

RENATA DE OLIVEIRA DIAS

**PERFIL PROTÉICO E USO DE MARCADORES MOLECULARES
RELACIONADOS À QUALIDADE DE PANIFICAÇÃO EM TRIGO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010**

RENATA DE OLIVEIRA DIAS

**PERFIL PROTÉICO E USO DE MARCADORES MOLECULARES
RELACIONADOS À QUALIDADE DE PANIFICAÇÃO EM TRIGO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de julho de 2010.

Prof^a. Mônica Ribeiro Pirozi
(Co-orientadora)

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike

Prof. Márcio Henrique Pereira Barbosa

Dr. Juarez Campolina Machado

Prof. Moacil Alves de Souza
(Orientador)

À minha avó, Teresinha,
falecida em janeiro desse ano, aos
meus pais, Marino e Lizete, e ao
meu irmão Adriano por todo o amor
que me deram.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marino e Lizete, e ao meu irmão, Adriano, pelos exemplos de dedicação, carinho e respeito que embasaram a minha formação pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, ao Departamento de Fitotecnia e à Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade concedida, pelo apoio e estrutura.

Ao Professor Moacil Alves de Souza, pela orientação, ensinamentos e confiança.

Aos professores Mônica Ribeiro Pirozi e Glauco Vieira Miranda, pela co-orientação e fornecimento da infra-estrutura necessária para a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Melhoramento Genético de Trigo da UFV.

Aos Laboratórios de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, do Departamento de Fitotecnia e de Farinhas e Amido, Panificação e Análise de Alimentos, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

Ao Laboratório de Reologia do Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (CTAA- EMBRAPA).

Aos amigos do Programa Trigo, do Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal e a todas as amigas que construí em Viçosa, que em dois anos foram a família que pude ter por perto em minha vida. E em especial, ao Adérico e a Ludmilla, que além de grandes amigos, foram parte atuante na realização desse trabalho.

Aos meus avós, tios e amigos de Santa Catarina, que mesmo longe, estão presentes nas minhas melhores lembranças.

À todas as instituições de ensino e profissionais da educação que fizeram parte da minha vida estudantil e que me permitiram a construção dos conhecimentos necessários para chegar até aqui.

A todos o meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

RENATA DE OLIVEIRA DIAS, filha de Marino Manoel Dias e Lizete de Oliveira Dias, nasceu em 13 de agosto de 1985 na cidade de Criciúma, Santa Catarina, Brasil.

Em 2007 foi diplomada Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma - SC.

Em agosto de 2008 ingressou no curso de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa - MG, vindo a defender o título de *Magister Scientiae*, em julho de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1. Material	6
2.2. Métodos	7
2.2.1. Moagem Experimental	7
2.2.2. Caracterização da farinha de trigo.....	8
2.2.3. Marcadores genéticos	8
2.2.4. Determinação da composição protéica	9
2.2.4.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	9
2.2.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão por Exclusão Molecular (SE-HPLC) ..	10
2.2.5. Testes de qualidade.....	11
2.2.5.1. Peso Hectolítro	11
2.2.5.2. Peso de mil grãos.....	11
2.2.5.3. Número de queda.....	11
2.2.5.4. Teste de panificação	12
2.2.6. Delineamento experimental e análise estatística	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1. Moagem.....	13
3.2. Caracterização da farinha de trigo.....	14
3.3. Marcadores genéticos	17
3.4. Determinação protéica.....	19
3.4.1. SDS-PAGE	19
3.4.2. SE-HPLC	22
3.5. Testes de qualidade	27
3.5.1. Peso hectolitro, peso de mil grãos e número de queda.....	27
3.5.2. Teste de panificação	28
3.5.3. Correlação entre os parâmetros analisados	31
4. CONCLUSÕES	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
APÊNDICE	38

RESUMO

DIAS, Renata de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010.
Perfil protéico e uso de marcadores moleculares relacionados à qualidade de panificação em trigo. Orientador: Moacil Alves de Souza. Co-orientadores: Mônica Ribeiro Pirozi e Glauco Vieira Miranda.

O trigo é um dos principais cereais em todo o mundo, sendo processado para uma gama de produtos. Surgiu nas últimas décadas a preocupação dos pesquisadores com a obtenção de cultivares com boa qualidade de panificação, característica que refere-se primordialmente a constituição protéica do endosperma, composta principalmente pelas proteínas formadoras de glúten. Várias metodologias vêm sendo empregadas na avaliação dessa característica, dentre as quais, estão o SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida), SE-HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular), teste de panificação e o emprego de marcadores genéticos. Buscando comparar as diferentes metodologias existentes e propor uma estratégia a programas de melhoramento de trigo voltados à qualidade industrial, testaram-se quatro diferentes técnicas em 45 cultivares nacionais. Usaram-se seis marcadores alelo-específicos direcionados à verificação da presença das subunidades de HMW: Glu-D1-1d (5+10) e Glu-B1-2a (7+8), uma subunidade de LMW: Glu-A3d, a presença ou ausência de translocação 1B/1R: pela presença de Glu-B1 (braço longo do cromossomo de trigo) ou de ω -secalin (gene do braço curto do centeio) e puroindolina (Pinb-D1b). Também foram empregadas as metodologias de SDS-PAGE, SE-HPLC e teste de panificação. Como resultado da aplicação de marcadores obteve-se presença nos genótipos de: 71% para subunidade Glu-D1-1d (5+10), 16% para Glu-B1-2a (7+8), 60% para Glu-B1 (ausência de translocação) e 8% para Pinb-D1b e Glu-A3d. Os resultados de SDS-PAGE apontam uma prevalência das subunidades 2* e 1 no cromossomo 1A; 7+8, 7+9 e 17+18 no 1B; e 5+10 no 1D. Enquanto, os valores médios de SE-HPLC foram de 35,99% e 44,99% para as frações de proteínas poliméricas totais (PPP) e não-extraíveis (UPP), respectivamente, e 1,29 para a relação entre gliadinas e gluteninas (GLI/GLU), com variação significativa entre os genótipos ($p \leq 0,05$). O teste de panificação também apontou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as cultivares nas mesmas condições. Os dados de UPP foram independentes dos dados da proporção de PPP, significando que a porção de proteínas poliméricas não-extraíveis (UPP) não depende de maior proporção de proteínas poliméricas totais. Enquanto houve correlação positiva entre o escore dado às subunidades de HMW, avaliadas por SDS-PAGE, e os

valores de UPP; isto indica que a pontuação aparentemente vem sendo eficaz em classificar os genótipos de melhor qualidade. As cultivares sem translocação com centeio também obtiveram melhores resultados para UPP, PPP e GLI/GLU em relação as que a possuem. A relação GLI/GLU está correlacionada ao volume específico dos pães, mas aparentemente não garantiu boa qualidade nas características qualitativas, o que pode indicar a ação de gliadinas na extensibilidade, mas com falha na estruturação da rede de glúten. Esses resultados corroboram para uma seleção a favor das subunidades 5+10 de HMW, de cultivares sem translocação com centeio, com alto valor de UPP e razão apropriada de GLI/GLU, quando se objetiva melhorar a qualidade de panificação do trigo.

ABSTRACT

DIAS, Renata de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Protein profile and use of molecular markers related to baking quality of wheat.** Adviser: Moacil Alves de Souza. Co-advisers: Mônica Ribeiro Pirozi and Glauco Vieira Miranda.

Wheat is one of the principal cereals in the world and is processed into a wide range of products. In recent decades researchers have shown concern over acquisition of cultivars with good baking quality, a characteristic which initially refers to the protein composition of the endosperm, composed principally of the proteins making up gluten. Various methodologies have been employed in the evaluation of this characteristic, including SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis), SE-HPLC (size exclusion high performance liquid chromatography), baking tests and employment of genetic markers. In an attempt to compare the different existing methodologies and propose a strategy for wheat genetic improvement programs based on industrial quality, four different techniques were tests with 45 national cultivars. Six allele-specific markers were used for verification of the presence of the HMW subunits: Glu-D1-1d (5+10) and Glu-B1-2a (7+8), one LMW subunit: Glu-A3d, the presence or absence of 1B/1R translocation: by the presence of Glu-B1 (long arm of the wheat chromosome) or ω -secalin (gene of the short arm of rye) and puroindoline (Pinb-D1b). Also employed where SDS-PAGE, SE-HPLC and baking test methods. As a result of applying the markers, the presence in the genotypes observed was: 71% for subunit Glu-D1-1d (5+10), 16% for Glu-B1-2a (7+8), 60% for Glu-B1 (absence of translocation) and 8% for Pinb-D1b and Glu-A3d. The results of SDS-PAGE suggested a prevalence of the subunits 2* and 1 in chromosome 1A; 7+8, 7+9 and 17+18 in 1B; and 5+10 in 1D. The average values of SE-HPLC were 35.99% and 44.99% for the polymeric protein in protein (PPP) and unextractable polymeric protein (UPP), respectively, and 1.29 for the ratio between gliadins and glutenins (GLI/GLU), with significant variation among the genotypes ($p \leq 0.05$). The baking test also showed a significant difference ($p \leq 0.05$) between the cultivars under the same conditions. The UPP data were independent of the PPP percentage data, signifying that a portion of the unextractable polymeric protein (UPP) does not depend on the greater percentage of total polymeric proteins. However there was a positive correlation between the score of HMW subunits, evaluated by SDS-PAGE, and the UPP values; this indicates that scoring has apparently been efficient in classifying the genotypes of greatest quality. The cultivars without translocation with

rye also showed better results for UPP, PPP and GLI/GLU in relation to those possessing translocation. The GLI/LGU ratio is correlated with the specific volume of the bread, but apparently does not guarantee quality of the qualitative characteristics, which may indicate the action of gliadins in extensibility, but with a lack of structure in the gluten network. These results corroborate for the selection of HMW subunits 5+10, cultivars without translocation with rye, with high values of UPP and an appropriate GLI/GLU ratio with the objective of obtaining greater wheat baking quality.

1. INTRODUÇÃO

O trigo é um dos mais importantes cereais em todo o mundo, sendo processado para uma gama de produtos que compõem a dieta de grande parte da população. Um substancial aumento de produtividade tem se dado ao longo das últimas décadas para suprir a demanda mundial, que cresce com o aumento do consumo, principalmente nos países subdesenvolvidos. Acompanhando esse aumento, surge a necessidade de melhora na qualidade dessas cultivares, de forma a equiparar a qualidade do produto nacional ao estrangeiro. Uma das estratégias para alcançar essas metas, de produtividade e qualidade do trigo, é a implementação de ferramentas moleculares no melhoramento de plantas (Bagge *et al.*, 2007).

Há diversos métodos disponíveis para a análise da qualidade de panificação dos grãos, como a eletroforese em gel de poliacríamida (SDS-PAGE), a cromatografia líquida de alta performance por exclusão molecular (SE-HPLC), o teste de panificação e o uso de marcadores genéticos.

O trigo comum (*Triticum aestivum*), objeto desse estudo, é um hexaplóide com a combinação de genomas completos de três espécies distintas (AABBDD) (Gupta *et al.*, 2008). Nesse complexo genoma, a qualidade de panificação de cultivares de trigo vem sendo associada a diversos genes, dentre eles os que determinam a composição protéica de gluteninas de alta massa molecular (HMW-GS) e de baixa massa molecular (LMW-GS), gliadinas, presença de translocação 1B/1R, dureza do grão e locus para características quantitativas (QTLs) (Zhang *et al.*, 2008).

O primeiro fator a ser discutido em relação à qualidade de panificação são as proteínas formadoras de glúten, que são constituídas por gluteninas e gliadinas, que juntas somam aproximadamente 80% do volume total dessas proteínas.

As gluteninas são polímeros, constituídos de subunidades de alta massa molecular (HMW-GS), que são codificadas por pares de *loci* fortemente ligados, responsáveis pela variabilidade entre os cultivares, localizados no braço longo dos cromossomos 1A, 1B e 1D nos loci Glu-1A, Glu-1B e Glu-1D, respectivamente (Ahmad, 2000, Payne *et al.*, 1987). O locus pareado contém genes que codificam dois tipos de HMW-GS, o tipo-x que codifica uma subunidade geralmente com maior massa molecular e o tipo-y que codifica outra de menor massa. Essas subunidades foram nomeadas em 1983 por Payne e Lawrence, seguindo uma ordem numérica de acordo com a posição das bandas na análise por SDS-PAGE. Com a identificação de novas subunidades, essa ordenação numérica crescente foi desaparecendo (Anjum *et al.* 2007).

O trigo comum apresenta de 3 a 5 HMW-GS, isso porque ocorre silenciamento de certos genes. Dentro dessas subunidades, pode haver diferentes composições, devido a possibilidade de haver diferentes alelos em cada genoma, como descrito na Tabela 1. Estudos têm demonstrado que diferentes composições de subunidades de HMW podem apresentar diferentes resultados na qualidade de panificação. Particularmente, acredita-se que a adequada ou inadequada qualidade de panificação do trigo está associada principalmente com os dois pares alélicos do locus Glu-D1, designados 1Dx5-1Dy10 e 1Dx2-1Dy12, respectivamente (Payne *et al.*, 1987; Ahmad, 2000). Buscando-se encontrar o melhor conjunto para uma cultivar, um sistema de escores foi desenvolvido, onde cada subunidade recebeu um valor de 1 a 4 de acordo com suas características avaliadas em um grande número de cultivares (Payne *et al.*, 1987). Esses valores, que juntos podem acumular até 10 pontos de escore a uma cultivar, são expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação das subunidades de HMW para cada genoma e seus respectivos escores para qualidade de panificação.

Escore	Cromossomos/Genoma		
	1 ^a	1B	1D
4	-	-	5+10
3	1	17+18	-
3	2*	14+15	-
3	-	13+16	-
3	-	7+8	-
2	-	7+9	2+12
2	-	-	3+12
1	NULO	20	4+12
1	-	6+8	-
1	-	7	-

FONTE: Zanatta *et al.*, 2002.

As LMW-GS também têm sido associadas à qualidade na fabricação de pães, determinando as propriedades físicas da farinha (Zhang *et al.*, 2004). Essas subunidades são codificadas por genes localizados no braço curto do grupo 1 de cromossomos homólogos, nos loci Glu-A3, Glu-B3 e Glu-D3 (Gupta e Shepherd, 1990). Elas são denominadas por letras e demonstram variabilidade de acordo com a cultivar analisada (Gupta and Shepherd, 1990; Lew *et al.*, 1992).

A análise por eletroforese de LMW-GS é bastante restrita, visto que elas possuem massa molecular semelhante a algumas gliadinas, o que dificulta a sua identificação. Por isso, estudos de correlação entre a presença dessas subunidades e a qualidade de panificação são menos freqüentes do que aqueles que envolvem as HMW,

embora algumas outras técnicas mais complexas como eletroforese bidimensional e a cromatografia líquida de alta performance por fase reversa estejam sendo estudadas para a aplicação no seu estudo (Zhang *et al.*, 2004). Devido a essa dificuldade na identificação das LMW-GS, estudos utilizando marcadores genéticos para a característica têm se tornado de grande importância.

Comparações entre os diferentes alelos de HMW e LMW mostraram variações significativas na qualidade de panificação de acordo com a composição dessas proteínas. Além das subunidades codificadas por Glu-D1, as HMW-GS codificadas por Glu-A1 também influenciam significativamente em quase todas as características relacionadas, sendo o alelo NULO aparentemente inferior aos demais (Luo *et al.*, 2001).

A maior parte dos genes que codificam para ω - e γ -gliadinas estão fortemente ligados em três loci: Gli-A1, Gli-B1 e Gli-D1. Enquanto, seqüências de DNA dos genes de gliadinas revelaram que as α - e β -gliadinas são controladas por genes no cromossomo 6.

Os alelos de gliadina no locus Gli-1 são geralmente marcadores genéticos para a qualidade de panificação por causa da sua forte ligação com os alelos Glu-3 (Redaelli *et al.*, 1997, Zhang, 2003).

Além das proteínas formadoras do glúten, outras proteínas também vêm sendo associadas à qualidade industrial de cultivares de trigo. A dureza dos grãos, por exemplo, vem sendo associada a genes *Pin* que codificam a puroindolina a (Pina) e puroindolina b (Pinb), sendo que diferentes alelos possuem influências na qualidade dos grãos (Zhang *et al.* 2008). Genótipos possuindo Pinb-D1b têm maior rendimento de farinha, menor conteúdo de cinzas e melhor qualidade para pães e macarrão comparados com Pina-D1b e o tipo selvagem Pina-D1a/Pinb-D1a (Zhang *et al.* 2008, Martin *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2007).

Outro fator que vem sendo considerado na qualidade de panificação é a presença da translocação 1B/1R. Seleccionada na década de 70 por conferir resistência a doenças, como *Puccinia recondita*, *P. graminis*, *P. striiformis* e *Blumeria graminis*. Esta translocação foi introduzida no trigo por pesquisadores na China e mantém-se entre grande parte das cultivares de trigo produzidos no mundo (Chai, 2006). Envolvendo o braço curto do cromossomo 1R do centeio (*Secale cereale* L.) e o braço longo do cromossomo 1B do trigo (*Triticum aestivum*), a translocação 1BL/1RS vem sendo relacionada a mais algumas características agrônômicas favoráveis, como alta performance, estabilidade e ampla adaptação. Entretanto, graves defeitos para qualidade

na fabricação de pães, tais como, baixa tolerância a mistura e baixo volume de pão estão associados à presença da translocação (Chai, 2006).

A principal causa do efeito deletério da translocação 1BL/1RS na qualidade de panificação, provavelmente, deve-se a perda dos loci Glu-B3 e Gli-B1, que determinam redução no tamanho e qualidade do macropolímero de glúten, devido a substituição de proteínas poliméricas por monoméricas (Lelley *et al.*, 2004). Além disso, o braço cromossomal 1RS contém o locus *Sec-1* que codifica dois tipos de proteínas de armazenamento: a ω -secalin e a γ -secalin, por diferentes grupos de genes fortemente ligados (Chai *et al.*, 2005). Acredita-se que a expressão de ω -secalins seja parcialmente responsável pela baixa qualidade nas variedades com a translocação 1BL/1RS, devido a sua alta capacidade de ligação a água (Chai *et al.*, 2005, Lelley *et al.*, 2004).

Além da translocação 1B/1R, algumas cultivares também podem apresentar a translocação com o braço 1A (Weng *et al.*, 2007), embora essa variação seja menos freqüente que a outra.

Estudo de Gobaa e colaboradores (2008) confirmou o efeito negativo da translocação na qualidade de panificação, mas essa alteração foi comparável àquela produzida pelo polimorfismo de outros loci que codificam LMW-GS. Eles demonstraram também que o efeito da variação alélica no locus Glu-D3 causou ainda maior variação na tenacidade e elasticidade, podendo ser utilizado para contrabalançar os efeitos deletérios em programas que se utilizam da translocação.

Além dos marcadores genéticos, marcadores protéicos e técnicas que apurem os níveis de expressão gênica são importantes na comparação de diferentes constituições genéticas. Dentre essas técnicas, podem-se citar a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), a cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (SE-HPLC) e o teste de panificação.

A análise de SDS-PAGE, que separa as moléculas de acordo com a massa molecular, é uma técnica amplamente utilizada na avaliação da qualidade de panificação do trigo, buscando identificar a composição das proteínas formadoras do glúten. Com ampla utilização na identificação de subunidades HMW, a técnica de SDS-PAGE, aliada ao sistema de escores, permite ao melhorista fazer suposições sobre qual a linhagem mais promissora. Pesquisadores como Gao e colaboradores (2010) afirmam que a técnica apresenta algumas dificuldades que podem incluir estimativa não consistente da massa molecular e uma identificação errônea da subunidade, devido a sua baixa resolução. Apesar desses contrapontos, ela apresenta significativas vantagens

perante as demais, que são a sua simplicidade de desenvolvimento e de instrumentos, o que possibilita o seu uso em larga escala em programas de melhoramento.

Alternativamente, a técnica de SE-HPLC é empregada na quantificação das frações das moléculas formadoras do glúten. Utilizando-se de uma coluna porosa, onde as moléculas maiores são eluídas primeiro na escala de tempo, pode-se determinar a quantidade de gluteninas, gliadinas e albuminas e globulinas, de acordo com o tempo de eluição de cada pico no cromatograma. Utilizando quantidade muito pequena de farinha, a técnica mostra-se eficiente na seleção precoce de genótipos de qualidade desejável em programas de melhoramento.

A técnica de SE-HPLC permite obter valores que podem estimar o percentual de proteínas poliméricas totais (PPP), proteínas poliméricas não extraíveis (UPP) e a relação de gliadina para glutenina (GLI/GLU). Dentre esses dados, os que se mostram mais promissores são os relacionados à UPP, uma vez que o grau de solubilidade de um polímero decresce com o aumento de sua massa molecular. Sendo assim, a porção não extraível em tampão de SDS (UPP), é a porção com maior grau de polimerização, que só pode ser solubilizada diante da aplicação do ultrassom (Gupta *et al.*, 1993). Além desse dado a relação de gliadinas para gluteninas também pode ser muito importante para a avaliação de linhagens com boa qualidade de panificação, visto que ela vem sendo associada a maior quantidade de gluteninas e proteínas poliméricas e menor proporção de gliadinas (Blechl *et al.*, 2007; Rakszegi *et al.*, 2005; León *et al.*, 2010).

Outra técnica que pode ser utilizada na identificação da qualidade da farinha de trigo é o teste de panificação. Apesar de ser o teste teoricamente mais correlacionado à qualidade industrial do trigo, a técnica emprega uma quantidade de farinha muito elevada, o que representa significativa perda de tempo e de recursos no processo de desenvolvimento de nova cultivar.

Considerando a dificuldade de escolha de metodologias apropriadas que possam ser utilizadas em programas de melhoramento de trigo, objetivou-se no presente trabalho, comparar diferentes métodos de análise da qualidade industrial de trigo e propor estratégias direcionadas à maior eficiência de seleção. Para isso, objetivou-se especificamente:

- a) Empregar marcadores genéticos para a qualidade de panificação, de forma a conhecer a composição das cultivares em relação a alguns genes de interesse e a translocação com o centeio;
- b) Caracterizar as cultivares estudadas conforme composição de gluteninas HMW, por meio de SDS-PAGE;

- c) Estimar os valores de PPP, UPP e relação GLI/GLU para as cultivares, por meio do emprego da técnica de SE-HPLC;
- d) Analisar a qualidade de panificação, por meio da fabricação de pães, que permitem simular e visualizar o processo industrial;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Sementes de 43 cultivares e duas linhagens elite (Tabela 2) foram multiplicadas no Campo Experimental Diogo Alves de Melo, pertencente ao Departamento de Fitotecnia/ Universidade Federal de Viçosa, com plantio em maio de 2009, sob as mesmas condições ambientais.

Tabela 2 - Cultivares de trigo utilizadas e o seu respectivo cruzamento, classe e obtentor.

Cultivares	Cruzamento	Classe*	Obtentor
IPR 85	IAPAR30/BR18	Melhorador	IAPAR
IPR 136	TAW/SARA//BAU/3/ND674*2/IAPAR29	Melhorador	IAPAR
BRS 210	CPAC89118/3/BR23//CEP19/PF85490	Melhorador	EMBRAPA
BRS Pardela	BR18/P9099	Melhorador	EMBRAPA
BRS Tangará	BR23*2/PF940382	Melhorador	EMBRAPA
CD 104	PFAU"S"/CAETÉ	Melhorador	COODETEC
CD 108	TAM200/TURACO	Melhorador	COODETEC
CD 109	MUNIA/BAGULA	Melhorador	COODETEC
CD 111	Embrapa27/OCEPAR18//Anahuac75	Melhorador	COODETEC
CD 116	MILAN/MUNIA	Melhorador	COODETEC
Fundacep Cristalino	BR35/CEP9291/4/BR32/3/CNO79/PF7035 4/MUS"S"	Melhorador	FUNDACEP
Embrapa 22	VeerySib/3/KLTOSib/PAT19//Mochis/Jup ateco	Melhorador	EMBRAPA
Embrapa 42	LAP689/MS7936	Melhorador	EMBRAPA
BRS 254	Embrapa22*3/Anahuac	Melhorador	EMBRAPA
BRS264	BUCKBUCK/CHIROCA//TUI	Melhorador	EMBRAPA
IAC 24	IAS51/IRN597-70	Melhorador	IAC
IAC 364	CM55517/CMR//BUCSIB/3/IAC24	Melhorador	IAC
IPR 130	RAYON/VEE#6/TRAP#1	Pão/ Melhorador	IAPAR
IPR 84	ANA/PF7455//PF72556/3/PAM"S"/ALD" S"/KAVKO"S"	Pão	IAPAR
IPR 87	IOC878/IAPAR29	Pão	IAPAR
IPR 118	OC852/PG8852	Pão	IAPAR
IPR 128	VEE/LIRA//BOW/3/BCN/4/KAUZ	Pão	IAPAR

(Continua)

(Continuação)

IPR 129	IA976/LD972	Pão	IAPAR
BRS 208	CPAC89118/3/BR23//CEP19/PF85490	Pão	EMBRAPA
BRS 220	Embrapa16/TB108	Pão	EMBRAPA
BRS 229	Embrapa27*3//BR35/B.PONCHO	Pão	EMBRAPA
BRS 248	PAT7392/PF89232	Pão	EMBRAPA
BRS 249	Embrapa16/ANA79	Pão	EMBRAPA
BRS Guamirin	Embrapa27/BUCKNANDU//PF93159	Pão	EMBRAPA
CD 110	Anauhac75/Embrapa27	Pão	COODETEC
CD 114	PF89232/OC 38	Pão	COODETEC
CD 117	PF87373/OC938	Pão	COODETEC
Abalone	ORL93299/3/ORL92171//EMB16/2*OR1/4/RUBI	Pão	OR Sementes
Marfim	ORL 94101/2*ORL95688	Pão	OR Sementes
Quartzo	ONIX/AVANTE	Pão	OR Sementes
Safira	PF9099/OR1//GRANITO	Pão	OR Sementes
Anahuac	II12300//LermaRojo64/8156/3/Norteno67	Pão	CIMMYT
Aliança	PF858/OCEPAR11	Pão	EPAMIG/UFV
BRS 207	Seri82/PF813	Pão	EMBRAPA
VI 98053	Embrapa22/BR12	Pão	UFV
UFVT 1-Pioneiro	Veery5/NACUZARI	Pão	UFV
BRS Louro	PF869114/BR23	Brando	EMBRAPA
IVI 01041	TRAP#1/YACO/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ	Brando	UFV

*Característica definida em função das determinações analíticas de alveografia (força de glúten) e número de queda (*Falling Number*), de acordo com a Normativa nº 7, de 15 de agosto de 2001, do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAA).

2.2. Métodos

2.2.1. Moagem Experimental

A moagem experimental foi realizada no Laboratório de Reologia do Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (CTAA-EMBRAPA).

Para a obtenção da farinha de trigo, os grãos foram condicionados para 14% de umidade (bu) por aproximadamente 16 horas, sendo a umidade dos grãos de trigo determinada por secagem por radiação infravermelha em balança de umidade da marca Shimadzu série MOC-120H, para o qual utilizaram-se 2 g da amostra integral de trigo moída em moinho de cone Brabender.

Após o condicionamento, procedeu-se a moagem dos grãos em moinho de rolos Brabender, modelo Quadrumat® Junior, segundo o método da AACC 26-50 (2000). O

rendimento de moagem foi analisado pelo percentual de farinha em relação total produzido na moagem.

2.2.2. Caracterização da farinha de trigo

As amostras de farinha de trigo foram avaliadas quanto ao teor de umidade, cinzas e proteína total, pelas metodologias AACC 44-15A (1995), AACC 08-01 (1995) e Micro-Kjeldahl da AOAC (1995), respectivamente, sendo utilizado o fator de multiplicação 5,7 para a conversão do teor de nitrogênio para proteína total.

2.2.3. Marcadores genéticos

O DNA genômico foi extraído de folhas frescas de plantas únicas com 15 dias após a germinação. Ao tecido foliar macerado foi adicionado 1000µl de tampão CTAB 2% (0,2 M de Tris HCl – pH 8,0; 2 M de NaCl e 0,05 M de EDTA – pH 8,0), incubando-o por uma hora em banho-maria à 65°C, invertendo-se o tubo, levemente, a cada 10 minutos. Após um período de resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 600 µl de fenol/clorofórmio/isoamil (25:24:1), homogeneizando a mistura por 15 minutos, que em seguida foi centrifugada por 10 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e repetida a etapa com fenol/clorofórmio/isoamil (25:24:1). Em seguida, o novo sobrenadante foi incubado *overnight* à -20°C com 600 µl de álcool-acetato de sódio (20:1). O precipitado foi centrifugado a 13.000 rpm por 6 minutos e o *pellet* formado lavado com etanol 70% e 95% e ressuspenso em 200 µl de TE 0,1X com RNase (8 µL de 10 mg/ml da solução de RNase por mL de TE 0,1X), sendo as amostras incubadas por 10 minutos a 65°C.

Como marcadores foram utilizados os *primers* alelos-específicos propostos por Zhang *et al.* (2008) para características correlacionadas a qualidade industrial (Tabela 3). Dois marcadores foram utilizados para determinar a presença de translocação com o centeio, sendo um para determinar a presença de ω -secalin (proteína do braço 1R do centeio) e outro para determinar a presença do braço curto do trigo (Glu-B3). Para determinar a presença da fração de gluteninas de baixa massa molecular (LMW-GS) foi utilizado o marcador Glu A3-d, e para as gluteninas de alta massa molecular (HMW-GS) foram utilizados dois marcadores: Glu-D1x5 (5+10) e Glu-B1y8 (7+8). Um sexto marcador, Pinb-D1b, foi utilizado para detectar a presença da Puroindolina b-D1b.

A reação de PCR se deu num volume total de 20 µl, contendo tampão 1x, 0,1 mM de DNTp, 0,25 µM de cada *primer*, 50 ng de DNA, 1 mM de MgCl₂ e 0,5 U de *Taq polimerase*, nas condições de tempo e temperatura descritas na Tabela 4. A corrida

Tabela 3 – Sequência dos *primers* e seus respectivos tamanhos de fragmento esperados.

Gene/ locus	Sequência de <i>primers forward e reverse</i>	Fragmento (pb)	Referência
ω -secalin	5'-ACCTTCCTCATCTTTGTCCT-3' 5'-CCGATGCCTATACCACTACT-3'	1076	Chai <i>et al.</i> , 2006
Glu-A3d	5'-ACCAGTTATTTCATCCATCTGCTC-3' 5'-GTGGTTTCGTACAACGGCTCG-3'	488	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Glu-B3	5'-GGTACCAACAACAACAACCC-3' 5'-GTTGCTGCTGAGGTTGGTTC-3'	636	van Campenhout <i>et al.</i> , 1995, de Froidmont 1998
Glu-B1-2a	5'-TTAGCGCTAAGTGCCGTCT-3' 5'-TTGTCCTATTGCTGCCCTT-3'	527	Lei <i>et al.</i> , 2006
Glu-D1-1d	5'-GCCTAGCAACCTTCACAATC-3' 5'-GAAACCTGCTGCGGACAAG-3'	450	D'Ovidio e Anderson, 1994
Pinb-D1b	5'-ATGAAGACCTTATTCCTCTA-3' 5'-CTCATGCTCACAGCCGCT-3'	250	Giroux e Morris, 1997

FONTE: Zhang *et al.* (2008)

Tabela 4 – Condições da PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Pré-desnaturação	94	3	
Desnaturação	94	1	
	59 (Pinb-D1b)		
Anelamento	60 (ω -secalin e Glu-B3) 62 (Glu-A3d, Glu-B1-2a, Glu-D1-1d)	1	35
Extensão	72	1	
Extensão final	72	10	
Armazenamento	4	Forever	

eletroforética foi realizada em gel de agarose na concentração de 2%, por 90 minutos a aproximadamente 150 V. A revelação do gel deu-se pela coloração com Brometo de Etídeo e fotodocumentação em transiluminador L-PIX ST.

2.2.4. Determinação da composição protéica

2.2.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Para a caracterização das subunidades HMW de glutenina utilizou-se a técnica de SDS-PAGE unidimensional, conforme metodologia descrita por Pirozi (2008). O preparo do gel e da amostra ocorreu de acordo com o método de Laemmli (1970) com pequenas modificações, segundo Pirozi e colaboradores (2008), que utilizou mini-géis de poliacrilamida (12%T - gel de separação e 5%T - gel de empilhamento) com 1 mm de espessura.

As amostras foram preparadas com 50 mg de farinha em 1 mL de solução tampão redutora contendo β -Mercaptoetanol e agitadas em um vórtex até completa

dispersão da farinha no tamponante. Após completa extração da proteína, as amostras foram levadas ao banho a $93^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco minutos e centrifugadas a 12000 rpm por cinco minutos. As amostras foram injetadas em volumes de 5 μL e moveram sob um campo elétrico constante de 100 V por aproximadamente 4 horas.

Os géis foram corados utilizando corante Azul Brilhante de Cromassie- R (CBB-R). O excesso do corante revelador do fundo do gel foi removido pela imersão do gel revelado em solução contendo ácido acético, metanol e água.

Os padrões de eletroforese foram preparados com farinha de trigo das cultivares BRS 220 (P1 = N, 7+8 e 2+12), IPR 85 (P2 = 1, 17+18 e 5+10), IAPAR 78 (P3 = N, 7+9 e 2+12), IPR 87 (P4 = 1, 17+18 e 2+12), SHANGAI (P5 = N, 13+19 e 5+10), BRS 210 (P6 = 1, 17+18 e 2+12) e IAPAR 6 (padrão utilizado em repetição para confirmação de $2^* = 2^*$, 13+16 e 5+10), com conhecida codificação para subunidades HMW de gluteninas. Os padrões foram então intercalados entre as amostras, para que fosse feita a comparação entre as bandas.

2.2.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (SE-HPLC)

A cromatografia líquida por exclusão molecular foi realizada utilizando o método descrito por Pirozi e colaboradores (2008) e Rubio e colaboradores (2005), que possibilita a distinção de frações de proteína polimérica total (PPP), proteína polimérica extraível (PPE) e proteína polimérica não extraível (UPP).

A sequência para extração das proteínas poliméricas totais consistiu da adição de solução tampão com SDS (0,5% de SDS em 0,05 M de fosfato, pH 6,9) à amostra de farinha, agitação em vórtex por 5 minutos e tratamento da suspensão em sonicador de haste na potência de 8 W por 16 minutos (4 pulsos de 4 segundos cada) e centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante filtrado (em filtro de nylon de 45 μm) foi aquecido a $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por dois minutos e resfriado em banho de gelo.

A extração das proteínas poliméricas extraíveis seguiu-se da mesma maneira que para as totais, no entanto, sem sonicação. Após separar o sobrenadante, o resíduo foi usado para a obtenção das proteínas poliméricas não-extraíveis. Foi adicionado 1 mL da solução tampão-SDS ao resíduo precipitado e agitado em vórtex por 10 minutos. A suspensão foi tratada em sonicador de haste na potência de 8 W por 24 segundos. (6 pulsos de 4 segundos), seguida de centrifugação e filtração, da mesma forma que para as porções anteriores.

As amostras extraídas foram analisadas por SE-HPLC em um sistema SHIMADZU SCL-10AVP com injeção automática de 20 µL em uma coluna de exclusão molecular Phenomenex Biosep-SEC S4000 (300x7.8 mm). A fase móvel foi constituída de solução contendo acetonitrila e água (grau HPLC) na proporção de 1:1 contendo 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). Com tempo de eluição e comprimento de onda de 15 minutos e 214 nm, respectivamente.

No cromatograma obtido para proteína total de trigo observou-se três picos principais correspondentes, em ordem do aumento do tempo de eluição, às gluteninas (pico 1), gliadinas (pico 2) e albuminas/globulinas (pico 3).

A percentagem de proteína polimérica total (PPP) em relação ao total de proteína extraída e a porcentagem de proteína polimérica não extraível (UPP) em relação ao total de proteína polimérica foram calculadas pelas equações 1 e 2:

$$PPP = [(Área Pico 1_{PPT}) / (Área total)] * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

$$UPP = [(Área Pico 1_{PPNE}) / (Área Pico 1_{PPNE} + Área Pico 1_{PPE})] * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

A relação entre gliadinas e gluteninas presentes na amostra foi realizada de acordo com a equação 3:

$$GLI/GLU = (Área do Pico 2_{PPT}) / (Área do Pico 1_{PPT}) \quad (\text{Equação 3})$$

2.2.5. Testes de qualidade

2.2.5.1. Peso do hectolitro

O peso do hectolitro (PH) foi determinado em balança de Dalle Molle, utilizando a metodologia proposta pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1992), com o valor expresso em kg hL⁻¹.

2.2.5.2. Peso de mil grãos

O peso de mil grãos (PMG) também foi determinado de acordo com as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1992), por meio da contagem manual de 100 grãos de trigo, em quadruplicada, e expresso pela massa média (em gramas) multiplicada por 10.

2.2.5.3. Número de queda

O número de queda foi determinado no aparelho *Falling Number* (modelo 1600 da *Falling Number*), de acordo com o método 56-81B da AACC (1995), utilizando

duplicadas de sete gramas de amostra, corrigido para 14% de umidade, com os resultados expressos em segundos.

2.2.5.4. Teste de panificação

Os pães foram elaborados segundo teste de panificação de micro-escala de acordo com o método da AACC 10-10B (1995) com modificações de acordo com Santos (2008), utilizando-se para cada amostra 35 g de farinha de trigo (14% bu) e os demais ingredientes em Baker's %, conforme a Tabela 5. E apenas para os pães utilizados como padrão foi acrescido 3% de glúten vital na constituição da massa.

Tabela 5 - Formulação dos pães para o teste de panificação.

INGREDIENTE	FORMULAÇÃO (BAKER'S %)
Açúcar	6,0
Fermento biológico	5,5
Sal	1,5
Gordura vegetal hidrogenada	1,0

O cálculo da quantidade de água a ser adicionada, baseada em 60% de absorção, levou em consideração o teor de proteína e umidade da farinha.

A massa foi formada em uma batedeira Arno, adaptada para trabalhar com pequena quantidade de amostra com misturador do tipo garfo com dois dentes, misturando inicialmente os ingredientes secos até completa homogeneização, e adição de água até o desenvolvimento da massa. A massa foi boleada, deixada em repouso por 20 minutos e dividida em cinco alíquotas de 10 g cada. Depois de modelados manualmente, os pães passaram por um período de fermentação de 40 minutos e foram assados em formas de alumínio com 52,8 X 15,6 X 23,8 mm de dimensão.

O volume e a massa foram medidos após 25 minutos do término do forneamento, pelo método de deslocamento de sementes (modificado de AACC 10-05, 2000) e o volume específico foi calculado pela razão entre o volume do pão assado e sua massa ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$).

Os pães foram avaliados subjetivamente por cinco avaliadores treinados, pelas características externas de cor da crosta, quebra e simetria (20 pontos totais), e pelas internas de cor do miolo e estrutura das células do miolo (30 pontos totais). Para cada característica as amostras receberam notas de 1-10, tanto maior quanto melhor a qualidade comparada ao controle, o qual recebeu nota 10 para todos os parâmetros avaliados. As amostras que apresentaram qualidade superior ou equivalente ao controle

receberam nota máxima (10).

Os pães foram armazenados sob congelamento a -18°C e descongelados a temperatura ambiente no dia da avaliação.

2.2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com exceção do teste de panificação, no qual os avaliadores foram utilizados como blocos. Os dados obtidos foram analisados pelo *software* Genes (versão 2007.0.0), onde foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas e agrupadas pelo teste Scott e Knott a 5% de probabilidade. Ao final do trabalho, os diferentes parâmetros analisados, foram submetidos à análise de correlação de Pearson.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Moagem

Dentre as 45 cultivares/linhagens elite apenas 35 apresentaram quantidade suficiente de grãos (200g) e foram submetidas à moagem e aos testes que necessitavam de maior quantidade de farinha. Os valores de umidade das sementes e rendimento de farinha em relação ao total obtido na moagem são relacionados na Tabela 6. O rendimento médio de farinha das cultivares foi de 59,32%.

Tabela 6 – Resultados da análise de umidade dos grãos de trigo e rendimento de farinha em relação ao farelo.

Cultivar	Umidade (%)	Rendimento (%)
Iapar 78	11,99	50,37
IPR 84	12,20	57,47
IPR 85	13,12	61,49
IPR 87	13,80	60,18
IPR 110	13,52	52,19
IPR 118	14,26	61,93
IPR 128	12,90	62,69
IPR 129	14,34	57,49
IPR 136	12,56	57,96
BRS 220	12,54	57,36
BRS 229	12,40	62,77
BRS 248	14,58	54,18
BRS 249	12,30	55,74
BRS Pardela	13,92	58,94
BRS Tangará	12,12	61,79

(Continua)

(Continuação)		
CD 104	13,42	63,52
CD 110	12,44	56,67
CD 114	14,61	54,17
CD 117	12,36	62,84
Abalone	11,66	57,21
Marfim	14,38	48,52
Quartzo	12,38	64,73
Safira	12,14	62,89
Embrapa 22	14,38	66,59
Embrapa 42	14,42	66,19
BRS 254	14,26	65,90
BRS 264	14,49	69,36
IAC 24	14,90	60,24
IAC 364	14,19	60,47
Anahuac	13,90	54,26
Aliança	14,47	60,36
BRS 207	14,18	58,22
VI 98053	13,98	57,77
IVI 01041	14,77	56,72
Pioneiro	14,68	56,95

3.2. Caracterização da farinha de trigo

A farinha das diferentes cultivares foram analisadas em termos de umidade, cinzas e teor de proteína total. As amostras foram testadas em triplicatas, sendo os valores obtidos submetidos à ANOVA ($p \leq 0.05$) e agrupamento de médias por Scott e Knott. Os resultados de umidade, cinzas e proteína total são expressos nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

Dos resultados obtidos obteve-se média geral de 11,04% ($\pm 0,66$) para a umidade da farinha. Esses valores encontram-se próximos ao relatado pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA (USP, 2010) de 10,52%, sendo que não há evidências diretas entre o seu valor e a qualidade final de panificação.

Em relação às cinzas, buscaram-se farinhas com menor teor uma vez que esta característica está relacionada a menor contaminação com farelo, desejável em termos de farinha especial para panificação. Nas amostras analisadas obteve-se teor médio de 0,72%, que é superior ao descrito pela TBCA, de 0,51% (USP, 2010).

O teor total de proteínas das cultivares estudadas atingiu valor médio de 10,34% ($\pm 0,23$), o que é inferior ao relatado pela TBCA (USP, 2010) de 11,66%. Entre os valores obtidos, apenas o primeiro grupo de médias, composto de cinco cultivares, apresentou resultado semelhante ao descrito, variando entre 11,52 a 12,52%.

Tabela 7 – Resultados da caracterização da farinha de trigo, de acordo com a umidade.

Cultivar/ Linhagens	Umidade (%)
BRS 249	12,38a
IPR 118	12,28a
Iapar 78	12,02a
BRS 264	11,91a
IPR 85	11,87a
IPR 84	11,71a
IPR 87	11,63a
BRS 220	11,56a
CD 110	11,53a
IPR 110	11,51a
IPR 136	11,37a
CD 114	11,27a
BRS Pardela	11,22a
Embrapa 22	11,22a
IAC 364	11,19a
BRS 229	11,00b
BRS 254	10,97b
Anahuac	10,96b
Pioneiro	10,93b
IPR 129	10,84b
Embrapa 42	10,83b
IVI 01041	10,80b
BRS 207	10,74b
IPR 128	10,72b
BRS Tangará	10,67b
Abalone	10,67b
IAC 24	10,63b
Quartzo	10,61b
VI 98053	10,60b
Safira	10,53b
CD 117	10,46b
Aliança	10,40b
BRS 248	9,99b
CD 104	9,92b
Marfim	9,39b

* Valores seguidos da mesma letra foram agrupados estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste Scott e Knott.

Tabela 8 – Resultados da caracterização da farinha de trigo, de acordo com teor de cinzas.

Cultivar/ Linhagens	Cinzas (%)
Embrapa 22	1,39a
IAC 24	1,33a
BRS 254	1,32a
IPR 87	0,98b
Embrapa 42	0,90c
IPR 85	0,88c
IPR 129	0,85c
VI 98053	0,84c
IAC 364	0,82c
BRS 207	0,77d
Iapar 78	0,74d
IPR 110	0,72d
IPR 118	0,71d
Anahuac	0,71d

(Continua)

(Continuação)	
BRS 220	0,67e
BRS 264	0,67e
Safira	0,66e
IPR 128	0,64e
Pioneiro	0,64e
BRS Pardela	0,64e
BRS 249	0,63e
IPR 136	0,63e
IPR 84	0,62e
IVI 01041	0,62e
BRS Tangará	0,62e
BRS 229	0,56f
Abalone	0,56f
CD 114	0,55f
CD 117	0,54f
CD 104	0,54f
Quartzo	0,51f
CD 110	0,49f
Aliança	0,47f
BRS 248	0,44f
Marfim	0,44f

* Valores seguidos da mesma letra foram agrupados estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste Scott e Knott.

Tabela 9 – Resultados da caracterização da farinha de trigo, de acordo com teor de proteína total.

Cultivar/ Linhagens	Proteína total (%)
Embrapa 42	12,52a
IPR 136	12,07a
Embrapa 22	11,69a
BRS 220	11,61a
CD 117	11,52a
Iapar 78	11,25b
IPR 129	11,11b
IPR 84	11,07b
BRS 248	11,01b
IAC 24	10,80b
IPR 118	10,63b
IPR 87	10,62b
BRS 207	10,55b
Anahuac	10,53b
BRS 254	10,49b
IPR 110	10,47b
Aliança	10,44b
Abalone	10,21c
BRS 229	10,19c
IPR 85	10,16c
Marfim	10,11c
VI 98053	10,09c
CD 104	10,05c
CD 114	9,88c
BRS 249	9,78c
IAC 364	9,76c
BRS Tangará	9,67c
Safira	9,61c
BRS Pardela	9,44d

(Continua)

(Continuação)	
IVI 01041	9,34d
BRS 264	9,29d
IPR 128	9,29d
Pioneiro	9,27d
CD 110	9,16d
Quartzo	8,09e

* Valores seguidos da mesma letra foram agrupados estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste Scott e Knott.

3.3. Marcadores genéticos

O uso de marcadores moleculares levou a identificação da presença de genes de interesse nas cultivares estudadas, conforme descrito na Tabela 10.

Pelos resultados obtidos, constata-se prevalência da subunidade 5+10 de gluteninas de alta massa molecular (HMW-GS) em relação a sua ausência no genoma D (71,11%). Esses resultados foram confirmados por SDS-PAGE (Tabela 11), onde apenas uma das cultivares que não obteve amplificação do alelo com o uso dos marcadores apresentou a subunidade 5+10 confirmada por eletroforese.

Em relação ao gene Glu-D1-2a, que codifica a subunidade 8 (7+8) de HMW-GS do genoma B, obteve-se uma frequência de 16%. Todas as cultivares que apresentaram amplificação para este gene puderam ser comprovadas por meio de SDS-PAGE (Tabela 11), exceto quatro cultivares que apresentaram a banda em SDS-PAGE e não obtiveram amplificação em PCR.

A presença do gene de ω -secalin presente no braço curto do centeio foi encontrada em 36% das cultivares estudadas, enquanto a presença do braço longo do trigo (Glu-B3) foi encontrada em 69%. Em três casos ocorreu a presença de ambos os genes, o que pode determinar que a translocação não ocorreu com o braço 1B do trigo e sim com o 1A, como já descrito na literatura (Weng et al., 2007). Em uma das cultivares não ocorreu amplificação para nenhum dos genes.

O alelo Glu-A3d, que codifica uma subunidade de glutenina de baixa massa molecular (LMW-GS), e o PinD1-b, que determina a presença de alelo desejável de puroindolina, apresentaram frequência de 8,9%.

Considerando a importância da constituição proteica das cultivares e da presença de translocação para a qualidade de panificação, esses resultados são importantes na escolha dos genitores para cruzamentos. Segundo Liu e colaboradores (2005) a presença de HMW-GS e LMW-GS não desejáveis, juntamente com a presença da translocação 1B/1R são responsáveis pelas baixas propriedades do glúten nas cultivares de trigo chinesas. Eles afirmam que reduzindo a frequência da translocação e introduzindo os

Tabela 10 – Resultados obtidos pela aplicação dos marcadores.

Cultivar/ linhagem	Glu-D1-1d	Glu-B1-2a	ω -secalin	Glu-B3	Glu-A3d	Pinb-D1b
Iapar 78	-	-	+	-	-	-
IPR 84	+	-	+	-	-	+
IPR 85	+	-	-	+	-	-
IPR 87	-	-	-	+	-	-
IPR 110	+	-	+	-	-	-
IPR 118	+	+	+	-	-	-
IPR 128	+	-	-	+	-	-
IPR 129	+	-	+	-	-	-
IPR 130	+	-	-	+	-	-
IPR 136	+	-	-	+	+	-
BRS 208	-	-	-	+	-	-
BRS 210	-	-	-	+	-	-
BRS 220	-	-	+	-	-	-
BRS 229	+	-	-	+	-	+
BRS 248	-	-	+	-	-	+
BRS 249	+	+	+	+	-	-
BRS Guamirim	-	-	-	+	-	-
BRS Louro	-	-	+	-	-	-
BRS Pardela	+	-	-	+	-	-
BRS Tangará	+	-	+	-	-	-
CD 104	+	-	-	+	-	-
CD 108	+	-	+	+	-	-
CD 109	-	-	+	-	-	-
CD 110	-	+	-	+	-	-
CD 111	+	+	-	+	-	-
CD 114	+	-	+	-	-	-
CD 116	+	+	-	+	+	-
CD 117	+	-	-	+	-	-
Abalone	+	-	+	+	-	-
Marfim	+	-	-	+	-	-
Quartzo	+	-	-	+	+	-
Safira	+	-	-	+	-	-
Fundacep Cristalino	-	-	-	+	-	-
Embrapa 22	+	-	-	+	-	-
Embrapa 42	+	-	-	+	-	+
BRS 254	+	-	-	+	-	-
BRS 264	+	-	-	+	-	-
IAC 24	-	-	-	-	+	-
IAC 364	+	-	-	+	-	-
Anahuac	+	+	-	+	-	-
Aliança	+	-	-	+	-	-
BRS 207	+	-	+	-	-	-
VI 98053	+	-	-	+	-	-
IVI 01041	-	+	+	-	-	-
Pioneiro	+	-	-	+	-	-

* O símbolo “-” indica a ausência e o “+” a presença de uma banda.

genes que codificam HMW-GS: 1, 7+8, 14+15 e 5+10 e as LMW-GS: GluA3d e Glu-B3d, pode-se aumentar a força do glúten das cultivares.

3.4. Determinação da composição protéica

3.4.1. SDS-PAGE

O padrão eletroforético das amostras apresenta três frações distintas de acordo com o tamanho das cadeias protéicas, sendo a porção superior, de maior massa molecular, correspondente às HMW-GS, seguidas das ω -gliadinas, D-subunidades, das LMW-GS e α - e γ -gliadinas, conforme se apresenta à Figura 2. Os resultados obtidos por SDS-PAGE são referentes à porção de subunidades de gluteninas HMW e estão descritos na Tabela 11. O escore ainda foi ajustado em genótipos com presença de translocação (Tabela 12), conforme o proposto por Zanata e colaboradores (2008), de maneira que as cultivares que a possuem tem subtraído do seu escore 3, 2 ou 1 ponto, para genótipos com escore entre 8 e 10, 5 e 7 ou 4, respectivamente.

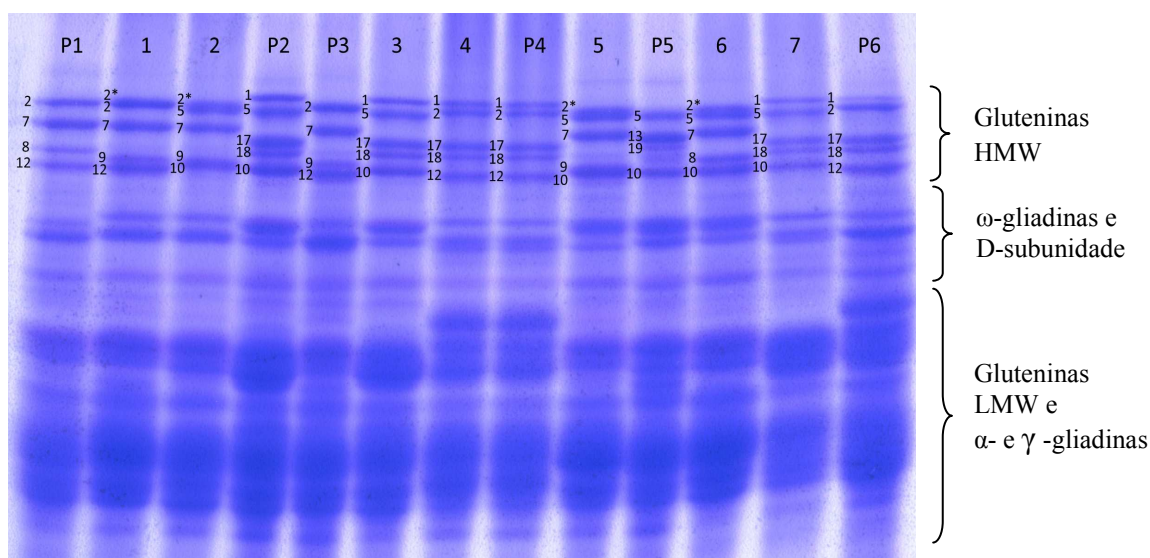


Figura 1 – Gel de eletroforese em poliacrilamida, onde se pode distinguir as subunidades de HMW-GS e apenas constatar a presença de LMW-GS e Gliadinas, sem boa resolução para as últimas. P1 e P6: indicam os padrões e os números de 1 a 7, indicam a codificação das sete primeiras amostras.

Nos resultados obtidos se observa para o cromossomo 1A, a prevalência das subunidades 1 e 2*, estando presentes cada uma em 44,44% das cultivares/linhagens e juntas somam-se 88,88% em relação as cultivares sem amplificação de subunidade (Nulo). As subunidades 1 e 2* são descritas como importantes fontes de qualidade, enquanto o alelo Nulo é classificado de baixo valor qualitativo (Liu *et al.*, 2008).

Tabela 11 – Resultados obtidos pela caracterização da composição de HMW-GS por SDS-PAGE, seguido do escore acumulado para cada cultivar.

Cultivar/ Linhagem	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	Escore
IPR 85	1	17+18	5+10	10
IPR 118	2*	7+8	5+10	10
IPR 128	1	17+18	5+10	10
IPR 136	2*	13+16	5+10	10
BRS 249	2*	7+8	5+10	10
BRS Pardela	2*	17+18	5+10	10
BRS Tangará	2*	17+18	5+10	10
CD 104	2*	13+16	5+10	10
CD 111	1	7+8	5+10	10
CD 116	2*	7+8	5+10	10
Marfim	2*	7+8	5+10	10
Embrapa 22	1	7+8	5+10	10
Embrapa 42	1	17+18	5+10	10
BRS 254	1	7+8	5+10	10
BRS 264	1	17+18	5+10	10
IAC 364	1	13+16	5+10	10
Anahuac	1	7+8	5+10	10
Pioneiro	1	17+18	5+10	10
IPR 84	2*	7+9	5+10	9
IPR 110	2*	7+9	5+10	9
IPR 129	1	7+9	5+10	9
IPR 130	2*	7+9	5+10	9
BRS 229	2*	7+9	5+10	9
CD 108	2*	7+9	5+10	9
CD 109	2*	7+9	5+10	9
CD 114	1	7+9	5+10	9
CD 117	2*	7+9	5+10	9
Abalone	2*	7+9	5+10	9
Quartzo	1	7+9	5+10	9
Safira	2*	7+9	5+10	9
Aliança	2*	7+9	5+10	9
BRS 207	1	7+9	5+10	9
VI 98053	1	7+9	5+10	9
IPR 87	2*	17+18	2+12	8
BRS 248	1	17+18	2+12	8
CD 110	1	7+8	2+12	8
IAC 24	1	13+16	2+12	8
IVI 01041	1	7+8	2+12	8
Iapar 78	2*	7+9	2+12	7
BRS 208	1	7+9	2+12	7
BRS 210	N	17+18	2+12	6
BRS 220	N	7+8	2+12	6
Fundacep Cristalino	N	13+16	2+12	6
BRS Guamirim	N	7+9	2+12	5
BRS Louro	N	7+9	2+12	5

Tabela 12 – Escore para a composição protéica de HMW-GS ajustado pela presença de translocação.

Cultivar/ Linhagem	Escore	Trans- locação	Escore ajustado
IPR 85	10	Ausente	10
IPR 128	10	Ausente	10
IPR 136	10	Ausente	10
BRS Pardela	10	Ausente	10
CD 104	10	Ausente	10
CD 111	10	Ausente	10
CD 116	10	Ausente	10
Marfim	10	Ausente	10
Embrapa 22	10	Ausente	10
Embrapa 42	10	Ausente	10
BRS 254	10	Ausente	10
BRS 264	10	Ausente	10
IAC 364	10	Ausente	10
Anahuac	10	Ausente	10
Pioneiro	10	Ausente	10
IPR 130	9	Ausente	9
BRS 229	9	Ausente	9
CD 117	9	Ausente	9
Quartzo	9	Ausente	9
Safira	9	Ausente	9
Aliança	9	Ausente	9
VI 98053	9	Ausente	9
IPR 87	8	Ausente	8
CD 110	8	Ausente	8
IPR 118	10	Presente	7
BRS 208	7	Ausente	7
BRS Tangará	10	Presente	7
IPR 84	9	Presente	6
IPR 110	9	Presente	6
IPR 129	9	Presente	6
BRS 210	6	Ausente	6
CD 109	9	Presente	6
CD 114	9	Presente	6
Fundacep Cristalino	6	Ausente	6
BRS 207	9	Presente	6
Iapar 78	7	Presente	5
BRS 248	8	Presente	5
BRS Guamirim	5	Ausente	5
IVI 01041	8	Presente	5
BRS 220	6	Presente	4
BRS Louro	5	Presente	3
BRS 249	10	-	-
CD 108	9	-	-
Abalone	9	-	-
IAC 24	8	-	-

“-“ Cultivares onde não foi possível comprovar a presença ou ausência de translocação pela utilização de marcadores genéticos.

Para o cromossomo 1B obtiveram-se resultados mais distribuídos, apresentando em ordem decrescente de número de aparições: 7+9 (42,22%), 7+8 (24,44%), 17+18 (22,22%) e 13+16 (11,11%). O que aponta uma prevalência da subunidade 7+9, embora ela não pertença ao grupo com maior escore. A distribuição das subunidades de Glu-B1 pode indicar, que apesar do sistema de escore determinar diferenças entre as subunidades encontradas, elas não possuem impacto tão expressivo quanto as dos outros genomas e, por isso, não vêm sendo alvo de seleção.

Enquanto isso, para o cromossomo 1D, novamente comprovou-se alta prevalência de 5+10 em relação a 2+12, com percentuais de 73,33 e 26,67%, respectivamente.

O escore acumulado de cada cultivar apresentou prevalência entre 10 e 9, cada um com 40,0 e 33,33%, respectivamente, o que representa 73,33% do total das cultivares analisadas. Aparentemente o escore acumulado, com base na presença de alelos determinados pelo método SDS-PAGE está sendo alvo de seleção nos programas de melhoramento de cultivares de trigo brasileiras.

3.4.2. SE-HPLC

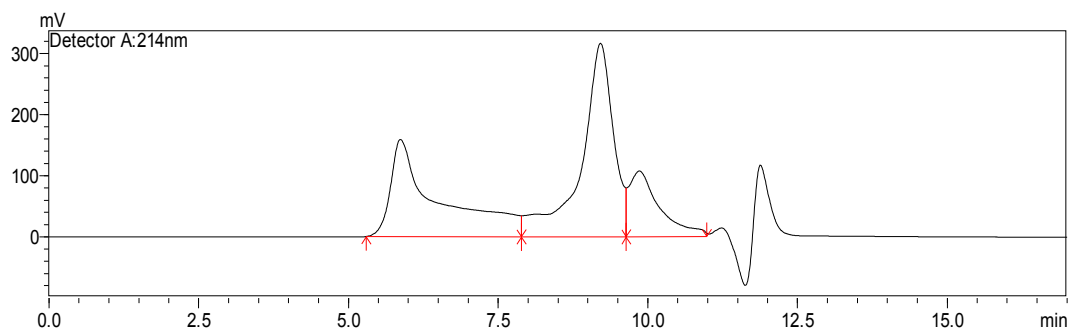
Os cromatogramas obtidos a partir das amostras de PPT, PPE e PPNE foram delimitados em três picos principais, conforme pode ser visto na Figura 2. Enquanto, os percentuais de proteínas poliméricas totais e não-extraíveis e a relação de gliadinas/gluteninas são apresentados nas Tabelas 13, 14 e 15, respectivamente.

Os valores médios de PPP encontrados para as cultivares estudadas foram de 37,41% ($\pm 4,78$). As cultivares do melhor grupo apresentou valores entre 41,20 e 46,96% e as do pior grupo entre 26,87 e 31,10%.

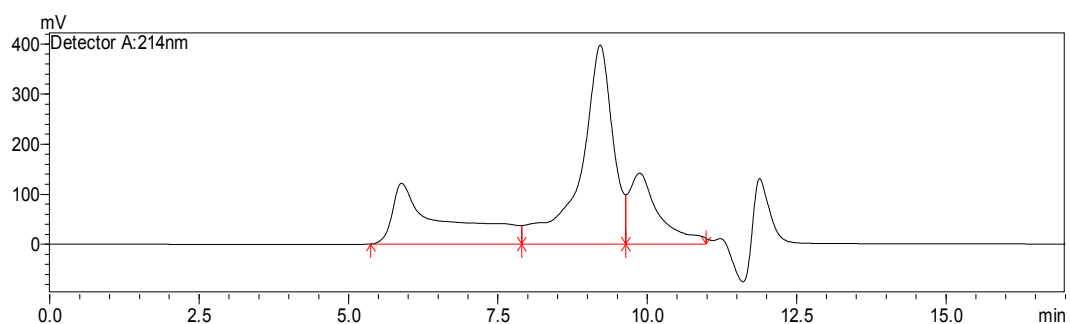
Para os valores de UPP, encontrou-se média de 45,54% ($\pm 9,54$). As cultivares foram estratificadas em apenas dois grupos: o maior no intervalo de 45,37 a 61,55% e o menor de 30,85 a 44,62%.

Os valores de UPP vêm sendo correlacionados à qualidade de panificação por alguns autores (Rubio *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2008b). Zhang e colaboradores (2008b), concluem em seu trabalho que a seleção a favor de genótipos com alto teor de UPP na farinha, juntamente com subunidades de glutenina de alta qualidade, podem levar ao aumento da força da massa e melhoria da qualidade de panificação das cultivares chinesas.

A



B



C

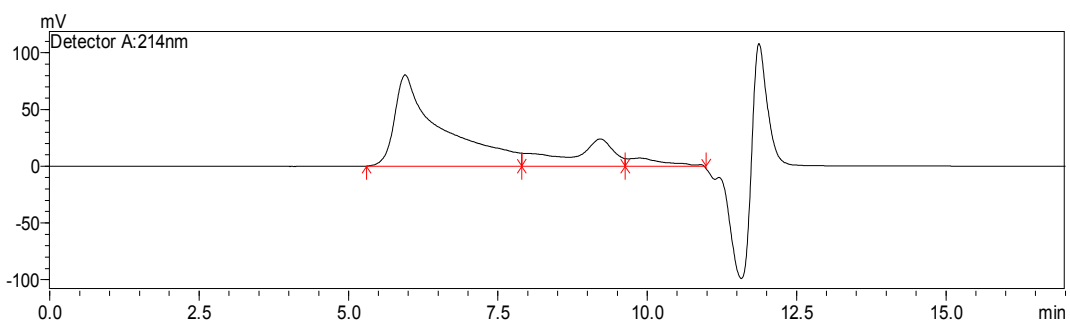


Figura 2 – Cromatogramas oriundos das amostras de a) proteínas poliméricas totais, b) extraíveis e c) não extraíveis, onde estão delimitados da esquerda para a direita os picos 1, 2 e 3.

Dentre os valores da relação de gliadinas para gluteninas, obteve-se média de 1,29 ($\pm 0,25$). No grupo com os maiores valores, obtiveram-se médias que variaram de 1,85 a 2,00 e naquele com os menores valores, a amplitude foi de 0,85 a 1,27.

Comparando os cultivares sem e com presença de translocação, verificaram-se valores de 39,34 e 33,01% para PPP, 48,14 e 40,36% para UPP e 1,17 e 1,54 para GLI/GLU, respectivamente. Pode inferir-se que, a presença de translocação pode ter afetado as proporções de PPP, UPP e a relação GLI/GLU.

Tabela 13 – Valores encontrados para o percentual de proteína polimérica total.

Cultivar/ Linhagem	PPP (%)
BRS Guamirim	46,96a
Safira	45,36a
IAC 24	45,09a
IPR 130	44,27a
CD 111	43,86a
IPR 87	42,92a
IAC 364	42,84a
BRS 254	42,62a
Abalone	42,42a
Anahuac	42,11a
BRS 208	41,88a
BRS 210	41,86a
IPR 136	41,36a
BRS 264	41,20a
Embrapa 42	40,54b
IPR 118	40,30b
Pioneiro	40,20b
CD 117	40,04b
Aliança	39,86b
BRS 249	39,16b
Marfim	39,13b
Fundacep Cristalino	38,40b
Iapar 78	38,38b
BRS 229	37,89b
VI 98053	37,14b
IPR 110	36,96b
IPR 85	36,80b
Embrapa 22	36,48c
IPR 128	35,62c
Quartzo	35,21c
CD 110	35,13c
IPR 129	34,82c
IPR 84	34,44c
CD 104	34,05c
BRS 220	33,54c
CD 108	33,01c
BRS Tangará	32,13c
BRS Pardela	31,11d
BRS 207	30,42d
CD 109	30,30d
IVI 01041	30,26d
CD 116	30,00d
BRS Louro	27,56d
BRS 248	26,99d
CD 114	26,87d

*As médias seguidas de uma mesma letra, foram estatisticamente agrupadas pelo teste Scott e Knott ao nível de 5% de probabilidade.

PPP: Percentual de proteínas poliméricas totais.

Tabela 14 – Valores encontrados para o percentual de proteína polimérica não-extraível.

Cultivar/ Linhagem	UPP (%)
Marfim	61,55a
IPR 85	59,35a
CD 104	58,19a
IPR 128	57,60a
BRS Pardela	55,27a
Quartzo	54,89a
IAC 364	54,76a
Safira	53,86a
BRS 264	53,17a
CD 111	53,12a
Embrapa 22	52,42a
CD 114	52,19a
CD 109	52,09a
CD 117	51,23a
IPR 136	49,72a
CD 116	49,71a
Fundacep Cristalino	49,18a
BRS Guamirim	49,13a
BRS 249	48,67a
BRS 254	47,42a
BRS Tangará	46,64a
IPR 130	45,85a
IPR 118	45,52a
BRS 229	45,37a
Abalone	44,62b
CD 108	44,60b
Pioneiro	43,80b
Iapar 78	42,97b
IPR 87	42,50b
CD 110	41,78b
Aliança	41,26b
IPR 84	40,45b
BRS 207	40,15b
IPR 110	39,52b
BRS 220	39,22b
BRS 208	39,22b
Embrapa 42	38,19b
VI 98053	38,13b
Anahuac	37,62b
BRS Louro	36,15b
IPR 129	36,07b
IAC 24	34,30b
BRS 248	32,18b
BRS 210	30,85b
IVI 01041	13,25c

*As médias seguidas de uma mesma letra, foram estatisticamente agrupadas pelo teste Scott e Knott ao nível de 5% de probabilidade.

UPP: Percentual de proteínas poliméricas não-extraíveis.

Tabela 15 – Valores encontrados para a relação entre gliadinas e gluteninas.

Cultivar/ Linhagem	GLI/GLU
BRS 248	2,00a
BRS Louro	1,94a
CD 114	1,85a
CD 109	1,73b
CD 116	1,68b
IVI 01041	1,63b
BRS 207	1,61b
BRS Pardela	1,53c
CD 104	1,48c
BRS 220	1,47c
IPR 129	1,47c
BRS Tangará	1,46c
CD 108	1,43c
IPR 110	1,39c
IPR 128	1,39c
IPR 84	1,36c
Quartzo	1,35c
Embrapa 22	1,35c
Iapar 78	1,33c
IPR 85	1,32c
VI 98053	1,31c
CD 110	1,27d
BRS 229	1,24d
CD 117	1,21d
Fundacep Cristalino	1,21d
Marfim	1,18d
IPR 118	1,18d
BRS 249	1,17d
Aliança	1,13d
Embrapa 42	1,13d
IPR 136	1,11d
Pioneiro	1,09d
IPR 87	1,09d
BRS 264	1,07d
Abalone	1,04d
BRS 208	1,04d
BRS 210	1,03d
BRS 254	1,02d
Anahuac	1,02d
IPR 130	1,00d
CD 111	0,98d
IAC 364	0,96d
IAC 24	0,91d
Safira	0,86d
BRS Guamirim	0,85d

*As médias seguidas de uma mesma letra, foram estatisticamente agrupadas pelo teste Scott e Knott ao nível de 5% de probabilidade.

GLI/GLU: relação entre gliadinas e gluteninas.

3.5. Testes de qualidade

3.5.1. Peso hectolitro, peso de mil grãos e número de queda

Os valores obtidos para o peso do hectolitro, peso de mil grãos e número de queda são descritos na Tabela 16.

Tabela 16 – Médias dos valores de peso hectolitro, peso de mil grãos, umidade e número de queda para as diferentes cultivares de trigo.

Cultivar	Peso Hectolitro (kg hL⁻¹)	Peso de mil grãos (g)	Umidade (%)	Número de queda (seg)
Iapar 78	78,15	40,32	11,99	427,5c
IPR 84	76,20	35,82	12,20	317,5e
IPR 85	76,80	47,80	13,12	299,5e
IPR 87	70,75	36,85	13,80	377,0d
IPR 110	77,70	42,47	13,52	307,5e
IPR 118	77,45	35,50	14,26	293,5e
IPR 128	81,25	40,02	12,90	369,5d
IPR 129	72,75	43,40	14,35	502,0a
IPR 136	77,45	35,60	12,56	457,5b
BRS 220	77,90	34,72	12,55	421,5c
BRS 229	78,35	31,22	12,41	372,0d
BRS 248	71,85	37,92	14,59	315,5e
BRS 249	78,15	34,82	12,31	357,5d
BRS Pardela	71,85	35,00	13,92	358,0d
BRS Tangará	77,45	39,47	12,12	492,0a
CD 104	78,60	38,40	13,42	446,5b
CD 110	76,35	31,00	12,45	363,0d
CD 114	69,60	33,92	14,61	290,5e
CD 117	77,45	33,87	12,36	355,5d
Abalone	80,15	33,82	11,66	364,0d
Marfim	73,85	36,85	14,39	383,5d
Quartzo	77,45	35,12	12,39	447,5b
Safira	78,15	30,60	12,14	446,5b
Embrapa 22	72,10	37,80	14,38	408,5c
Embrapa 42	74,30	41,70	14,42	463,5b
BRS 254	73,65	40,75	14,26	428,5c
BRS 264	77,45	43,10	14,50	325,5e
IAC 24	71,20	37,72	14,91	427,5c
IAC 364	73,85	45,62	14,19	453,5b
Anahuac	75,00	46,75	13,91	401,5c
Aliança	77,90	43,77	14,48	299,0e
BRS 207	66,70	37,47	14,19	397,0c
VI 98053	72,50	40,77	13,98	424,0c
IVI 01041	72,10	38,30	14,77	348,5d
Pioneiro	70,75	32,82	14,68	517,0a

*As médias seguidas da mesma letra foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott à 5% de probabilidade.

O número de queda está correlacionado a atividade de α -amilase, proteína importante no processo de fermentação, todavia sua alta atividade deprecia a qualidade da farinha para panificação. O valor médio para número de queda foi de 390,26, com os maiores resultados agrupados de 492 à 517,0 e os menores de 290,5 à 325,5. Segundo Perten (1964), citado por Gutkoski *et al.* (2007), valores ≤ 200 são considerados de alta atividade enzimática, de 201-350 de ótima atividade enzimática e ≥ 351 de baixa atividade enzimática. Altamente influenciada pelo ambiente, a característica foi utilizada com o intuito de verificar as condições ambientais envolvidas na multiplicação das sementes e estando os valores encontrados dentro dos limites recomendados, mostrou-se que não houve influência ambiental significativa, o que comprometeria a qualidade da farinha independentemente do seu genótipo.

Os dados de peso do hectolitro, peso de mil grãos, número de queda e rendimento de moagem não se correlacionaram ($p \leq 0,05$). Ressalta-se que a farinha utilizada nos experimentos foi obtida em moinho do tipo experimental. Nestas condições o rendimento de farinha na moagem não representa com fidelidade ao que ocorre em moinhos industriais.

3.5.2. Teste de panificação

As médias das notas dos avaliadores, foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott de acordo com os valores de características globais (Tabela 17), volume (Tabela 18) e volume específico (Tabela 19).

Os pães obtiveram notas médias para características externas (CE), internas (CI) e globais (CG), de 15,99, 25,35 e 41,34, num total de 20, 30 e 50, respectivamente.

A cultivar com as menores notas para os valores qualitativos (BRS 248) e maior volume específico, obteve os valores mais inadequados para as análises de SE-HPLC, com valores de 26,99%, 32,18% e 2,00 para PPP, UPP e GLI/GLU. Isso pode indicar que a proporção de 2:1 de gliadina para glutenina, propicia maior volume de pão, mas não garante boa formação da rede de glúten. Esse resultado confere com os encontrados por Rubio e colaboradores (2005), os quais não mostraram correlação significativa entre a presença de proteínas monoméricas e a força do glúten. Ressalta-se, no entanto, que apesar dessa aparente correlação entre esses fatores, ainda há necessidade de maiores comprovações da influência dessas características em relação à qualidade de panificação.

Tabela 17 – Médias das notas recebidas para o conjunto de características avaliadas pelos blocos de avaliadores no teste de panificação.

Culivar/Linhagem	Nota para características globais
Pioneiro	45,60a
Anahuac	44,66a
Iapar 78	44,40a
CD 117	44,07a
IPR 84	43,93a
BRS 207	43,53a
Safira	43,47a
Abalone	43,20a
VI 98053	43,00a
CD 104	42,73b
BRS 264	42,73b
IPR 128	42,67b
IPR 118	42,27b
BRS Tangará	42,20b
CD 110	42,17b
BRS 249	42,13b
IPR 136	41,93b
Quartzo	41,73b
IPR 129	41,00b
BRS 220	41,40b
BRS Pardela	41,40b
CD 114	41,40b
Embrapa 42	41,40b
BRS 229	41,27b
IAC 364	40,60b
Marfim	39,93c
IAC 24	39,73c
BRS 254	39,67c
IPR 110	39,27c
Embrapa 22	39,20c
IPR 87	38,60c
IVI 01041	38,47c
Aliança	37,20d
IPR 85	35,47e
BRS 248	34,67e

*As médias seguidas de uma mesma letra, foram agrupadas pelo teste Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados encontrados por Peña e colaboradores (2005) usando RP-HPLC, sugerem que as quantidades de diferentes frações das proteínas do glúten são mais importantes que os tipos de alelos que a variedade pode ter. Estes autores encontraram que a razão entre gliadina e glutenina teve correlação negativa com a força do glúten (W). O impacto em W pode ser explicado por uma correlação negativa com tenacidade/extensibilidade (P/L), já que a o aumento de gliadinas causa acréscimo no L.

Em outra situação, a razão de gliadinas:gluteninas parece ter diferentes influências sobre a qualidade de diferentes produtos finais. Uthayakumaran e Lukow (2005), utilizando cultivares com diferentes razões de glutenina:gliadina encontraram

Tabela 18 – Volume dos pães produzidos no teste de panificação.

Cultivar	Volume (cm ³)
BRS 248	30,50a
Marfim	30,00a
BRS Pardela	29,00a
Embrapa 22	28,17a
Embrapa 42	28,17a
CD 117	28,00a
Aliança	27,50a
IPR 87	27,00a
IPR 136	27,00a
BRS 229	26,83a
CD 104	26,83a
IPR 129	26,67a
CD 114	26,00a
BRS 254	25,67a
IAC 24	25,67a
BRS 207	25,50a
BRS 264	25,17a
IPR 84	25,00a
Anahuac	24,17b
CD 110	23,83b
Iapar 78	23,50b
BRS 220	23,33b
VI 98053	23,33b
Pioneiro	23,33b
Safira	23,17b
Abalone	22,83b
IVI 01041	22,50b
IPR 118	22,33b
IAC 364	22,00b
IPR 128	21,83b
BRS Tangará	21,67b
BRS 249	20,50b
Quartzo	20,17b
IPR 85	19,67b
IPR 110	19,00b

*As médias seguidas de uma mesma letra, foram agrupadas pelo teste Scott e Knott a 5% de probabilidade.

boa qualidade de panificação para GLU/GLI de 0,70, enquanto as tortilhas foram favorecidas pela razão de 0,85.

Aspectos correlacionados a variação entre as quantidades das frações de proteínas do glúten podem estar ligadas a regiões gênicas regulatórias. Alguns estudos como os de Wanous e colaboradores (2003), que pesquisaram braços candidatos à região gênica de regulação de HMW-GS, surgem como tentativas para descrever os sistemas regulatórios das proteínas do glúten.

Tabela 19 – Volume específico dos pães produzidos no teste de panificação.

Cultivar	Volume específico (cm ³ /g)
BRS 248	4,00a
Marfim	3,68a
BRS Pardela	3,59a
Aliança	3,59a
Embrapa 42	3,49a
CD 117	3,48a
Embrapa 22	3,47a
IPR 87	3,37a
BRS 229	3,36a
CD 104	3,34a
IPR 129	3,33a
IPR 136	3,31a
CD 114	3,29a
Pioneiro	3,24a
BRS 207	3,20a
BRS 254	3,14a
BRS 264	3,08a
IAC 24	3,05b
IPR 84	3,02b
Anahuac	2,98b
CD 110	2,94b
Iapar 78	2,88b
VI 98053	2,83b
IVI 01041	2,81b
BRS 220	2,79b
Safira	2,79b
Abalone	2,78b
IPR 118	2,64b
BRS Tangará	2,63b
IAC 364	2,62b
IPR 128	2,61b
BRS 249	2,46b
Quartzo	2,39b
IPR 85	2,37b
IPR 110	2,26b

*As médias seguidas de uma mesma letra, foram agrupadas pelo teste Scott e Knott a 5% de probabilidade.

3.6. Correlação entre os parâmetros analisados

Todos os parâmetros quantitativos analisados no trabalho foram analisados estatisticamente pelo coeficiente de correlação de Pearson e tiveram seus valores expressos na Tabela 20.

Ao analisar as características do teste de panificação, encontraram-se correlações entre C.I. e UPP e entre V.E. e a relação de gliadinas/gluteninas. Esses dados indicam a importância que o teste de SE-HPLC pode ter na avaliação da qualidade final de panificação, não só pela importância dos valores de UPP, mas também de uma relação equilibrada entre a porção de gliadinas e gluteninas. Cabe ressaltar que o maior volume

Tabela 20 – Matriz de correlação para os parâmetros de composição protéica e qualidade de panificação de cultivares e linhagens de trigo.

	PT	SDS		HPLC		Teste de panificação		
		ESC	ESC-A	PPP	UPP	GLI/GLU	CG	Vol
VE	0,3996*	0,0015	0,1168	-0,1491	-0,0534	0,2031	-0,1817	1
Vol	0,4558**	0,006	0,1404	-0,1008	0,0005	0,1561	-0,1763	1
CG	-0,1006	0,12	0,1067	0,2034	0,1462	-0,2823	1	
GLI/GLU	-0,0202	-0,2649	-0,6235**	-	-0,217	1		
UPP	-0,231	0,5291**	0,6193**	0,1817	1			
PPP	0,1368	0,2087	0,5709**	1				
ESC-A	-0,1837	-	1					
ESC	-0,1789	1						
P.T.	1							

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

“-“ Valores superestimados pelo uso dos mesmos valores para o cálculo de ambas as variáveis.

P.T.: proteína total; ESC: escore para Glu-1; ESC-A: escore para Glu-1 ajustado pela presença de translocação; PPP: percentual de proteína polimérica total; UPP: percentual de proteína polimérica não-extraível; GLI/GLU: relação entre gliadinas e gluteninas; C.G.: características globais dos pães; Vol: volume dos pães; e VE: volume específico dos pães.

de pão obtido neste trabalho, correlacionado com uma alta relação GLI/GLU, nem sempre está associado às características internas e externas desejáveis. Houve correlação positiva também entre V.E. e o teor de proteínas total, resultado que corrobora com o encontrado por Rubio e colaboradores (2005).

Os parâmetros analisados e relacionados com a qualidade de panificação não estão correlacionados entre si, indicando que as características internas, externas e volume podem depender de diferentes fatores para o seu desenvolvimento, que precisam ser incorporados em conjunto.

Analisando os dados de SDS-PAGE, relativos ao escore acumulado para Glu-1, obteve-se correlação de 0,5291 com UPP ($p \leq 0,01$). O que demonstra que estas características possuem interdependência. E quando o escore foi ajustado pela presença de translocação, a correlação ocorreu entre a característica e todas as variáveis analisadas por SE-HPLC.

4. CONCLUSÕES

- Nas cultivares brasileiras estudadas há prevalência dos genes 1 e 2* que codificam gluteninas de alta massa molecular (HMW-GS) do genoma A, do genes 5+10 para o genoma D e variabilidade no genoma B.

- Os marcadores moleculares são eficientes na identificação da presença de translocação de centeio e dos genes Glu-D1x5 (5+10) para emprego na seleção de genótipos.
- Genótipos com translocação com o centeio possuem menor qualidade de panificação em relação aos demais, o que reforça o uso dos marcadores genéticos na sua identificação.
- O valor de proteínas poliméricas não-extraíveis, não depende do volume de proteínas poliméricas totais.
- Maiores escores de SDS-PAGE estão correlacionados positivamente com o percentual de proteínas poliméricas não-extraíveis. E quando esse escore é ajustado pela presença de translocação, a correlação também ocorre com as demais variáveis analisadas pela análise de SE-HPLC.
- Não há correlação direta entre as características globais e o volume dos pães.
- Propõem-se como ferramentas para o auxílio na escolha de linhagens em programas de melhoramento voltados à qualidade industrial, o uso de SDS-PAGE como primeira fonte de seleção, devido a sua co-dominância e baixo custo e uma posterior utilização de SE-HPLC para verificação da expressão das proteínas formadoras do glúten.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC – AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods**. 9. Ed., Saint Paul: AACC, 1995.

AACC - AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved Methods**. 10th ed. St. Paul, Minnesota, 2000.

AOAC –ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis. 14 ed. Arlington, Virginia. 1984. 1141p.

AOAC –ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 16th ed. Washington: Wowirtz, W., 1995.

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

ANJUM, F.; KHAN, M.R.; DIN, A.; SAEED, M.; PASHA, I.; ARSHAD, A.U. Wheat gluten: high molecular weight glutenin subunits-structure, genetics, and relation to dough elasticity. **Journal of Food Science**, v.72, n.3, 2007.

BAGGE, M.; XIA, X.; LÜBBERSTEDT, T. Functional markers in wheat. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.211–216, 2007.

BLECHL, A.; LIN, J.; NGUYEN, S.; CHAN, R.; ANDERSON, O.D.; DUPONT, F.M. Transgenic wheats with elevated levels of Dx5 and/or Dy10 high-molecular-weight glutenin subunits yield doughs with increased mixing strength and tolerance. **Journal of Cereal Science**, v.45, p.172–183, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regras para Análise de Sementes. Brasília, 1992. 365p.

CHAI, J.F.; LIU, X.; JIA, J.Z. Homoeologous cloning of ω -secalin gene family in a wheat 1BL/1RS translocation. **Cell Research**, v.15, p.:658-664, 2005.

CHAI, J. F.; ZHOU, R.H.; JIA, J.Z.; LIU, X. Development and application of a new co-dominant PCR marker for detecting 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocations. **Plant Breeding**, v.125, p.302-304, 2006.

CHEN, F.; HE, Z.H.; CHEN, D.S.; ZHANG, C.L.; ZHANG, Y.; XIA, X.C. Influence of puroindoline alleles on milling performance and qualities of Chinese noodles, steamed bread and pan bread in spring wheats. **Journal of Cereal Science**, v.45, p.59-66, 2007.

CRUZ, C.D. **Programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística**. Versão Windows, 2007. <www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>.

DE FROIDMONT, D. Co-dominant marker for the 1BL/1RS wheat-rye translocation via multiplex PCR. **Journal Cereal Science**, v.27, p.229-232, 1998.

D'OVIDIO, R.; ANDERSON, O.D. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality. **Theoretical Applied Genetics**, v.88, p.759-763, 1994.

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

GIROUX, M. J., MORRIS, C.F. Structure and presence of the amyloplast membrane proteins, puroindolines, are associated with wheat grain hardness. **Plant Physiology**, v.114, p.46-55, 1997.

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, 2008.

GUPTA, R.B.; BATEY, I.L.; MACRITCHIE, F. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quality and size distribution of polymeric protein. **Journal of Cereal Science**, v.18, n.1, p.23-41, 1993.

GUPTA, P.K.; MIR, R.R.; MOHAN, A.; KUMAR, J. Review article: Wheat genomics: present status and future prospects. **International Journal of Plant Genomics**, p.1-36, 2008.

GUPTA, R.B.; SHEPHERD, K.W. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. I. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. **Theoretical Applied Genetics**, v.80, p.65-74, 1990.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEI, Z. S.; GALE, K.R.; HE, Z.H.; GIANIBELLI, C.; LARROQUE, O.; XIA, X.C.; BUTOW, B.J.; MA, W. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the Glu-B1 locus in hexaploid wheat. **Journal of Cereal Science**, v.43, p.94-101, 2006.

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.

LEW, E.J.L.; KUZMICKY, D.D.; KASARDA, D.D. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. **Cereal Chemistry**, v.69, p.508-515, 1992.

LIU, L.; HE, Z.; YAN, J.; ZHANG, Y.; XIA, X.; PEÑA, R.J. Allelic variation at the *Glu-1* and *Glu-3* loci, presence of the 1B.1R translocation, and their effects on mixographic properties in Chinese bread wheats. **Euphytica**, v.142, p.197-204, 2005.

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

LUO, C.; GRIFFEN, G.B.; BRANLARD, G.; MCNEIL, D.L. Comparison of low- and high molecular weight wheat glutenin allele effects on flour quality. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.1088-1098, 2001.

MARTIN, J.M.; FROHBERG, R.C.; MORRIS, C.F.; TALBERT, L.E.; GIROUX, M.J. Milling and bread baking traits associated with puroindoline sequence type in hard red spring wheat. **Crop Science**, v.41, p.228-234, 2001.

PAYNE, P.I.; LAWRENCE, G.J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-D1* which code for high molecular weight subunits in glutenin in hexaploid wheat. **Cereal Research Communication**, v.11, p.29-35, 1983.

PAYNE, P.I.; NIGHTENGALE, M.A.; KRATTIGER, A.F.; HOLT, L.M. The relationship between HMW glutenin subunit composition and breadmaking quality of

- British grown wheat varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.40, p.51-65, 1987.
- PEÑA, E.; BERNARDO, A.; SOLER, C.; JOUVE, N. Relationship between common wheat (*Triticum aestivum* L.) gluten proteins and dough rheological properties. **Euphytica**, v.143, p.169-177, 2005.
- PERTEN, H. Application of the falling number values. **Separata de Cereal Science Today**, v.12, n.12, 1967.
- 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.47, p.117-122, 2008.
- RAKSZEGI, M.; BEKES, F.; LANG, L.; TAMAS, L.; SHEWRY, P.R.; BEDO, Z. Technological quality of transgenic wheat expressing an increased amount of a HMWglutenin subunit. **Journal of Cereal Science**, v.42, p.15-23, 2005.
- REDAELLI, R.; POGNA, N.E.; NG, P.K.W. Effects of prolamins encoded by chromosomes 1B and 1D on the rheological properties of dough in near-isogenic lines of bread wheat. **Cereal Chemistry**, v.74, p.102-107, 1997.
- RUBIO, A.I.; MACHRITCHIE, F.; GANDIKOTA, S.; HOU, G. Relaciones de La composición protéica y mediciones reológicas em masa com La calidade panadera de harinas de trigo. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v.28, p.243-251, 2005.
- SANTOS, L. S. **Perfil protéico e qualidade de panificação em linhagens de trigo desenvolvidas para a região do cerrado brasileiro**. 2008, 65p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/BRASILFOODS (1998). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP. Versão 5.0. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em: 14.06.2010.
- UTHAYAKUMARAN, S.; LUKOW, O.M. Improving wheat for bread and tortilla production by manipulating glutenin-to-gliadin ratio. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.2111-2118, 2005.
- VAN CAMPENHOUT, S.; STAPPEN, J.V.; SAGI, L.; VOLCKAERT, G. Locus-specific primers for LMW glutenin genes on each of the group 1 chromosomes of hexaploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.313-319, 1995.
- WANOUS, M.K.; MUNKVOLD, J.D.; KRUSE, J.D.; BRACHMAN, E.E.; KLAWITER, M.A.; FUEHRER, K.J. Identification of chromosome arms influencing expression of the HMW glutenins in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.213-220, 2003.
- WENG, Y.; AZHAGUVEL, P.; DEVKOTA, R.N.; RUDD, J.C. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background. **Plant Breeding**, v.126, p.482-486, 2007.

ZANATTA, A.C.A.; SILVA, S.D.A.E; MILANI, W.; LUIZA, J.; ARENDT, P. Uso de marcadores protéicos na seleção de tigo (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) com qualidade tecnológica superior na Embrapa Trigo. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 6p. HTML (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 85). Disponível: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co85.htm.

ZHANG, W.; GIANIBELLI, M.C.; MA, W.; RAMPLING, L.; GALE, K.R. Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for α -gliadin alleles in *Triticum aestivum*. **Theoretical Applied Genetics**, v.107, p.130-138, 2003.

ZHANG, W.; GIANIBELLI, M.C.; RAMPLING, L.R.; GALE, K.R. Characterisation and marker development for low molecular weight glutenin genes from Glu-A3 alleles of bread wheat (*Triticum aestivum*. L). **Theoretical Applied Genetics**, v.108, p.1409-1419, 2004.

ZHANG, X.K.; LIU, L.; HE, Z.H.; SUN, D.J.; HE, X.Y.; XU, Z.H.; ZHANG, P.P.; CHEN F.; XIA, X.C. Development of two multiplex PCR assays targeting improvement of bread-making and noodle qualities in common wheat. **Plant Breeding**, v.127, p.109-115, 2008.

ZHANG, P.; HE, Z.; ZHANG, Y.; XIA, X.; CHEN, D.; ZHANG, Y. Association Between % SDS-Unextractable Polymeric Protein (%UPP) and End-Use Quality in Chinese Bread Wheat Cultivars. **Cereal Chemistry**, v.85, n.5: p.696-700, 2008.

APÊNDICE

Análise de Variância para os testes de caracterização da farinha de trigo

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
Umidade	Tratamentos	34	44,2056	1,3002	1,9008	0,011896
	Resíduo	70	47,8808	0,6840		
	Total	104	92,0865			
	Média Geral			11,0386		
	CV (%)			7,4923		
Cinzas	Tratamentos	34	5,6591	0,1664	26,7772	0,0
	Resíduo	70	0,4351	0,0062		
	Total	104	6,0942			
	Média Geral			0,7181		
	CV (%)			10,9788		
Proteína total	Tratamentos	34	58,4310	1,7185	10,9311	0,0
	Resíduo	35	5,5026	0,1572		
	Total	69	63,9336			
	Média Geral			10,3366		
	CV (%)			3,8359		

Análise de Variância para os parâmetros de SE-HPLC

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
PPP	Tratamentos	44	2435,8612	55,3605	9,8693	0,0
	Resíduo	45	252,4208	5,6093		
	Total	89	2688,2819			
	Média Geral			37,5009		
	CV (%)			6,3156		
UPP	Tratamentos	44	7165,6337	162,8553	7,0883	0,0
	Resíduo	45	1933,8889	22,9753		
	Total	89	8199,5226			
	Média Geral			45,4173		
	CV (%)			10,5538		
GLI/ GLU	Tratamentos	44	6,9044	0,1569	10,0878	0,0
	Resíduo	45	0,6999	0,0155		
	Total	89	7,6044			
	Média Geral			1,2869		
	CV (%)			9,6918		

*PPP = proteína polimérica total; proteína polimérica não-extraível; GLI/GLU = relação entre gliadinas e gluteninas.

Análise de Variância para as características dos pães

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
C.G.	Blocos	4	1918,0994	478,5248		
	Tratamentos	34	1031,0009	30,3235	12,8803	0,0000
	Resíduo	136	320,1787	2,3542		
	Total		3269,2787			
	Média Geral			41,3457		
	CV (%)			3,7110		

Vol.	Tratamentos	34	888,2144	26,1239	2,0539	0,0010
	Resíduo	70	890,3332	12,7190		
	Total	104	1778,5476			
	Média Geral			3,0538		
	CV (%)			15,2747		
V.E.	Tratamentos	34	17,7927	0,5233	2,4050	0,0010
	Resíduo	70	15,2314	0,2176		
	Total	104	33,0241			
	Média Geral			3,0538		
	CV (%)			15,2747		

*C.G. = características globais; Vol.= volume dos pães; e V.E. = volume específico dos pães.