten, de minerais, de impurezas, a atividade da enzima α -amilase, a cor e também a força da massa da farinha de trigo ou força de glúten.

2.5.1 Alveografia

A alveografia é o teste realizado para medir a força da farinha, feito em alveógrafo Chopin de acordo com o método AACC 54-30A (GRANOTEC, 2003). A análise simula o comportamento da massa durante a fermentação, imitando em grande escala a formação de alvéolos originados na massa pelo CO₂ produzido pelos fermentos. Os resultados são apresentados pela curva alveográfica (Figura 1) que é calculada a partir de três curvas obtidas. Para a obtenção do resultado da alveografia realizam-se cinco repetições e ao final são considerados apenas três resultados, geralmente desconsideram-se os resultados que se apresentam discrepantes dos demais, ocorrendo principalmente pela prematura ruptura da bolha.

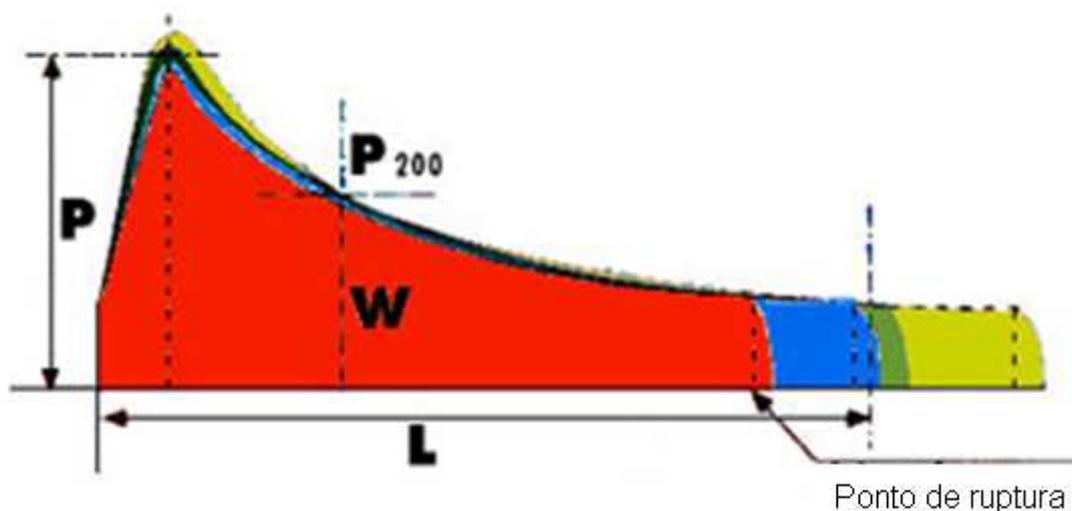


Figura 1: Alveograma. Ilustração da curva de alveografia, indicando suas características

A força de glúten (W) é expressa em Joules (na escala de 10^{-4} J), representando o trabalho de deformação da massa, o que indica a qualidade de panificação da farinha (força da farinha). O valor de W é calculado em função da quantidade de ar inflado até a ruptura da massa, como demonstrado na figura 1 W corresponde à capacidade que a massa possui de ser esticada representada no gráfico pelos eixos x e y.

A tenacidade (P), expressa em mm, é a pressão máxima necessária para expandir a massa, é uma medida da capacidade de absorção de água da farinha. A

extensibilidade (L), expressa em mm, é a capacidade de extensão da massa, sem que ela se rompa, predizendo dessa forma, o volume do pão. A relação P/L expressa o equilíbrio da massa, em relação a extensibilidade e elasticidade. O índice de elasticidade (Ie) é definido pela relação P200/P máximo do alveograma, sendo expresso em porcentagem. P200 é medido depois de insuflar 200cm de ar na massa, que corresponde a 4 cm após o início da curva, sendo a relação P200/P relativa a elasticidade da massa. Está intimamente correlacionado aos fenômenos de recuperação da forma inicial após a deformação, permitindo uma melhor predição do comportamento reológico da massa usada em panificação industrial e produção de biscoitos. O índice de elasticidade varia de 25 a 75% (MIRANDA et al., 2009).

2.5.2 Classificação da qualidade da farinha de trigo no Brasil

Conforme a legislação vigente, IN nº 7 do MAPA, de 15 de agosto de 2001, denominada "Regulamento técnico de identidade e qualidade do trigo", o cereal é classificado como trigo brando, pão, melhorador e trigo para outros usos, conforme demonstrado na tabela 1 (BRASIL, 2001). A classificação atual está prevista para vigorar até julho de 2011 quando, entrará em vigor a IN nº 38 do MAPA, de 30 de novembro de 2010, denominada "Regulamento Técnico do Trigo" onde o cereal será dividido em dois grupos. O grupo I, destinado diretamente a alimentação humana e o tipo II á moagem e a outras finalidades, sendo o grupo II classificado em melhorador, pão, doméstico, básico e para outros usos, conforme apresentado na tabela 2 (BRASIL, 2010).

O trigo tipo brando é destinado a produção de bolos, biscoitos doces, produtos de confeitaria, pizzas e massa tipo caseira, pois tais produtos requerem a massa de farinha com força de glúten fraca. O trigo tipo pão se enquadra na produção do pão francês, alguns tipos de massas alimentícias secas e folhadas, macarrão, entre outros produtos que requerem farinha com força média. O tipo melhorador é utilizado para mesclar farinhas tipo brando possibilitando a produção de pães, massas alimentícias, biscoitos tipo crackers, pão tipo hambúrguer e de forma, entre outros (CAZETTA et al., 2008).

O número de queda é utilizado para a determinação indireta do nível da atividade da enzima α -amilase no grão de trigo. É uma análise que verifica se as

condições de umidade no período da colheita e armazenamento foram ideais. A enzima α -amilase é responsável pela degradação do amido de reserva no grão para converter em energia para a germinação da semente.

A estabilidade da farinha de trigo é um item que será avaliado na determinação de qualidade, quando entrar em vigor a nova legislação. É uma avaliação realizada para determinar a tolerância da massa de farinha ao tempo de mistura e também está relacionado com a força da farinha, sendo o resultado expresso em minutos.

Tabela 1: Classificação de trigo no Brasil, conforme a atual legislação nacional

Classe comercial	W - Força de Glúten (x 10⁻⁴ J) mínimo	Número de queda (s) mínimo
Trigo Brando	50	200
Trigo Pão	180	200
Trigo Melhorador	300	250
Trigo para outros usos	Qualquer	< 200
Trigo Durum	-	250

FONTE: BRASIL, (2001).

Tabela 2: Classificação de trigo no Brasil prevista a vigorar a partir de Julho de 2011

Classe comercial	Força de Glúten -W (x10⁻⁴ J) valor mínimo	Estabilidade – EST (min) valor mínimo	Número de queda – NQ (s) valor mínimo
Melhorador	300	14	250
Pão	220	10	220
Doméstico	160	6	220
Básico	100	3	200
Outros usos	Qualquer	Qualquer	Qualquer

FONTE: BRASIL, (2010).

Toda a produção que atende aos parâmetros exigidos ao tipo II é destinada a indústria moageira. Quando o trigo colhido não apresentar os parâmetros mínimos de qualidade, a produção é destinada ao consumo animal. Os moinhos recebem amostras de trigo e analisam sua qualidade, levando-se em consideração o peso hectolitro (PH), número de queda, força de glúten, cor e outros parâmetros, sendo as amostras recebidas, mesclas de diversas variedades. A partir dessa mescla inicia-se a produção da farinha de trigo segmentando produtos para atender ao mercado consumidor (MIRANDA et al., 2010). O trigo consumido no Brasil é segmentado em

classes comerciais, aproximadamente 55% é utilizado para a panificação, 17% para uso doméstico, 15% para a produção de massas alimentícias, 11% para a fabricação de biscoitos e 2% para outros usos (CUNHA, 2008).

A nova classificação de trigo tornou-se mais rigorosa em relação ao número de queda para alguns tipos de trigo, como demonstrados nas tabelas 1 e 2.

2.6 Contribuição de Gluteninas de Alta Massa Molecular na Qualidade de Farinha de Trigo

As gluteninas são polímeros de proteínas possuindo massa molecular maior que 20 kiloDaltons. Unidas por ligações dissulfeto formam grupos de polímeros, e são classificadas conforme a sua mobilidade eletroforética. As gluteninas com massa molecular que variam de 80 a 120 kiloDaltons são conhecidas como gluteninas de alta massa molecular (HMW - High Molecular Weight), enquanto gluteninas com massa variando de 30 a 40 kiloDaltons são denominadas gluteninas de baixa massa molecular (LMW - Low Molecular Weight) (PAYNE, 1987).

As gluteninas de alta massa molecular possuem em sua estrutura domínios não repetitivos N- e C-terminal, sendo muitos resíduos de cisteína localizados nos domínios terminais (figura 2). No domínio N-terminal de um grande número de subunidades tipo-x há três resíduos de cisteína e em pequeno número as subunidades tipo-y possuem cinco resíduos de cisteína, considerando que há um resíduo de cisteína no domínio C-terminal de todas as Gs-HMW e em algumas subunidades também há resíduos de cisteína no domínio central (figuras 2 e 3) (LINDSAY & SKERRIT, 1999). Os resíduos de cisteína são capaz de formar ligações dissulfeto com resíduos em outras subunidades (BELTON, 1998).

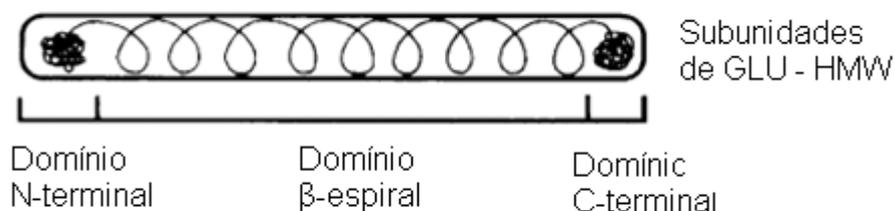


Figura 2: Estrutura de gluteninas de alta massa molecular
Fonte: Shewry et al. (2001)

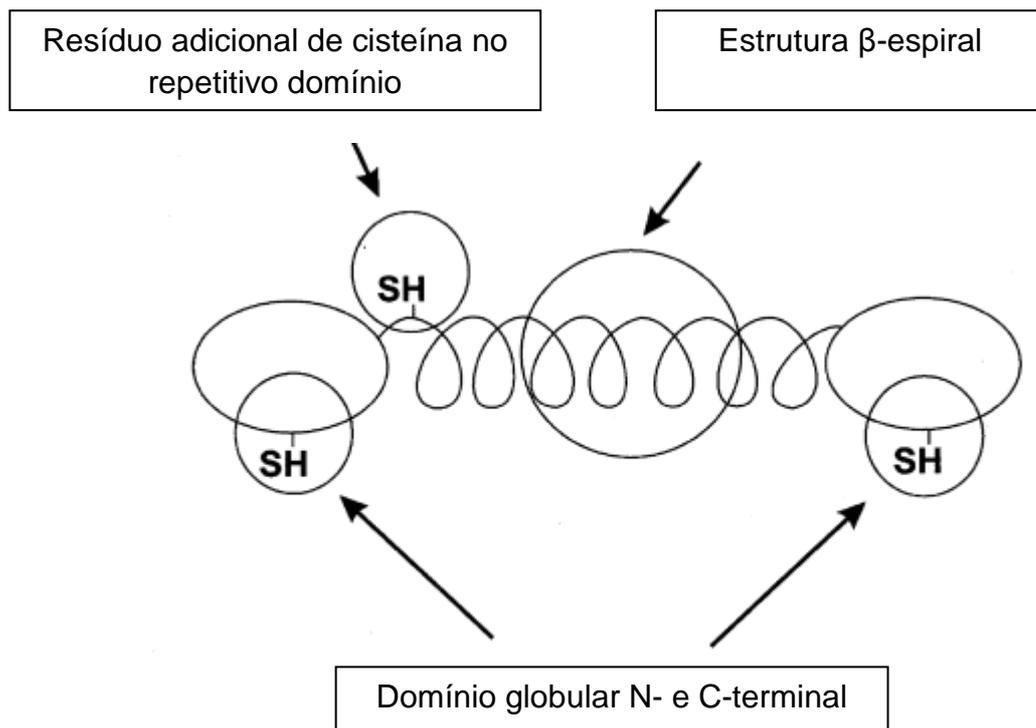


Figura 3: Característica estrutural das gluteninas de alta massa molecular
 Fonte: Shewry et al. (2001)

A síntese de gluteninas de alta massa molecular é codificada pelo loco Glu 1 localizado no braço longo do cromossomo 1 do trigo. Três locos desassociados Glu A1, Glu B1 e Glu D1 presentes no cromossomo 1A, 1B e 1D respectivamente, controlam a síntese de gluteninas de alta massa molecular (MACRITCHIE & LAFIANDRA, 2001). As subunidades de gluteninas de baixa massa molecular são codificadas pelos locos Glu A3, Glu B3 e Glu D3, localizados no braço curto do cromossomo 1A, 1B e 1D respectivamente (MONDAL, 2006). Na figura 4 é possível verificar a localização cromossômica dos locos que codificam as gluteninas de alta e baixa massa molecular e as gliadinas.

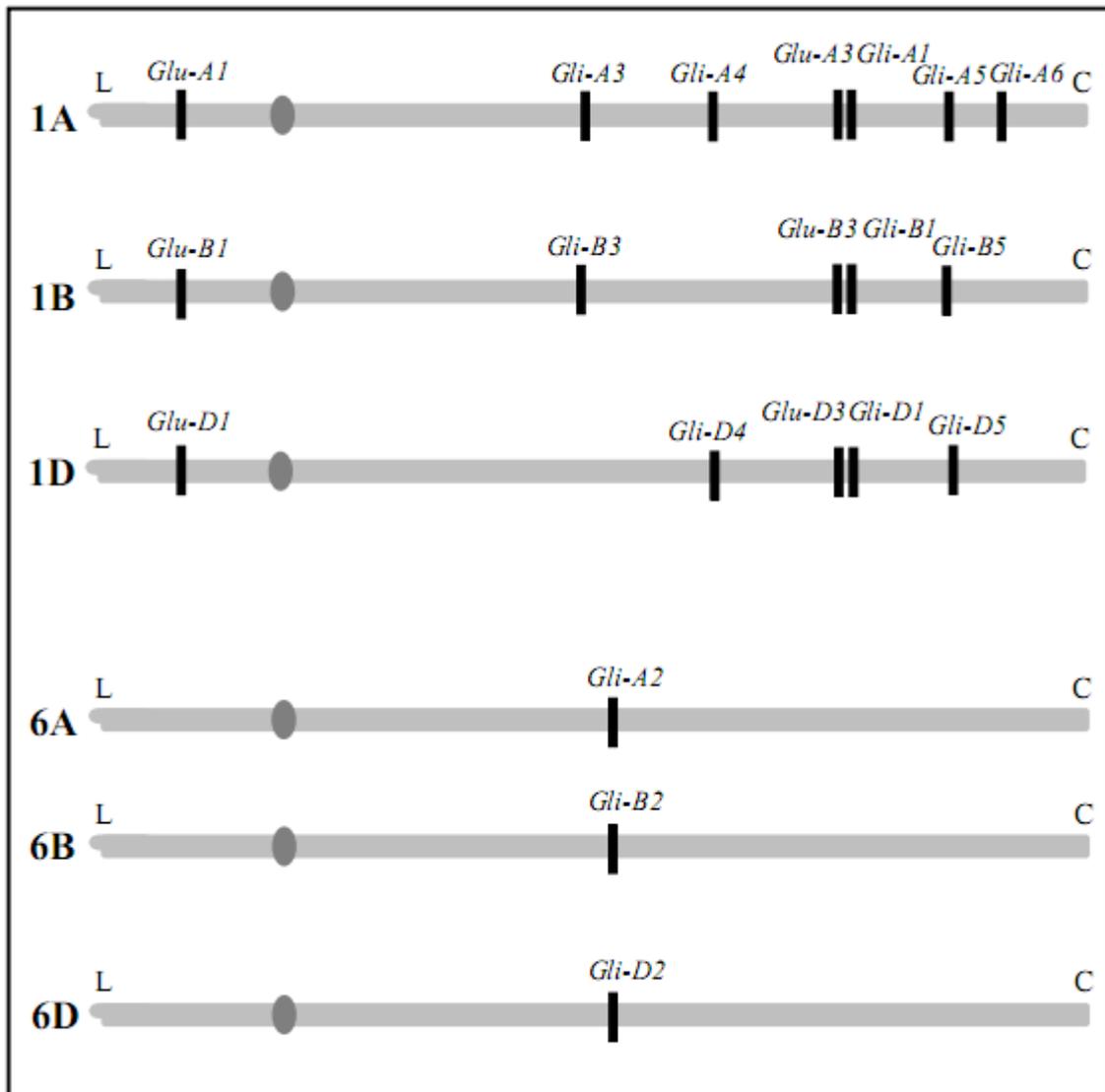


Figura 4: Localização cromossômica dos locos que codificam as proteínas formadoras de glúten
 Fonte: Andrés, 2008.

Na classe de gluteninas de alta massa molecular há dois subgrupos sendo, subunidades tipo-x e tipo-y. As subunidades tipo-x apresentam baixa mobilidade em SDS-PAGE em relação às subunidades do tipo-y. O loco Glu A1 codifica apenas subunidades tipo-x, o loco B1 pode codificar ambos ou apenas o tipo-x, enquanto o loco D1 codifica ambos os tipos de subunidades (PAYNE et al., 1984; SHWERY et al. 1992, apud MONDAL, 2006).

As gliadinas são monômeros de proteínas classificadas em α -, β -, γ - e ω -gliadinas com base na sua mobilidade eletroforética em sistema A-PAGE (acid polyacrylamde-gel electrophoresis) (PAGNOTTA et al. 2005), representando de 30 a 45% do glúten purificado. O peso molecular de gliadinas variam de 30 a 80 mil

Daltons (PAYNE et al., 1987) e são conhecidas por apresentarem um extenso polimorfismo. Os genes que codificam gliadinas estão presentes no braço curto dos cromossomos 1 e 6 (figura 4). Eles são genes fortemente ligados presente em três locos homólogos do cromossomo 1, Gli A1, Gli B1 e Gli D1. No cromossomo 6 são conhecidos como Gli A2, Gli B2 e Gli D2 (WRIGLEY & SHEPARD 1973, BROWN & FLAVELL 1981 apud MONDAL 2006), sendo que o gene Gli 1 codifica ω - e γ -gliadinas e os genes Gli 2 codificam α - e β -gliadinas (MONDAL, 2006).

As gluteninas de alta massa molecular (HWM) são relatadas como sendo a classe de proteína de reserva do trigo mais influente na qualidade de panificação do trigo (ZAMANI et al. ,2009; LEON et al., 2010). Usualmente, as subunidades de gluteninas HMW são caracterizadas pelo método SDS-PAGE, sendo a técnica baseada na eletroforese em gel de poliácridamida com docecil sulfato de sódio (SDS), permitindo que as variantes alélicas dos locos Glu-1 sejam facilmente detectadas. Há um perfil apresentado pelas gluteninas de alta massa molecular submetidas a técnica SDS-PAGE proposto por Payne (1987) (figura 5), que é baseado no polimorfismo de subunidades de gluteninas de alta massa molecular atribuindo-se um escore as cultivares conforme a composição de subunidades de gluteninas HMW que apresentem.

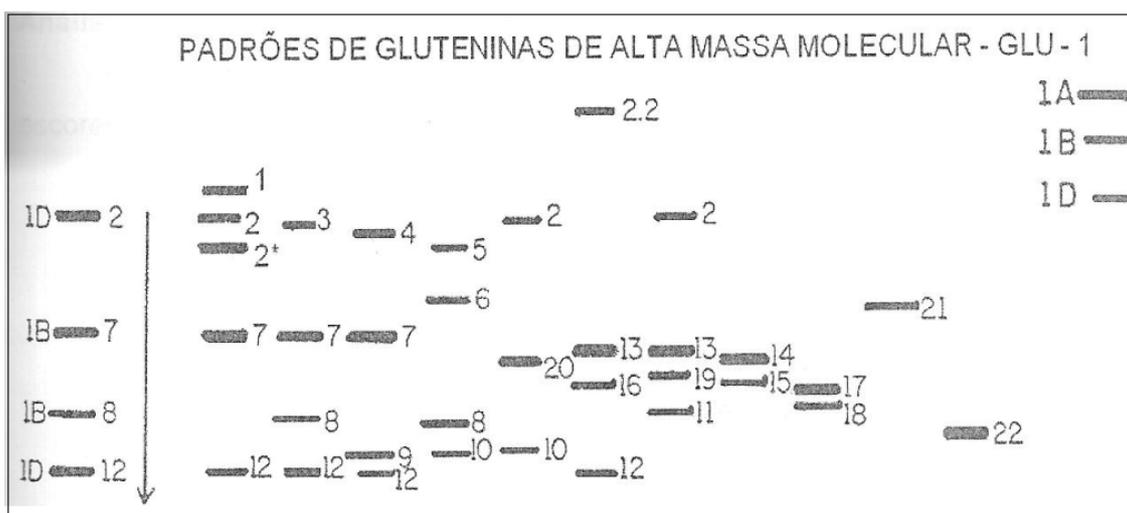


Figura 5: Perfil de gluteninas de alta massa molecular proposto por Payne, 1987.

As subunidades de gluteninas de alta massa molecular codificadas no cromossomo 1A se apresentam de três formas: alelo x1, x2* e também há genótipos

onde esses alelos são silenciados (Ay - alelo nulo). No cromossomo 1B são codificadas sete variantes alélicas sendo 6x, 7x, 8y, 9y, 17x, 18y e 20y. No cromossomo 1D são codificadas as subunidades 2x, 5x, 10y e 12y (PAYNE et al. 1897). Há diversos estudos relatando a influência desses alelos na qualidade de panificação (LUKOW et al., 1989; SCHUSTER et al., 1997; GIANIBELLI et al., 2001). Branlard e Dardevet (1985) demonstraram que a presença das subunidades 7+9 (loco Glu-B1) e 5+10 (loco Glu-D1) influenciam positivamente na força de glúten (w), tenacidade (P) e valor de sedimentação de Zeleny, e as subunidades 2+12 (loco Glu-D1) atuam de forma negativa em tais parâmetros. Barro et al. (2003) analisaram a expressão das subunidades A1x1 e D1x5 em trigo transgênico e verificaram que a transformação de linhas isogênicas com genes codificando as gluteninas de alta massa molecular A1x1 e D1x5 modificaram as propriedades viscoelásticas da farinha trigo. A adição da subunidade A1 x1 aumentou a tenacidade, extensibilidade (L) e a força de glúten (w) em relação a linhas parentais não transformadas, enquanto a subunidade D1x5 aumentou a tenacidade (P). Pirozi et al. (2008) verificaram o efeito positivo na qualidade de panificação com a presença do par de subunidades 1Bx7+By8 ou Bx7+By9 em relação aos pares Bx20+By20 ou Bx26+By27, confirmando a necessidade da identificação das subunidades de gluteninas de alta massa molecular na predição da qualidade de farinha de trigo. Chapla (2010) analisou a interação entre atributos de qualidade e as subunidades de gluteninas de alta massa molecular pela técnica SDS-PAGE e confirmou a associação positiva entre gluteninas de alta massa molecular e qualidade de panificação, podendo-se utilizar desta técnica para a seleção precoce de genótipos com potencial para produzir variedades com elevada qualidade de farinha.

Com o desenvolvimento das técnicas da biologia molecular, viabilizou-se a seleção de indivíduos através do genótipo tendo como vantagens a não influencia ambiental das características e a avaliação podendo ser realizada em qualquer idade da planta, acelerando o processo de seleção e recombinação de indivíduos desejados (PÍPOLO et al. 2006). Com a intensificação dos estudos e o avanço nas técnicas moleculares a caracterização de gluteninas de alta massa molecular tem sido realizada a partir da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com primers específicos, sendo uma alternativa rápida e confiável (ANJUN et al., 2007).

2.7 Marcadores Moleculares na Seleção de Gluteninas de Alta Massa Molecular

Marcadores moleculares ligados aos alelos de gluteninas de alta massa molecular têm sido desenvolvidos para facilitar a seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento genético e possibilitar o estudo genético em relação à qualidade tecnológica da farinha de trigo. Sabe-se que dependendo da composição de gluteninas de alta massa molecular é produzido um determinado tipo de farinha de trigo, podendo ser de alta ou baixa qualidade tecnológica.

A maioria dos marcadores desenvolvidos para a seleção de gluteninas de alta massa molecular é baseada na técnica de PCR com a utilização de *primers* específicos. Diversos *primers* foram desenvolvidos para amplificar as principais regiões codificantes de gluteninas de alta massa molecular, sendo enfatizados os alelos mais influentes na qualidade de panificação do trigo. Bustos et al. (2000) publicaram os resultados de marcadores desenvolvidos para a discriminação dos alelos Glu-A1 (subunidades x-2*, x-1 e x-nulo) e Glu-D1 (subunidades x5 e y10); Liu et al. (2008) apresentam marcadores para os alelos Glu-A1 (subunidades x-2*, x-1 e x-nulo) e Glu-D1 (subunidades x2, x5, y10 e y12); D'Ovidio et al. (1996) apresentam o marcador que detecta a presença do alelo que não codifica proteína (Ay- nulo); Yuan et al. (2008), descrevem a utilização de marcador para detectar genes silenciados do alelo 1By; Ma et al. (2003) publicaram o estudo de marcadores para os genes Glu-A1 Ax2* Glu-B1, Dx5. Há trabalhos realizados com base em polimorfismos resultando em marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) como descrito por Ravel et al. (2007) para o gene Glu1-B1.

O desenvolvimento de marcadores moleculares para auxiliar o melhoramento assistido do trigo vem sendo realizado por pesquisadores e instituições do mundo todo, tornando-se uma ferramenta indispensável para o sucesso dos programas de melhoramento de trigo. Em programas de melhoramento genético assistido há sempre uma necessidade de utilizar métodos de análise que apresentem resultados precisos, rápidos e que não sejam destrutivos, características apresentadas pelos marcadores moleculares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos laboratórios do núcleo de biotecnologia da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC) no ano de 2010, em Cascavel-PR.

Foram utilizadas 77 amostras de trigo provenientes de linhagens e variedades do Programa de Melhoramento de Trigo da Coodetec.

3.1 Alveografia

As análises de alveografia foram realizadas pelo laboratório de análises reológicas da farinha de trigo Cotriguaçu, em Palotina-PR, de acordo com o método AACC 54-30A.

Foram pesadas 250 g de farinha de trigo e esta foi disposta na masseira do alveógrafo, acionando-se o aparelho e acrescentando-se a solução de cloreto de sódio 10%, no máximo em 20 segundos após o início da mistura. A massa foi misturada durante um minuto. Passado um minuto de mistura a masseira foi desligada e com o auxílio de uma espátula foi realizada a raspagem das paredes da masseira para incorporar toda a farinha e água na massa, também em um minuto. A masseira foi ligada novamente e a mistura foi amassada por mais 6 minutos. A massa foi retirada da masseira e cortada em formato de círculo (5 círculos de massa), que foram dispostos sobre placas de inox e em seguida colocadas na câmara de repouso do aparelho durante 28 minutos a uma temperatura de 25°C. Os resultados foram, expressos em tenacidade (P), extensibilidade (L), índice de crescimento (G), tenacidade/extensibilidade (P/L) e energia de deformação da massa (W).

3.2 Extração de DNA e Análise de PCR

O DNA genômico das amostras de trigo foi extraído seguindo o protocolo de extração de sementes descrito por MacDonald et al. (1994) com adaptações (SCHUSTER et al. 2004). Em microtubos de 1,2 mL foram colocados 50 mg de

semente de trigo triturada, uma esfera de vidro e 100 µL de tampão de extração (200mM Tris-HCl pH 7,5, 288mM NaCl, 25mM EDTA). A mistura foi agitada em grinder (ACS, Goiânia) na velocidade 7 por 1 minuto. Após a agitação, centrifugou-se por um minuto a 18.000 g e adicionou-se mais 700 µL de tampão de extração. As amostras foram homogeneizadas em vortex por 1 minuto seguido de centrifugação por 10 minutos a 18.000 g. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Para a eliminação das proteínas foi adicionado a cada amostra 10 µL de Proteinase K (10mg/ml) e 10 µL de CaCl₂ 1 mM e submetidas a banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após o banho adicionou-se 500 µL de isopropanol gelado inverteu-se várias vezes e deixou-se precipitar por 2 minutos. Centrifugou-se o material por 15 minutos a 18.000 g descartou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado por 15 minutos. Para a eliminação do RNA adicionou-se as amostras secas 300 µL de TE contendo 40 µg/µL de RNase A, submeteu-se a banho-maria a 37°C por 30 minutos seguido da adição de 500 µL de isopropanol gelado. Em seguida, os tubos foram invertidos várias vezes, e as amostras foram precipitadas por 2 minutos. Centrifugou-se as amostras por 15 minutos a 18.000 g, descartou-se o sobrenadante deixando o precipitado secar por 15 minutos. Por fim ressuspendeu-se o 'pellet' em 300 µL de TE.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro tipo Nanodrop 1000, mediante leitura de absorvância a 260 nm. As reações de PCR continham 2 mM de MgCl₂, tampão 1x (500 µM Tris, 10 µM HCl), 300 µM de dNTPs, 0,8 µM de cada *primer* (senso e antisenso), 1 unidade de Taq DNA Polimerase, 50 ng de DNA em um volume final de 20 µL. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Thermo Hybaid modelo Express, programado a 94 °C por 5 min., seguido por 45 ciclos a 94 °C por 1 min., temperatura de anelamento por 1 min., 72 °C por 1 min. e extensão final a 72 °C por 10 min. Para otimizar as condições de amplificação foram testadas temperaturas e anelamento variando de 60 a 69,8 °C. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e revelado sob luz ultravioleta em aparelho de fotodocumentação Vilber Lourmat (Marne La Valle, FR).

O par de primer denominado Glu1 Dx2-Dx5 apresenta a seqüência: 5'GCCTAGCAACCTTCACAATC'3, 5'GAAACCTGCTGCGGACAAG'3, (ANDERSON et al.,1989; AHMAD, 2000), e amplifica o alelo Glu1-Dx5 com tamanho de 450 pb.

Foram utilizadas as cultivares Frontana, Ocepar-21 e OR1 (que possuem o alelo Glu1-Dx2-Dy12), e Ocepar-22 (o alelo Glu-Dx5-Dy10) como padrão para as amplificações de PCR e identificação dos alelos.

3.3 Extração de Gluteninas de Alta Massa Molecular

A extração de gluteninas de alta massa molecular foi realizada segundo o protocolo de Singh et al. (1991). As amostras foram maceradas individualmente com bisturi e dispostas em microtubos de 1,5 ml (aproximadamente 20 mg da amostra). Para a extração de glutenina, utilizou-se 3 soluções estoques: solução A [50% (v/v) isopropanol], solução B [50% (v/v) isopropanol, 0,08M de Tris-HCL, pH 8.0] e solução C [2% (p/v) SDS, 40% (p/v) glicerol, 0,02% (p/v) Azul de bromofenol, 0,08M Tris-HCl, pH8.0]. Adicionou-se a amostra 1 ml de solução "A" e incubou-se por 30 minutos a 65°C, agitando-se as amostras em intervalos de 10 minutos. Após o banho as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, por um minuto, e o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se o procedimento mais uma vez, e na seqüência, adicionou-se 0,5 ml de solução "A" para lavar o pelet e centrifugou-se por cinco minutos a 10.000 g, descartando o sobrenadante após a centrifugação. No momento da centrifugação preparou-se a solução "B" com 1% de DDT (Dithiotreitol) e adicionou-se ao pelet 0,1ml dessa solução, agitando-se e incubando-se em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após o banho realizou-se uma centrifugação por cinco minutos a 10.000 g, e após a centrifugação e adicionou-se 0,1 ml da solução "B" com 1,4% de 4-vinilpiridina a amostra, incubando-se por 15 minutos novamente e centrifugando-se a 10.000 g por um minuto. O sobrenadante é o extrato de gluteninas, e foi armazenado a 4°C até o uso. Antes da eletroforese, 0,1ml do extrato foi misturado com 0,1 ml da solução "C" e incubado por 15 minutos em banho-maria a 65°C, seguida de centrifugação por um minuto a 10.000 g. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante que foi aplicada no gel de eletroforese.

3.4 Eletroforese de Gluteninas de Alta Massa Molecular

A fração de gluteninas extraídas de sementes de trigo foi submetidas a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. O gel consta de duas fases: empilhamento e separação. O gel de separação foi preparado com 10% de acrilamida, 0,3% de bis-acrilamida, 1% de SDS, 0,1% de persulfato de amônia, 0,375M de tris e 0,4% de temed. O gel de empilhamento continha 3,5% de acrilamida, 0,12% de bis-acrilamida, 1% SDS, 0,1% de persulfato de amônia, 0,126M de tris e temed 1. O tampão de corrida utilizado foi tris/glicina, composto por 0,3% (p/v) de Tris, 1,88% (p/v) de glicina, 0,1% de SDS, ajustado o pH a 8,3. A eletroforese da proteína foi realizada sob corrente constante de 110 volts até as amostras atingirem o gel de separação. Então a voltagem foi aumentada para 120 volts.

A coloração dos géis foi realizada com solução corante (45% (v/v) metanol, 9% (v/v) ácido acético, 0,15% comassie blue brilhante e 45,85% (v/v) de água destilada) por aproximadamente 12 horas. A solução descorante continha 7,5% (v/v) de ácido acético, 25% (v/v) de metanol e 67,5% (v/v) de água destilada. Após a descoloração os géis foram digitalizados em scanner para proceder à análise das proteínas.

A codificação das subunidades de gluteninas de alta massa molecular foi realizada como descrito por Payne (1987) (figura 3), atribuindo-se os escores da tabela 3 às subunidades de gluteninas de alta massa molecular. Assim, a cada genótipo foi atribuído um valor em função das subunidades que apresentavam. O escore de um genótipo é a soma dos valores atribuídos a cada subunidade ou par de subunidades de glutenina de alta massa molecular em cada um dos cromossomos 1A, 1B e 1D, podendo genótipos diferentes apresentar o mesmo escore.

Tabela 3: Escore qualitativo das subunidades de gluteninas de alta massa molecular¹

ESCORE	CROMOSSOMO		
	1A	1B	1D
4	-	-	5+10
3	1	17+18	-
3	2*	7+8	-
3	-	13+16	-
2	-	7+9	2+12
2	-	-	3+12
1	N	7	4+12
1	-	6+8	-
1	-	20	-
s/informação	-	21	2.2
s/informação	-	22	2+11
s/informação	-	13+19	2+10

¹Adaptado de Payne (1987) e Lukow et al., (1989).

N significa alelo nulo do cromossomo 1A.

3.5 Análise dos Dados

Para a análise dos resultados utilizou-se do programa estatístico GENES, aplicando-se o teste de correlação simples de Pearson entre os dados de alveografia, escore de gluteninas, genoma A e D.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O par de *primers* utilizado no presente trabalho foi apresentado por Ahmad (2000), ao utilizar as mesmas condições de amplificação citadas pelo autor, não houve amplificação do alelo Glu1-Dx5. Por este motivo foram realizados ajustes nas condições de amplificação. Na figura 6 estão apresentados os resultados da amplificação decorrentes de um gradiente de temperatura de anelamento variando de 60 °C a 69,8 °C para Glu1-Dx5.

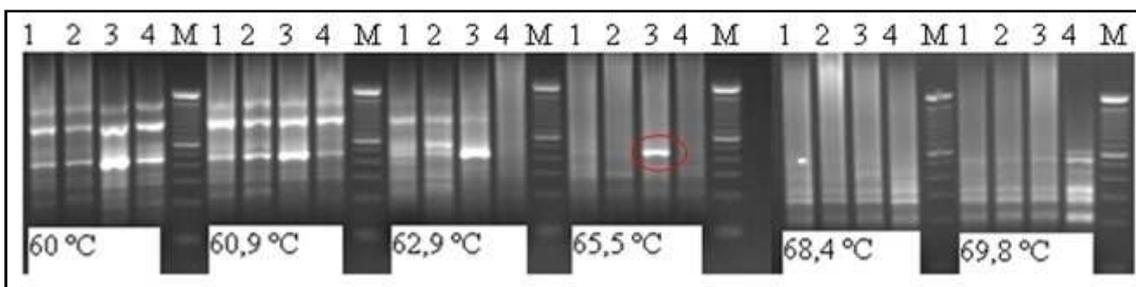


Figura 6: Amplificação do loco Glu1-Dx5 utilizando diferentes temperaturas de anelamento.

Amostra 1: Frontana, 2: Ocepar 21, 3: Ocepar 22 e 4: OR1 e M: marcador de 100pb. Circulado em vermelho o fragmento de 450 pb apresentado pelo alelo Glu1-Dx5 na cultivar Ocepar 22.

O tamanho do fragmento esperado na amplificação do alelo Glu1-Dx5 é de 450 pb. A temperatura de anelamento utilizado por Ahmad (2000) foi de 63 °C. A temperatura de anelamento é uma etapa crítica da amplificação do DNA através da PCR. Se a temperatura é muito alta, os *primers* anelam-se de maneira deficiente ao molde, resultando em baixa produção de DNA amplificado, e se a temperatura for muito baixa, pode ocorrer o anelamento não específico dos *primers*, gerando amplificações de segmentos indesejáveis de DNA (CAIXETA et al., 2006). A não amplificação ou amplificação de bandas fracas indica a necessidade de reduzir a temperatura de anelamento do *primer* e a presença de várias bandas indica a amplificação de produtos inespecíficos sendo necessário o aumento da temperatura de anelamento (BUSO et al., 2003). Verifica-se que à medida que se aumenta a temperatura de anelamento as bandas inespecíficas vão diminuindo até a amplificação apenas do loco específico apresentado pela amostra 3 (Ocepar 22). Com a temperatura de 62,9 °C é possível verificar que a amostra com o loco Glu1-Dx5 já apresenta uma banda forte, porém, ainda há a presença de bandas inespecíficas verificado nas amostras 1 e 2, que não apresentem o loco Glu1-Dx5.

A amplificação esperada do alelo em estudo foi alcançada com a temperatura de anelamento de 65,5 °C (figura 6). Na figura 7 encontra-se o perfil de gluteninas de alta massa molecular, caracterizadas pelo método SDS-PAGE, confirmando a presença do alelo Glu1-Dx5 (marcado em vermelho) em Ocepar 22, e ausência nas demais amostras.

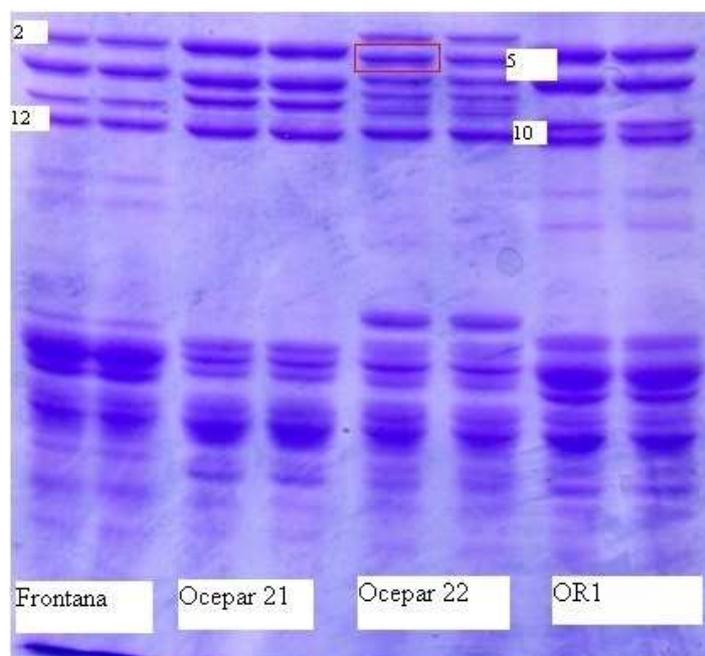


Figura 7: Perfil de gluteninas de alta massa molecular (HMW) das amostras utilizadas como padrão, pelo método SDS-PAGE.

Circundada em vermelho está a banda correspondente a subunidade Dx5.

As gluteninas de alta massa molecular do genoma D do trigo são sempre codificadas aos pares, sendo Dx5+Dy10 ou Dx2+Dy12, Dx3+Dy12, Dx4+Dy12 (PAYNE et al. 1897; SHERWRY et al. 2005), dessa forma, a caracterização do alelo Glu1-Dx5 em um indivíduo, prediz que também está presente o alelo Dy10 e ausente os demais alelos do genoma D.

A detecção do par de alelos Glu1-Dx5-Dy10 são de grande importância, pois, são relatados como sendo um dos mais influentes na qualidade de panificação em relação a força de glúten (PAYNE et al., 1897; SHERWRY et al., 2005; GUPTA & MACRITCHIE, 1994). Em estudo realizado por Zanatta (2002) e colaboradores para verificar a influência das diversas subunidades de gluteninas de alta massa molecular na qualidade de farinha de trigo, constataram que todas as amostras classificadas como melhoradoras (W acima de 300) e 65,6% das amostras

classificados como tipo pão (W de 180 a 300) apresentaram o par de subunidades 5+10. O fato da presença das subunidades 5+10 proporcionarem força de farinha superior, esta sendo relacionado com a qualidade do polímero de proteína codificada por este alelo, pois a subunidade 1Dx5 apresenta um resíduo adicional de cisteína em sua estrutura, em relação a subunidade 1Dx2, que contribui para a formação de ligações cruzadas (figura 3) (GUPTA & Macritchie, 1994; SHEWRY et al., 1992 apud SHEWRY et al., 2005). Esse resíduo de cisteína encontra-se localizado no final do domínio repetitivo central N-terminal da estrutura da proteína e pode estar envolvido na formação de ligações dissulfetos intermoleculares, resultando em um glúten mais elástico (SHEWRY et al., 2001).

Após a otimização da reação de PCR foi possível realizar a análise molecular nas amostras de trigo em estudo, e verificar quais apresentam o alelo Glu1-Dx5. Na figura 8 estão apresentados os resultados de amplificação do alelo Glu1-Dx5 em parte da população analisada.

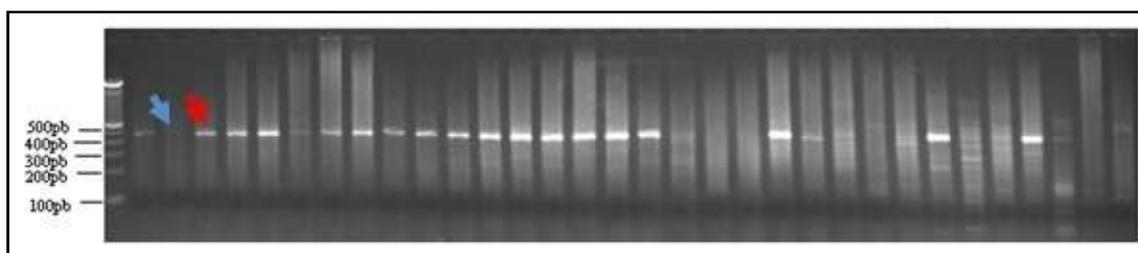


Figura 8: Amplificação com o marcador molecular Glu1-Dx5 em parte da população analisada. Indicado com seta em vermelho o alelo Dx5 amplificado (450pb), em azul a ausência do alelo.

Através da análise de PCR verificou-se que dos 77 indivíduos em estudo 62 apresentam o alelo Glu1-Dx5 amplificado (80,5%) e 15 não apresentam a amplificação do alelo (19,5%). Além da análise da população pela técnica de PCR realizou-se a caracterização dos indivíduos pela técnica de eletroforese de proteínas em SDS-PAGE, e posteriormente os resultados de ambos foram confrontados para verificar a precisão das análises.

Na análise da eletroforese de proteínas foram observadas 68 amostras com o par de subunidades 5+10, representando 83% do total e 9 apresentam o par 2+12 (17%). Seis amostras que apresentaram as bandas 5+10 na análise de proteína não

apresentaram a amplificação com o primer específico para o alelo 1Dx5 na análise de DNA.

Um dos problemas encontrados pelo uso do marcador molecular Glu1-Dx5-Dx2 é que este é um marcador dominante, ou seja, ocorre somente a amplificação do fragmento correspondente ao alelo Glu1-Dx5. Dessa forma, caso ocorra falha na reação de PCR, a não amplificação da banda pode ser interpretada como ausência do alelo. Muitos marcadores de gluteninas de alta massa molecular desenvolvidos para a seleção assistida por marcadores são do tipo dominante, que não distinguem homozigotos e heterozigotos e também não detectam falhas da reação de PCR (LIU et al., 2008).

Os resultados divergentes entre as técnicas de eletroforese e de PCR apontam a necessidade de ter um controle interno da reação de PCR para a utilização do *primer* avaliado. O controle interno de amplificação (CIA) monitora as reações individualmente. A técnica consiste na adição de uma seqüência de DNA não-alvo no tubo da reação, o qual é co-amplificado simultaneamente com a seqüência-alvo. Na PCR sem um CIA, uma resposta negativa (sem banda ou sinal) pode significar que não há presença da seqüência-alvo na reação, mas também pode significar que a reação falhou, como um resultado de mau funcionamento do termociclador, preparação incorreta da mistura da PCR, baixa atividade da enzima polimerase, entre outros fatores (FREITAS et al., 2006). O controle pode ser feito pela técnica de PCR multiplex, que diferencia características específicas em uma única reação, pela amplificação simultânea de mais de uma seqüência-alvo com a utilização de um conjunto de pares de *primers* (OLIVEIRA et al., 2007, MOLINA & TOBO, 2004).

Os *primers* utilizados na técnica PCR multiplex podem ser todos para características de interesse, ou simplesmente para ter-se controle da reação. Antes de utilizar a técnica, deve-se padronizar o método em função dos *primers* que serão utilizados, pois cada par de primers necessita de condições específicas de amplificação. A técnica tem por vantagem a diminuição de custos com os componentes da reação e de revelação, mão de obra, equipamentos e tempo (EDWARDS & GIBBS, 1994). Além disso, para a utilização de marcadores moleculares há a necessidade de serem eficientes e econômicos (SCHUSTER & OLIVEIRA, 2006).

Os resultados obtidos demonstram que para a utilização do marcador molecular Glu1-Dx5-Dx2 em programas de melhoramento genético do trigo é necessário desenvolver uma técnica que apresente algum controle da reação, tornando mais confiáveis os resultados apresentados pelo marcador.

Por outro lado, a utilização deste marcador, embora possa deixar de selecionar algumas amostras que continham as subunidades 5+10, considera-se que todas as amostras selecionadas pela presença do marcador possuem as subunidades 5+10. Dessa forma a utilização do marcador molecular analisado pode ser realizada uma vez que ira selecionar apenas indivíduos que apresentem o par de subunidades que apresentam relação positiva com força de farinha de trigo.

4.1 Correlação de Escore com W, P, P/L

O coeficiente de correlação de Pearson entre o escore de gluteninas e força de glúten (W) foi de 0,37% e foi significativo a 1% de probabilidade (Tabela 4). Aproximadamente 37% da força geral de glúten do trigo das amostras analisadas foi determinado pela composição das subunidades de gluteninas de alta massa molecular codificadas pelo genoma A, B e D, sendo o restante controlada por outros fatores não analisados no presente estudo.

Tabela 4: Coeficientes de correlação simples entre subunidades de gluteninas de alta massa molecular, alelo 1D5x e dados reológicos em farinha de trigo.

Variáveis	GENOMA D	ESCORE	ALELO DX5	W	P	L	P/L	GENOMA A
GENOMA D	1,00	0,55**	0,74**	0,14	0,14	-0,10	0,14	----
ESCORE		1,00	0,32**	0,37**	0,38**	0,01	0,24*	0,69**
ALELO DX5			1,00	-0,07	-0,07	0,00	0,02	----
W				1,00	0,71**	-0,13	0,48**	0,28*
P					1,00	----	----	0,23*
L						1,00	----	0,07
P/L							1,00	0,15
GENOMA A								1,00

*, **: significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste t

Diversos autores têm relatado a contribuição das subunidades de gluteninas de alta massa molecular na qualidade de panificação. Chapla (2010), em um estudo entre a associação de Glu-HMW com força de glúten, constatou que há correlação significativa (0,44) entre as variáveis analisadas. Schuster et al. (1997) confirmaram o importante papel das Glu-HMW na força de glúten, encontrando o valor de 0,5 para as variáveis analisadas. Schmidt et al, (2005) verificaram uma correlação de 0,31 entre W e Glu-HMW. Todas as correlações foram medidas em função do escore gerado pela composição de gluteninas e foram significativas.

Verificou-se neste estudo que as Glu-HMW apresentaram uma correlação positiva com W (0,37), sendo a caracterização de subunidades de gluteninas de alta massa molecular uma prática viável e com grande potencial na triagem de genótipos aptos a produção de trigo com características superior de qualidade de farinha. Além disso, a técnica de eletroforese de Glu-HMW pelo método SDS-PAGE é um método não destrutivo, pois, utiliza-se apenas 20 mg da amostra (aproximadamente meio grão), para proceder a análise, podendo assim preservar o embrião para formar um futuro indivíduo. Também tem como vantagem o baixo custo do aparelho de eletroforese e o simples manuseio, tornando o método bastante difundido pelo mundo para a triagem de subunidades de gluteninas na previsão de qualidade do glúten (GAO et al., 2010). Uma vez que a análise de alveografia é um método que avalia o fenótipo (produto final) e necessita de um grande volume de amostra, a análise molecular (composição de gluteninas) é uma alternativa independente das condições do ambiente de cultivo e é preciso pouca quantidade de amostra, o que é requerido em programas de melhoramento genético.

Outros parâmetros de alveografia que foram significativamente relacionadas com a composição Glu-HMW (escore) foram a tenacidade (P) e P/L, com coeficientes de correlação de 0,38 e 0,24 respectivamente (tabela 4). A tenacidade da farinha de trigo prediz a capacidade de absorção de água da farinha de trigo e é um parâmetro utilizado para definir a aptidão final farinha, por exemplo, para fabricar bolos industrializados e biscoitos a tenacidade deve ser baixa ou seja, a força de glúten deve ser fraca. Pode-se observar na tabela 4 que a força de glúten está altamente correlacionada com a tenacidade da farinha de trigo (0,71). Portanto, o escore de gluteninas pode ser utilizado para prever a qualidade de farinha de trigo.

4.2 Influência do Genoma D em Parâmetros de Qualidade da Farinha de Trigo

Como verificado, as subunidades de Glu-HMW apresentam influência positiva ou negativa na qualidade de farinha de trigo.

No presente estudo procedeu-se a análise da contribuição do cromossomo 1D na qualidade de panificação do trigo, e verificou-se, a correlação positiva de 0,55 entre os pares de alelos do genoma D e o escore de proteína, significativos ao nível de 1% de probabilidade. Esse resultado demonstra que as subunidades de gluteninas de alta massa molecular codificadas pelo cromossomo 1D do trigo exercem forte influencia no total do escore de proteína e conseqüentemente na força de glúten.

Para verificar a influência isolada do alelo Glu1-Dx5 na força de glúten, realizou-se a caracterização das amostras pelo marcador molecular dominante Glu1-Dx5-Dx2, que amplifica a presença do alelo Dx5, e procedeu-se o teste de correlação entre a presença do alelo e o escore de proteína. A análise de correlação entre as variáveis apontam uma correlação positiva a 5% de significância no valor de 0,32. Dessa forma, o par de subunidades 5+10 controla cerca de 32% do valor final do escore de proteína. A diferença nos valores de correlação do escore com o alelo correspondente a banda 5 quando este alelo foi identificado pela eletroforese de proteína ou por PCR, deve-se às seis plantas que apresentaram o alelo na análise de proteína e não amplificaram na PCR.

Apesar da correlação significativa do alelo com o escore de proteína, o parâmetro força de glúten não está significativamente correlacionado com a presença do alelo Glu1-Dx5 (tabela 4). Dessa forma, a seleção de indivíduos com base apenas no alelo Glu1Dx5 torna-se uma pratica inviável para selecionar genótipos com qualidade superior de farinha de trigo. Apesar da força de glúten ser altamente correlacionada pelo genoma D, também é influenciada pela presença das demais subunidades de gluteninas de alta massa molecular codificadas pelo genoma A e B. Dessa forma, a utilização de marcadores moleculares pela técnica de PCR para a identificação de genótipos de trigo com qualidade superior de farinha, deve ser realizada levando em consideração os genomas A, B e D do trigo, pois a seleção de alelos isoladamente torna-se uma pratica pouco representativa.

O investimento em pesquisa com marcadores moleculares para as características analisadas torna-se uma necessidade visto que a técnica de

eletroforese de proteínas apresenta algumas desvantagens, como a baixa resolução do gel podendo ocorrer a identificação errônea de subunidades que apresentam mobilidade semelhante, é um processo lento, trabalhoso e a identificação das subunidades é difícil (GAO et al., 2010).

4.3 Influência do Genoma A em Parâmetros de Qualidade de Farinha de Trigo

O coeficiente de correlação dos alelos do genoma A com o escore de proteína (0,69) foi significativo, indicando que o genoma A é um dos mais influentes no escore de proteína. O genoma A foi positivamente correlacionado com W (0,28%) e P (0,23%), reforçando a importância destes alelos na qualidade de farinha de trigo.

Barro et al. (2003) analisaram a importância do genoma A na qualidade de farinha de trigo, transformando parentais sem o alelo com o gene que codifica a subunidade de glutenina de alta massa molecular Glu-A1x1. Constataram que a linha transformada apresentou maior W, P e L em comparação com a linha parental não transformada. Zanatta et al. (2002) mostraram que as subunidades 1 e 2* se apresentam em trigos com maior qualidade de panificação, enquanto que a não expressão do genoma A (subunidade nulo) está relacionada com trigos de qualidade de panificação inferior.

No presente trabalho também foi feita a tentativa de validação de dois marcadores moleculares para o genoma A, citados por Bustos et al. (2000), Glu-A1 x2* (R: 5'-CCGATTTTGTCTTCTCACAC-3', F: 5'-CACCAAGCGAGCTGCAGA-3') e Glu-A1 x1 e xnulo (R: 5'-ACCAAGCGAGCTGCAGAG-3', F: 5'TGACCGACAGTCCACCGA-3'), porém não houve a amplificação esperada.

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a detecção das subunidades codificadas pelo genoma A em programas de melhoramento genético de trigo, tornam-se uma prática indispensável para a identificação e seleção de genótipos com qualidade superior de farinha de trigo, e que é necessário realizar mais estudos para o desenvolvimento ou validação de marcadores moleculares para estes alelos.

5 CONCLUSÕES

O escore de proteína é positivamente correlacionado com W, P e P/L predizendo dessa forma, que a composição de gluteninas de alta massa molecular apresenta influencia significativa na qualidade de farinha de trigo.

Os variantes alélicos do genoma A e o par de subunidades Glu1Dx5+Glu1-Dy10 apresentam correlação positiva com o escore de proteína;

A força geral de glúten (W) e a tenacidade (P) estão positivamente correlacionados com os variantes alélicos do genoma A;

A utilização do marcador molecular que detecta o alelo Glu1-Dx5 utilizado neste estudo deve ser realizada com algum tipo de controle individual na reação de PCR para que os resultados sejam confiáveis;

A seleção de genótipos com qualidade superior de farinha de trigo não deve ser realizada levando em consideração apenas os variantes do genoma D, mas sim uma análise completa dos genomas A, B e D.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p.892-896, 2000.

ANDERSON, O.D.; GREENE, F.C.; YIP, R.E.; HALFORD, N.G., SHERWRY, P.R. ROMERO, J.M.M. Nucleotide sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from D-genome of a hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum* L. cv Cheyenne. **Nucleic Acids Research**, v.17, 461-462, 1989.

ANDRÉS, R.L. **Prolaminas, proteínas waxy y puroindolinas em trigo blando: herencia, influencia e interacción em la calidad**. Madrid, 2008, p.221. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.

ANJUM, F.M.; KHAN, M.R.; DIN, A.; SAEED, M.; PASHA, I.; ARSHAD, M.U. Wheat gluten: High molecular weight glutenin subunits- Structure, genetics, and relation to dough elasticity. **Journal of Food and Science**, v.72, p.56-62. 2007.

BARRO, F.; BARCELÓ, P.; LAZZERI, P.A.; SHEWRY, P.R.; BALLESTEROS, J.; MARTÍN, A. Functional properties of flours from Field grown transgenic wheat lines expressing the HMW glutenin subunit 1Ax1 and 1Dx5 genes. **Molecular Breeding**, v.12, p.223-229, 2003.

BELTON, P.S. On the elasticity of wheat gluten. **Journal of Cereal Science**, v.29, p.103-107, 1998.

BERED, F.; CARVALHO, F.I.F.; NETO, J.F.B. Variabilidade genética em trigo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v.3, n. 14, p.22-25, 2000.

BRAMMER, S.P.; Marcadores Moleculares: Princípios Básicos em Programas de Melhoramento Genético Vegetal. Documentos online ISSN 15-18-6512, EMBRAPA:2000.

BRAMMER, S.P.; MARTINELLI, P.; MORAES-FERNANDES, M.I.B.; PRESTES, A.M.; ANGRA, D.C. A potencialidade de *Agropyron*, espécie afim ao trigo cultivado, como fonte de introgressão de genes agronomicamente importantes. Documentos online ISSN 1518-8512, Embrapa, 2001.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SARC nº 7, de 15 de agosto de 2001. Regulamento técnico de identidade e de qualidade do trigo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 160-E, p. 33-35, 21 ago. 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 38, de 30 de novembro de 2010. Regulamento técnico do trigo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 29, p. 2, 1 dez. 2010. Seção 1.

BRUNE, W.; ALFENAS, A.C. Identificação de proteínas em géis. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Cap.5, Ed. UFV: Viçosa,1998, p.574.

BUSO, G.S.C; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V.. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ed.30, p. 46-50, 2003.

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 gluteninas of wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.1085-1094, 2000.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIAMA, N.S.. Tipos de marcadores moleculares In: BOREM, A. & CAIXETA, E.T. (Ed). **Marcadores Moleculares**. Viçosa-MG, p.9-78, 2006.

CAZZETA, D.A.; FILHO, D.F.; ARF, O.; GERMANI, R. Qualidade industrial de cultivares de trigo e triticales submetidos a adubação nitrogenada no sistema de plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.3, p.741-750, 2008.

CHAPLA, P.I. **Estabilidade da qualidade de panificação em trigo e associação com a composição de gluteninas de alta massa molecular**. 2010. 44p. Dissertação (mestrado) – Universidade Paranaense, Umuarama.

CONAB. Conjuntura semanal do trigo. DISPONÍVEL EM: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/b9eabd8143ddda92adf523c0d95c9f05..pdf>. acesso dia 31/01/2011.

CUNHA, G.R. In: MIRANDA, M.Z.; MORI, C.; LORINI, I. Qualidade Comercial do Trigo Brasileiro: safra 2005. Documentos Embrapa, v.80, p.102, 2008.

DELLAVALLE, P.D.; RIZZA, M.D.; VÁZQUEZ,D. ; CASTRO, M. Elementos de análisis cualitativo y cuantitativo em proteínas del glúten de trigo. **Agricultura técnica**, v.66, p.360-369, Chile, 2006.

D'OIDIO, D.; MASCI, S.; PORCEDDU, E. Sequence analysis of the 5' non-coding regions of active and inactive 1Ay HMW glutenin genes from wild and cultivated wheats. **Plant Science**, v.114, p.61-69, 1996.

EDWARDS, M.C. & GIBBS, R.A. Multiplex PCR: Advantages, development and applications. **Genome Research**, v.3, p.65-75, 1994.

EMBRAPA SOJA. História do trigo no Brasil. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod_pai=6&op_page=91> último acesso 31/01/2011.

EVANS, L.T. **Feeding the Ten Billion: Plants and population growth.** Cambridge University, 1998. p.521.

FRANCO, F.A. Entrevista concedida ao Informativo Trigo. Cascavel: Informativo Trigo Ed.2, fevereiro de 2011.

FREITAS, E.I.; LEMOS, A.A.; MARIN, V.A.. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.11, p.1073-1083, 2006.

GAO, L.; MA, W.; CHEN, J.; WANG, K.; LI, J.; WANG, S.; BEKES, F.; APPELS, R.; YAN, Y. Characterization and Comparative Analysis of Wheat High Molecular Weight Glutenin Subunits by SDS-PAGE, RP-HPLC, HPCE, and MALDI-TOF-MS. **Food Chemistry**, v.58, p.2777-2786, 2010.

GERMANI, R. Características dos grãos e farinhas de trigo e avaliações de suas qualidades. Rio de Janeiro: EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, 2008. 103 p.

GIANIBELLI, M.C.; LARROQUE, O.R.; MACRITCHIE, F.; WRIGLEY, C.W. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat endosperm proteins. **American Association of Cereal Chemists**, St. Paul, v. 77, p. 1-20, 2001.

GRANOTEC DO BRASIL. **Metodologias Analíticas.** Curitiba, Paraná. p.26, 2003.

GUERRIERI, N. Cereal proteins. In: YADA, R.Y. (Ed.). **Proteins in food processing.** Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. p.176-192.

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.

GUTKOSKI, L.C. Controle de qualidade de grãos e farinhas de cereais. IV Simpósio de Nutrição, Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Passo Fundo, p.29, Passo Fundo, 2009.

LEON, E.; PISTON, F.; AOUNI, R.; SHEWRY, P.R.; ROSELL, C.M.; MARTIN, A.; BARRO, F. Pasting properties of transgenic lines of a commercial bread wheat expressing combinations of HMW glutenin subunit genes. **Journal of Cereal Science**, v.51, p.344-349, 2010.

LINDSAY, Megan P. & SKERRIT, John H. The gluteins macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. **Food Science & Technology**, v.10, p.247-253, 1999.

LIU, S.; CHAO, S.; ANDERSON, J.A. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat. **Theor Appl Genetic**, v.118, p.177-183, 2008.

LUKOW, O.M., PAYNE, P.I.; TKACHUK, R. The HMW glutenin subunit composition of Canadian wheat cultivars and their association with bread-making quality. **Journal of the Science of Food and agriculture**, v.46, p.451-460. 1989.

MA, W.; ZHANG, W.; GALE, K.R. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. **Euphytica**, v.134, p.51–60, 2003.

MAC KEY, J.. Wheat: Its Concept, Evolution, and Taxonomy. In: ROYO, C.; NACHIT, M.M.; DI FONZO, N.; ARAUS, J.L.; PFEIFFER, W.H.; SLAFER, Gustavo A. (Ed.). **Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies**. V.I. New York: Food Products Press, 2005. p. 3-62.

MACRITCHIE, F. & LAFIANDRA, D. The use of near-isogenic wheat lines to determine protein composition-functionality relationship. **Cereal Chemistry**, v.78, n.5, p. 501-506, 2001.

MCDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J. & SWEENEY, M.P. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, Zürich, v.22, n.2, p.171-176, 1994.

MCKEVITH, B. Nutritional aspects of cereals. British Nutrition Foundation. **Nutrition Bulletin**, v.29, p.111-142, 2004.

MIRANDA, M. Z. Qualidade tecnológica de trigo. In: CUNHA, G.R. & BACALTCHUK, B. (Org.). **Série Culturas: Trigo**. Porto Alegre: Embrapa, 2000a. p.315-330.

MIRANDA, M. Z. de. Tópicos relacionados com a Qualidade tecnológica de trigo. In: CUNHA, Gilberto R. & BACALTCHUK, Benami. (Org.). **Série Culturas: Trigo**. Porto Alegre: Embrapa, 2000b. p.331-339.

MIRANDA, M. Z.; MORI, C.; LORINI, I. Qualidade comercial do trigo brasileiro: Safra 2006. Documentos online 112. Passo Fundo-RS, Embrapa Trigo, 2009.

MIRANDA, M. Z.; DE MORI, C.; LORINI, I. Qualidade comercial do trigo brasileiro: Safra 2007. Documentos online ISSN 1518-6512, Embrapa, 2010.

MOLINA, A.L. & TOBO, P.R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einsten**, v.2, p.139-142, 2004.

MONDAL, S. **Use of near-isogenic wheat lines to determine glutenin and gliadin composition and functionality in flour tortillas**. Texas, 2006. p.105. Dissertação (Mestrado em Melhoramento de Plantas)- Texas A & M University.

OLIVEIRA, M.C.S.; REGITANO, L.C.A.; ROESE, A.D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M.M.; SCAGLIUSI, S.M.M.; TIMÓTEO, W.H.B.; JARDIM, S.N. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. Embrapa, São Carlos, p. 38, 2007.

PAGNOTTA, M.A.; BLANCO, A.; GADALETA, A.; FARES, C.. Functional Determinants of Grain Quality In: ROYO, C.; NACHIT, M.M.; DI FONZO, N.; ARAUS, J.L.; PFEIFFER, W. H.; SLAFER, G. A. (Ed.). **Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies**. V.I. New York: Food Products Press, 2005. p. 483-527.

PAYNE, P.I. Genetics of wheat storage proteins and effect of allelic variation on bread-making quality. **Annual Review of Plant Physiology**, v.38, p.141-153, 1987.

PAYNE, P.I.; JACKSON, E. A.; HOLT, L. M.; LAW C. N. Genetic linkage between endosperm protein genes on each of the short arms of chromosomes 1A and 1B in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.67, p. 235-243, 1984.

PELTONEN, J. Ear developmental stage used for timing supplemental nitrogen application to spring wheat. **Crop Science**, Madison, v.32, n.4, p.1029-1033, 1992.

PIANA, C. F. de B.; CARVALHO, F. I. F. de,. Trigo In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E.R. T. (Ed). **Origem e Evolução de Plantas Cultivadas**. Embrapa, 2008. P. 821-851.

PÍPOLO, V.C.; GARCIA, J.E.; RINALDI, D.A. Desenvolvimento e aplicações de marcadores moleculares. In: PÍPOLO, V.C.; GARCIA, J.E. (Ed.). **Biotecnologia na Agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola; Londrina:Universidade Estadual de Londrina.2006. p.1-29.

PIROZI, 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, p.117–122, 2008.

PIZZINATO, A. Qualidade da farinha de trigo: Conceito, fatores determinantes, parâmetros de avaliação e controle. **ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos: Campinas**, 1997.

RAE, P.R.; A história do Trigo. Disponível em : <<http://www.abitrigo.com.br>>, último acesso: 16/05/2008.

RAVEL, C.; PRAUD, S.; CANAGUIER, A; DUFOUR, P.; GIANCOLA, S.; BALFOURIER, F.; CHALHOUB,B.; BRUNEL, D.; LINOSSIER, L.; DARDEVET, M.; BECKERT, M.; ROUSSET, M.; MURIGNEUX A.; CHARMET, G. DNA sequence polymorphisms and their application to bread wheat quality. **Euphytica**, v.158, p.331–336, 2007.

ROSSI, M.R.; NEVES, F.M. Estratégias para o trigo no Brasil. Editora Atlas S/A., 2004.

RUIZ, M.; VÁZQUEZ, J.F.; CARRILLO, J. M. Genetic Bases of Grain Quality In: ROYO, C.; NACHIT, M. M.; DI FONZO, N.; ARAUS, J.L.; PFEIFFER, W.H.; SLAFER,

G.A. (Ed.). **Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies**. V.I. New York: Food Products Press, 2005. p. 349-375.

SCHMIDT, D.A.; SILVA, J.G.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.; BERTAN, I.; HARTWIG, I.; VALÉRIO I.; RIBEIRO, G.; FINATTO T.; BUSATO C.; SILVEIRA, G.; FONSECA, D.. Correlações entre gluteninas de alto peso molecular e técnicas que avaliam a qualidade de panificação em trigos hexaplóides (*Triticum aestivum*). In: XIV Congresso de Iniciação científica- Universidade Federal de Pelotas, 2005.

SCHUSTER, I.; SOUZA, M.A.; 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, p.667-671, 1997.

SCHUSTER, I. & OLIVEIRA, M. A. R. Biotecnologia no melhoramento genético In: PÍPOLO, V.C.; GARCIA, J.E. (Ed.). **Biotecnologia na Agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola; Londrina: Universidade Estadual de Londrina. 2006. p.213-237.

SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V.T.; TEIXEIRA, A.I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.3., p.247-253, 2004.

SHEWRY, P.R.; BELL, P.; DI FONZO, N.; LAMACCHIA, C.; TOSI, P.; LAZZERI, P.; BARCELO, P. Genetic Manipulation of Durum Wheat: Application to grain composition and quality In: ROYO, C.; NACHIT, M. M.; DI FONZO, N.; ARAUS, J.L.; PFEIFFER, W.H.; SLAFER, G.A. (Ed.). **Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies**. V.I. New York: Food Products Press, 2005. p. 225-253.

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

SILVA, D.B.; GUERRA, A.F.; REIN, T.A.; ANJOS, J.R.N. dos.; ALVES, R.T.; RODRIGUES, G.C. CARDOSO e SILVA, I.A. Trigo para o abastecimento familiar- do plantio a mesa. Embrapa, DF. 1996. p.176.

SILVA, S.A.; CARVALHO, F.I.F.; NEDEL, J.L.; VASCONSELLOS, N.J.S.; CRUZ, P.J.; SIMIONI, D.; SILVA, J.A.G. Composição de subunidades de gluteninas de alto massa molecular (HMW) em trigos portadores do caráter "stay-green". **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p. 679-683, 2004.

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

ZAMANI, M.J. ;BIHAMTA, M.R.; NASERINA KHIABANI, B.; HALLAJIAN, M.T. Selection of wheat mutant genotypes carrying HMW glutenin alleles related to baking

quality by using PCR (STS method). **Induced Plant Mutations in the Genomics Era**, p.436-438, 2009.

ZANATTA, A.C.A.; SILVA, S.D.dos A. e; MILANI, W.; LUZA, J.; ARENDT, P. Uso de marcadores protéicos na seleção de trigo (*Triticum aestivum* L. em. Thell) com qualidade tecnológica superior na Embrapa trigo. **Comunicado Técnico** online - Embrapa, n.85, junho, 2002.

Yuan, Z.; Chen, Q.; Zhang, L.; Yan, Z.; Zheng, Y.; Liu, D. Molecular Characterization of Two Silenced γ -type Genes for Glu-B1 in *Triticum aestivum* ssp. *Yunnanese* and ssp. *tibetanum*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, p. 93–99, 2009.