

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA CLÁSSICA E
MOLECULAR DE TRIGOS BRASILEIROS**

ELISANDRA ANDREIA URIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, maio de 2013

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA CLÁSSICA E
MOLECULAR DE TRIGOS BRASILEIROS**

ELISANDRA ANDREIA URIO

**Orientadora: Dra. Sandra Patussi Brammer
Coorientador: Dr. Adelião Cargnin**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, maio de 2013



FAMV - Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária
PPGAgro - Agronomia



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Caracterização citogenética clássica e molecular de trigos brasileiros”

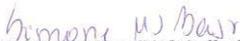
Elaborada por

Elisandra Andreia Urio

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Área de Produção Vegetal

Aprovada em: 03/05/2013
Pela Comissão Examinadora


Dra. Sandra Patussi Brammer
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia


Dra. Magali Ferrari Grando
FAMV/UPF


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dra. Cheila Cristina Sbalcheiro
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

CIP – Catalogação na Publicação

U76c Urio, Elisandra Andreia
 Caracterização citogenética clássica e molecular de trigos
 brasileiros / Elisandra Andreia Urio. – 2013.
 123 f. : il. color. ; 25 cm.

 Orientadora : Dra. Sandra Patussi Brammer.
 Coorientador: Dr. Adeliano Cargnin.
 Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de
 Passo Fundo, 2013.

 1. Trigo – Melhoramento genético. 2. Viabilidade polínica. 3.
 Cultura do trigo. I. Brammer, Sandra Patussi, orientadora. II.
 Cargnin, Adelino, coorientador. III. Título.

 CDU : 633.11

Catalogação: bibliotecária Fernanda Spíndola - CRB 10/2122

BIOGRAFIA DO AUTOR

Elisandra Andreia Urio, filha de Carlos Adílio Urio (*in memoriam*) e Edineide Urio, nasceu no município de Getúlio Vargas, estado do Rio Grande do Sul, aos 15 dias do mês de março de 1977.

Concluiu o curso de Ciências Biológicas - Licenciatura Plena pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim, no ano de 2002. Especialista em Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos, pela referida Universidade em junho de 2007.

Em 2011 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, na Universidade de Passo Fundo – RS, sob orientação da pesquisadora Dra. Sandra Patussi Brammer e coorientação do pesquisador Dr. Adeliano Cargnin.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado e abençoado sempre meu caminho.

À minha mãe, Edineide, por estar sempre ao meu lado, apoiando todas as minhas decisões, por perdoar e entender minha ausência. Ao meu pai Carlos (*in memoriam*), que certamente do lugar onde está, acompanha minhas conquistas e me envia forças para superar meus desafios.

À minha orientadora, Dra. Sandra Patussi Brammer, pela amizade, incentivo, pelas orientações e atenção que sempre dedicou.

Ao meu coorientador, Dr. Adeliano Cargnin, pela atenção, ajuda nas decisões tomadas, principalmente no desenvolvimento das análises estatísticas.

A Universidade de Passo Fundo - UPF, em especial à Faculdade de Agronomia, pela bolsa concedida.

À Direção e professores do Instituto de Desenvolvimento Educacional do Alto Uruguai – Faculdade IDEAU, por terem oportunizado e acompanhado esta importante fase de minha vida.

Às colaboradoras de minha pesquisa Dra. Ana Christina Brasileiro-Vidal e Dra. Paula Wiethölter, pelo conhecimento passado e pelo apoio recebido.

A Embrapa Trigo, pela oportunidade e apoio recebido para a realização do meu trabalho. Em especial às funcionárias das áreas de citogenética e genética molecular, Andrea Morás e Valdirene Volpato que muito colaboraram para a concretização deste trabalho.

Aos funcionários do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo, Rogério, Abramo e Uilian, por terem colaborado e auxiliado na semeadura e cuidados com as plantas.

À equipe de funcionários e alunos do Laboratório de Genética Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco pelo treinamento oferecido em Citogenética Molecular.

Aos colegas Gabrieli Scariot e Tiago Teixeira, pela amizade que construímos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 A domesticação do trigo.....	25
2.2 Importância econômica da cultura do trigo.....	28
2.3 A potencialidade dos recursos genéticos vegetais no melhoramento de plantas.....	33
2.4 Conservação de germoplasma e formação de coleções nucleares.....	36
2.5 A importância da citogenética na caracterização de genótipos.....	39
2.6 Instabilidades genéticas determinadas via citogenética	41
2.7 Hibridização <i>in situ</i> FISH e GISH como estratégia na caracterização de genomas distintos.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Material.....	50
3.1.1 Grupo 1 – cultivares modernas.....	50
3.1.2 Grupo 2 – cultivares antigas.....	52
3.2 Métodos.....	55
3.2.1 Semeadura das cultivares e obtenção do material biológico.....	55
3.2.2 Coleta e fixação das inflorescências para a análise de tétrades e viabilidade polínica.....	56
3.2.3 Preparação das lâminas para análise de tétrades.....	57
3.2.4 Preparação das lâminas para viabilidade polínica...	59
3.2.5 Semeadura, coleta e fixação das pontas das raízes para a FISH e GISH.....	60
3.2.6 Preparação das lâminas para FISH e GISH.....	62
3.2.7 Obtenção e marcação das sondas para FISH e GISH.....	64
3.2.8 Hibridização <i>in situ</i> FISH e GISH.....	67
3.2.9 Análises cromossômicas.....	68

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Análise das tétrades.....	69
4.2 Viabilidade polínica.....	79
4.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	90
4.3.1 FISH.....	91
4.3.2 GISH.....	105
5 CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS	112

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Cultivares de trigos brasileiros com lançamento posterior ao ano de 2000 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo e seus cruzamentos – Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.....	51
2	Cultivares de trigos brasileiros com lançamento anterior ao ano de 2000 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo e seus cruzamentos. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.....	53
3	Reagentes aplicados no gel de agarose a 1,5% para confirmação de (AAG) ₅ e (AAC) ₅ . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	65
4	Cultivares de trigos brasileiros com lançamento posterior ao ano de 2000 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo e seus cruzamentos. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.....	70
5	Índice meiótico e médias obtidas na análise de tétrades de cultivares de trigo analisadas pelo teste Scott e Knott a 5%. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	72
6	Viabilidade polínica de cultivares de trigo com lançamento posterior ao ano de 2000, analisados pelo teste Scott e Knott a 5%. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	80
7	Viabilidade polínica de cultivares de trigo com lançamento anterior ao ano de 2000, analisados pelo teste Scott e Knott a 5%. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....;	84
8	Resultados para a presença (+) ou ausência (-) de translocações entre trigo e centeio via Hibridização genômica <i>in situ</i> GISH. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Evolução do trigo hexaploide <i>Triticum aestivum</i> (adaptado de: < http://www.k.state.edu/wgrc/Extras/evolve.html >).	26
2	Cultivares de trigo semeadas em baldes com solo e mantidas em telado da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.	55
3	Cultivares de trigo com as espigas em estágio de quarteto (tétrades). (A) Visualização das espigas em telado. (B) Coleta das espigas em estágio de tétrade. (C) Fixação das espigas em Carnoy. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.	57
4	Cultivares de trigo mantidas em telado para obtenção de sementes. (A) Plantas protegidas com envelopes de papel para evitar polinização cruzada. (B) Detalhe de espiga protegida com envelope. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.	57
5	Preparo das lâminas de trigo para análise das tétrades. (A) Retirada das anteras da espiga. (B) Maceração e coloração com carmin acético 2%. (C) Inserção da lamínula e vedação da lâmina. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.	58
6	Preparação das sementes de trigo para semeadura em papel. (A) Processo de lavagem das sementes. (B) Sementes desinfestadas e semeadas em papel Germitest®. (C) Sementes mantidas em papel Germitest®. (D) Raízes com comprimento de 1 a 1,5 vezes o tamanho da semente. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.	61
7	Coleta, pré-tratamento a 4°C e fixação das raízes. (A) Coleta das raízes. (B) Pré-tratamento das raízes em água ultra-pura em gelo. (C) Fixação das raízes em Carnoy. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.	62

8	Preparação das lâminas para a FISH e GISH. (A) Retirada da coifa e do restante da raiz. (B) Acondicionamento em câmara úmida com solução enzimática de celulase 2% e pectinase 20% em tampão citrato 0,01 M. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	62
9	Preparo das lâminas para hibridização. (A) Dilaceração da raiz com agulha histológica. (B) Espalhamento do material com pinça de ponta rombuda. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	63
10	Etapa final de confecção das lâminas. (A) Aquecimento da lâmina em bico de Bunsen. (B) Congelamento da lâmina em nitrogênio líquido. (C) Retirada da lamínula. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	64
11	Gel de agarose a 1,5% mostrando a quantificação dos oligonucleotídeos (AAG) ₅ e (AAC) ₅ . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	66
12	Células de trigo em estágio de tétrade. (A) Tétrade normal. (B) Tétrade com micronúcleos (seta). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2011.....	70
13	Análise de tétrades em cultivares de trigo. (A) Tríade. (B) Tétrade normal. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.....	76
14	Grãos de pólen de trigo viáveis com tamanhos distintos. A seta indica um grão de pólen com menor tamanho. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	79
15	Comparação entre dois grãos de pólen de trigo.(A) Grão de pólen viável. (B) Grão de pólen inviável. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	84
16	Variabilidade das cultivares representadas pelo dendograma obtido pelo método de Tocher. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.....	90
17	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de <i>Triticum aestivum</i> , cultivar BRS 220. (A)	

- 18 Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAC)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 92
Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS 220. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAG)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 93
- 19 Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BR 24. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAC)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 94
- 20 Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BR 24. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAG)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 95
- 21 Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS 208. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAC)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 96
- 22 Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS 208. (A)

- 23 Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAG)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 97
Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS Timbaúva. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAC)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 98
- 24 Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS Timbaúva. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAG)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 99
- 25 Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar Chinese Spring. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAC)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 100
- 26 Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar Chinese Spring. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAG)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. 101
- 27 Hibridização genômica *in situ* (GISH) em célula de trigo ($2n = 6x = 42$), cultivar BRS 208, usando DNA de centeio como sonda

(verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos em A foram contra-corados com DAPI (azul), em B corados com FITC (verde) e em C imagem sobreposta de A e B. A seta indica a translocação 1BL.1RS. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013.....

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE TRIGOS BRASILEIROS

ELISANDRA ANDREIA URIO¹

Resumo - O presente estudo teve por finalidade caracterizar citogeneticamente e inferir sobre a estabilidade genética de cultivares de trigos brasileiros. O material biológico foi constituído de cultivares antigas e modernas, todas mantidas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo, consistindo de dois grupos distintos. No grupo 1 foram selecionadas 17 cultivares lançadas posteriormente ao ano de 2000, as quais foram avaliadas pela presença de micronúcleos em tétrades e pela viabilidade polínica. No grupo 2, foram selecionadas 70 cultivares, lançadas antes do ano de 2000, avaliadas quanto à viabilidade polínica. Para a análise de tétrades, as mesmas foram classificadas como normais (ausência de micronúcleos), tríades e presença de micronúcleos. Para verificar a viabilidade polínica, os grãos de pólen foram classificados como viáveis (bi e trinucleados e presença de amido) e inviáveis (vazios), pelo tamanho e presença de mais de um poro. Especificamente para o grupo 1, as cultivares BR 24, BRS Timbaúva, BRS 208 e BRS 220 foram selecionadas mediante a estimativa da maior variabilidade, determinadas pelo método de Tocher, visando à caracterização cromossômica via Hibridização *In Situ* (FISH e GISH). Para a FISH, foram utilizados como sondas os oligonucleotídeos sintéticos (AAC)₅ e (AAG)₅, presentes nos três genomas do trigo. Para a GISH, utilizou-se a sonda de DNA

¹ Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), da Universidade de Passo Fundo (UPF).

genômico de centeio para verificar a translocação 1BL.1RS. Os dados foram analisados pelo teste estatístico Scott e Knott 5%. Para o grupo 1, na análise das tétrades constatou-se diferença significativa para a presença de micronúcleos e quanto à viabilidade polínica, apenas para a variável diferença de tamanho. No grupo 2, foi verificado grãos de pólen inviáveis, viáveis e com diferença de tamanho. Para as análises de FISH, todas as cultivares apresentaram sítios de marcação distintos tanto para (AAC)₅ como para (AAG)₅. Entretanto, o oligonucleotídeo (AAC)₅ foi mais fortemente marcado em todos os materiais, demonstrando variabilidade entre as cultivares. Para a GISH, a cultivar BRS 208 apresentou a translocação 1BL.1RS. Portanto, os resultados gerados poderão servir de subsídios em projetos de melhoramento genético, principalmente na incorporação de características de interesse agrônomo presentes nas cultivares analisadas, bem como na obtenção de híbridos entre *T. aestivum* e diferentes espécies de Triticeae.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, viabilidade polínica, recursos genéticos, micronúcleos, FISH e GISH

CLASSICAL AND MOLECULAR CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN WHEAT

Abstract - The present study sought to characterize cytogenetically and infer the genetic stability of Brazilian wheat cultivars. The biological material consisted of old and modern cultivars, all kept in the Active Germplasm Bank of Embrapa Wheat, consisting of two distinct groups. In group 1, it was selected 17 cultivars launched after the year 2000, which were evaluated for the presence of micronuclei in tetrads, and the pollen viability. In group 2, it was selected 70 cultivars launched before the year 2000, which were evaluated for pollen viability. For tetrad analysis, they were classified as normal (absence of micronuclei), triads and micronuclei. To check pollen viability, pollen grains it was classified as viable (two and three nuclei and the presence of starch) and nonviable (empty), by the size and presence of more than one pore. Specifically for group 1, cultivars BR 24, Timbaúva BRS, BRS 208 and BRS 220 were selected by greater variability estimated, determined by Tocher method, aiming the chromosomal characterization through *In Situ* Hybridization (FISH and GISH). For FISH, probes were used as synthetic oligonucleotides (AAC) 5 and (AAG) 5, present in the three wheat genomes. For GISH, the genomic DNA of rye was used as probe to verify the translocation 1BL.1RS. Data were analyzed by Scott-Knott 5% test. For group 1, the analysis of tetrads found a significant difference in the presence of micronuclei and on the pollen viability, only on the variable size difference. In group 2, it was found

nonviable, viable and size difference pollen grains. For FISH analysis, all cultivars showed distinct marking sites for both (AAC) 5 and for (AAG) 5. However, the oligonucleotide (AAC) 5 was more strongly marked in all materials, demonstrating variability among cultivars. For GISH, BRS 208 was the only one that presented the translocation 1BL.1RS. Therefore, the results generated can serve as support in genetic improvement projects, particularly in the incorporation of desirable agronomic characteristics present in the cultivars analyzed, as well as to produce hybrids between *T.aestivum* and different Triticeae species.

Key words: *Triticum aestivum*, pollen viability, genetic resources, micronuclei, FISH and GISH

1 INTRODUÇÃO

O trigo por ser uma cultura bastante antiga, domesticado há cerca de dez mil anos, desde o surgimento da agricultura, contribuiu para que o homem deixasse de ser nômade e começasse a cultivar seu próprio alimento, próximo a suas moradias. A possibilidade de produção e armazenamento em grande escala, contribuíram para a evolução desta cultura e, deste modo, este cereal foi adotado em tal extensão, sendo atualmente um dos mais cultivados no mundo.

Na forma de grão ou de seus inúmeros derivados, obtidos pela sua industrialização, o trigo é adotado como alimento básico pela população ocidental e fornece a maioria dos nutrientes essenciais para a dieta humana.

O trigo faz parte do seleto grupo de *commodities* agrícolas que domina tanto a produção, quanto o comércio mundial de grãos (CUNHA et al., 2011). De acordo com dados do USDA - World Agriculture Supply and Demand Estimates (USDA, 2011), na safra 2010/2011, foram produzidos 648,21 milhões de toneladas desse cereal no mundo. No entanto, mesmo com uma produção elevada alguns fatores trazem preocupações quanto à disponibilidade deste cereal como alimento: o aumento crescente da população mundial e, como consequência, o alto consumo de alimentos, entre eles os derivados do trigo.

O Brasil faz parte dos países importadores e exportadores de trigo. De acordo com dados do MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012), a produção projetada de

trigo para 2021/2022 é de 6,9 milhões de toneladas, e um consumo de 11,7 milhões de toneladas no mesmo ano. O consumo interno de trigo no País deverá crescer em média 1,2% ao ano, entre 2011/12 e 2021/2022. O abastecimento interno exigirá importações de 6,2 milhões de toneladas em 2021/2022. Apesar da produção de trigo crescer nos próximos anos em ritmo de 1,9% ao ano, superior, portanto ao consumo, o Brasil deve se manter como um dos maiores importadores mundiais.

Atualmente, a produção concentra-se entre os estados do Sul, sendo o Rio Grande do Sul responsável por 47,4% da produção de trigo no País e o estado do Paraná com 43,2%, restando 9,4% para os demais estados, como Mato Grosso e Goiás (MAPA, 2012).

Produzir trigo no Brasil de forma competitiva e sustentável tem sido um dos principais desafios de nossa agricultura. Desta forma, o aumento de rendimento em áreas plantadas, a resistência a doenças e pragas, a adaptação de plantas a ambientes e a estabilidade genética, obtidas através de cultivares melhoradas, são estratégias para o aumento da disponibilidade de trigo como alimento, buscando atender as necessidades de consumo.

Estudos sobre os aspectos genéticos desta cultura se tornam importantes, pois o trigo hexaploide possui uma constituição genômica complexa, tendo em suas células os genomas de três espécies primitivas diferentes, resultantes de hibridizações naturais. A espécie *Triticum aestivum* L. ($2n = 6x = 42$, genomas AABBDD), cujo número básico de cromossomos (x) é sete, apresenta em sua constituição genética a combinação de três espécies diploides

distintas, mas relacionadas geneticamente (MORAES-FERNANDES, 1982).

Devido o trigo possuir esta complexidade genômica, ainda apresenta problemas de adaptação às condições agro-ecológicas sul-brasileiras, tendo em vista que se originou nas regiões de clima seco e temperado da Mesopotâmia e Europa (PIANA & CARVALHO, 2008). Neste sentido, estudos genéticos ainda mais detalhados e que proporcionem maior compreensão dos fatores envolvidos neste contexto são necessários, o que impulsiona a constante pesquisa com esta cultura, principalmente se for considerado o uso correto de recursos genéticos, ou seja, cultivares adaptadas.

Para isso, é necessário que estratégias de ação sejam bem estruturadas e organizadas e que exista a compreensão da importância do uso de recursos genéticos, que representam um patrimônio universal da humanidade. Neste sentido, uma das áreas mais impactantes é a biotecnologia, a qual envolve pesquisas desenvolvidas por equipes multidisciplinares entre melhoristas, fitopatologistas, fisiologistas, citogeneticistas, entre outros e que gera resultados que permitem que todas as informações obtidas possam ser disponibilizadas à comunidade científica.

Uma das estratégias que produz informações relevantes para a biotecnologia é o emprego da citogenética. A citogenética é uma ciência que engloba estudos relacionados ao cromossomo no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação, quanto a sua variação e evolução. A análise cromossômica é uma forma de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos

individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diferentes formas, possibilitando a clara observação do material genético (BRAMMER, et al., 2007).

Dentre as técnicas citológicas importantes e que podem ser utilizadas como seleção assistida ao programa de melhoramento genético, destaca-se o estudo do comportamento meiótico dos cromossomos, por meio da análise de tétrades com um ou mais micronúcleos e de grãos de pólen viáveis (bi e trinucleados e cheios de amido) e inviáveis (vazios). Estas, são consideradas técnicas clássicas e geram informações extremamente úteis quanto à viabilidade e inviabilidade genética de plantas.

Em relação à caracterização citogenética molecular, técnicas que envolvem a hibridização do DNA com sondas marcadas, como FISH e GISH, contribuem com informações relacionadas à variabilidade existente entre cultivares da mesma espécie.

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar citogeneticamente cultivares de trigo, mantidas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo, para disponibilizar informações à pesquisa científica e tecnológica, de forma apropriada e para a utilização posterior pelos programas de melhoramento genético desta cultura.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Verificar a presença ou ausência de micronúcleos em tétrades a fim de identificar irregularidades meióticas;

- Avaliar a viabilidade polínica de trigos visando identificar e inferir sobre a estabilidade genética/cromossômica;
- Caracterizar padrões cromossômicos de cultivares de *T. aestivum*, a partir de oligonucleotídeos específicos, por meio da Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH);
- Identificar a translocação 1BL.1RS (trigo-centeio), via Hibridização Genômica *In Situ* (GISH);
- Relacionar os resultados da estabilidade/instabilidade genética com os padrões cromossômicos estabelecidos para cada genótipo, permitindo a detecção de possíveis variantes;
- Disponibilizar aos multiusuários do projeto e à comunidade científica, os resultados obtidos, por meio do uso da base de dados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo.
- Disponibilizar as informações sobre irregularidades meióticas, viabilidade/inviabilidade e caracterização molecular via FISH e GISH para o Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A domesticação do trigo

O trigo pertence à tribo Triticeae da família Poaceae. A subtribo Triticinae é constituída pelos gêneros *Triticum*, *Aegilops*, *Agropyron*, *Secale* e *Haynaldia*, que apresentam origem relativamente recente e podem inter cruzar-se (BRAMMER, 2003). Híbridagens entre gêneros dentro dessa subtribo possibilitaram a troca de constituintes genéticos e levaram à formação de espécies poliploides, as quais se originaram de híbridagens naturais entre os gêneros *Triticum* e *Aegilops*, combinando genomas completos de duas ou três espécies diploides distintas (MORAES-FERNANDES, 1982).

A domesticação do trigo permitiu a origem da civilização, pois no momento em que se tornou possível conservar alimento, houve disponibilidade de tempo para dedicação a outras atividades e o homem passou do estágio de caça e coleta estabelecendo-se em povoados. A possibilidade de produção e armazenamento em grande quantidade, fez com que o trigo fosse adotado em tal extensão, que hoje é um dos principais cereais cultivados, além de contribuir também para o crescimento da indústria, pela necessidade de equipamentos e produtos agrícolas para as diversas etapas de produção (MORAES-FERNANDES, 1982).

O centro de origem e domesticação do trigo situa-se das montanhas de Zagros (Irã – Iraque) até as montanhas Taurin, na Turquia, e nas montanhas a sudoeste do Mar Mediterrâneo (Feldman apud FEDERIZZI et al., 2005). De acordo com Federizzi et al., (2005)

a economia de antigas cidades e civilizações, como Babilônia, Grécia, Creta, Egito e Roma, estavam baseadas na cultura do trigo. A área geográfica de distribuição e domesticação do trigo coincide com a da civilização do homem e início da agricultura.

O trigo para panificação, *T. aestivum* L. ($2n = 6x = 42$, AABBDD) é uma espécie que se originou a partir de dois eventos de hibridização envolvendo três progenitores diploides (Figura 1).

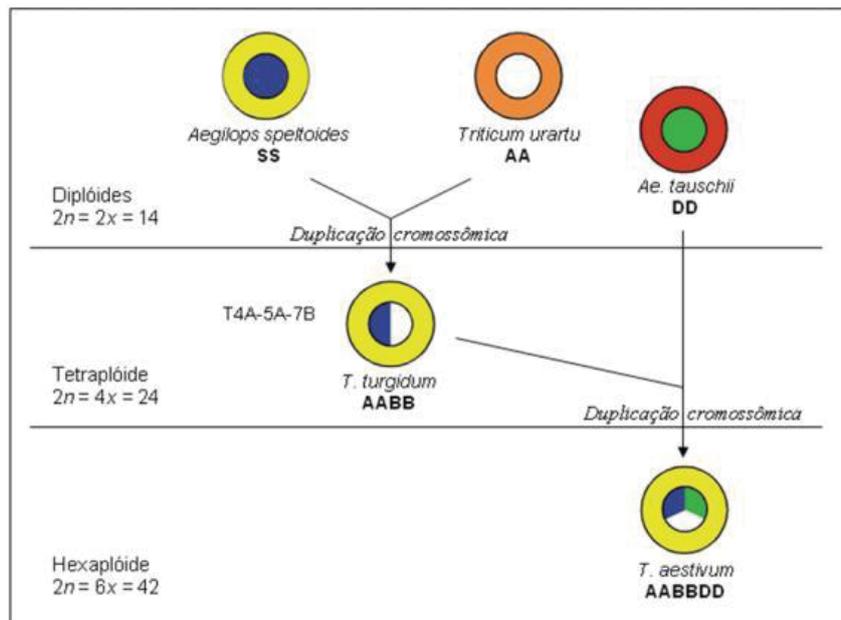


Figura 1- Evolução do trigo hexaploide *Triticum aestivum* (adaptado de <http://www.k.state.edu/wgrc/Extras/evolve.html>).

Uma primeira hibridização entre *T. urartu* ($2n = 2x = 14$, AA) e *Aegilops speltoides* ($2n = 2x = 14$, SS), com sucessivo processo de duplicação cromossômica, produziu o tetraploide *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$, AABB). O segundo evento de hibridização/duplicação

cromossômica para a formação do trigo envolveu uma forma cultivada de *T. turgidum* e a espécie silvestre *Ae. tauschii* (DD) (PETERSEN et al., 2006).

O genoma S de *Ae. speltoides* é o mais próximo do genoma B conhecido. Contudo, pelo fato desta espécie ser uma espécie alógama, nenhuma linhagem de *Ae. speltoides* moderna preservou o genótipo doador B em seu estado ancestral (KILIAN et al., 2007). O genoma D, presente nas espécies hexaploides, é originário da espécie diploide *T. tauschii* C. também denominado *Ae. squarrosa* L. ou *Ae. tauschii* (FEDERIZZI et al., 2005).

Esta complexidade dos genomas torna-se, algumas vezes, um problema para realização de mapeamento genético, desenvolvimento de marcadores moleculares, sequenciamento de genes funcionais e transferência de genes, o que justifica ainda mais pesquisas com esta cultura. Deste modo, o conhecimento dos padrões de herança e a localização dos caracteres nos cromossomos permitem ao melhoramento genético o avanço na incorporação de genes de importância econômica entre os genótipos promissores (BRAMMER, 2003).

Além disso, análises de cromossomos em meiose e em mitose de híbridos interespecíficos fornecem informações sobre a constituição do genoma, filogenia e evolução de espécies e desde então a biotecnologia vem desenvolvendo técnicas que contribuem para caracterização do genoma de diversas espécies de interesse agrônomo, entre elas o trigo (GILL & FRIEBE, 2002).

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), no Brasil o trigo começou a ser cultivado na Capitania Hereditária de São Vicente, que hoje corresponde ao Estado de São Paulo. Depois migrou para o sul, encontrando ambiente, clima e solo, mais adequados as suas exigências. Com o aparecimento das epidemias de ferrugem, o acontecimento de guerras regionais e a abertura dos nossos portos às nações amigas, o trigo quase desapareceu das terras brasileiras. Com a independência e a fase Imperial, chegaram os alemães, que mantiveram o trigo nas colônias germânicas do Rio Grande do Sul. Depois, foi à vez dos italianos, dando um novo impulso ao trigo no Brasil. Ao longo do tempo foram se sucedendo fases de entusiasmo, êxitos e fracassos.

Atualmente, o trigo cultivado conta com uma enorme variabilidade. De acordo com Marchioro & Franco (2010) existem 107 cultivares de trigo, registradas no MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo que 54 destas cultivares pertencem à espécie comercial trigo para panificação (*T. aestivum*), a qual tem grande importância econômica. Estas cultivares são responsáveis por mais de quatro quintos da produção mundial, por serem adequadas à panificação (ABITRIGO, 2011).

2.2 Importância econômica da cultura do trigo

O trigo é uma das principais fontes de alimento para o homem desde os tempos pré-históricos, tornando-se assim uma cultura amplamente difundida mundialmente, na forma de grão ou inúmeros derivados, obtidos pela sua industrialização, que vão desde a farinha

para fabricação de pães, massas e biscoitos, além de farelo, utilizados na alimentação animal como complemento vitamínico (BATISTI et al., 2010).

O grão de trigo contém a maioria dos nutrientes essenciais para a dieta humana. Seus constituintes apresentam-se como 60% a 80% de carboidratos, principalmente na forma de amido, de 8% a 15% proteínas, incluindo quantidades adequadas de todos os aminoácidos essenciais, de 1,5 % a 2,0% de gorduras e vitaminas E e do complexo B. Além do seu valor nutricional, tem baixo conteúdo de água nos grãos, o que facilita o transporte e o processamento (PIANA & CARVALHO, 2008).

Segundo Federizzi et al., (2005), o Brasil já foi o principal produtor de trigo da América Latina, tendo sido grande exportador deste cereal até a primeira década de 1800, mas por uma série de razões econômicas e técnicas, especialmente suscetibilidade à ferrugem-do-colmo, o País passou a ser um importador destes grãos.

Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2012) divulgam que, em meados do mês dezembro, com a colheita do trigo praticamente concluída no Rio Grande do Sul e totalmente encerrada nos demais estados produtores, observa-se uma estimativa de redução de 22,7% na produção, não só em face da área cultivada ser 12,5% menor nesta safra, como também devido à falta de estímulo do produtor diante das dificuldades de comercialização, de maneira geral, adicionada à incidência de pragas e intempéries climáticas, verificadas no momento do desenvolvimento da planta e durante a colheita, no caso específico do Rio Grande do Sul.

O Quadro 1 mostra a produção mundial de trigo entre os anos de 2008 e 2012

PRODUÇÃO MUNDIAL DE TRIGO										
Países	2008/09		2009/10		2010/11		2011/12		* 2012	
	MILHÕES (t)	%	MILHÕES (t)	%						
Argentina	11,000	1,61	12,000	1,75	17,200	17,20	15,500	2,23	11,500	1,77
Australia	21,420	3,14	21,834	3,18	27,410	27,41	29,923	4,30	21,000	3,22
Brazil	5,880	0,86	5,026	0,73	5,900	5,90	5,800	0,83	5,000	0,77
Canada	28,611	4,19	26,848	3,91	23,300	23,17	25,288	3,63	26,700	4,10
China	112,464	16,47	115,120	16,77	115,180	115,18	117,400	16,86	118,000	18,11
Egypt	7,977	1,17	8,523	1,24	7,200	7,20	8,400	1,21	8,500	1,30
EU-27	151,122	22,13	138,816	20,22	136,017	135,86	137,227	19,70	131,823	20,24
India	78,570	11,51	80,680	11,75	80,800	80,80	86,870	12,47	93,900	14,41
Iran	7,957	1,17	13,485	1,96	15,030	15,03	13,500	1,94	14,000	2,15
Kazakhstan	12,538	1,84	17,051	2,48	9,638	9,64	22,732	3,26	10,500	1,61
Pakistan	20,959	3,07	24,000	3,50	23,900	23,90	25,000	3,59	23,300	3,58
Russia	63,765	9,34	61,770	9,00	41,508	41,51	56,231	8,07	38,000	5,83
Turkey	16,800	2,46	18,450	2,69	17,000	17,00	18,800	2,70	15,500	2,38
Ukraine	25,885	3,79	20,866	3,04	16,844	16,84	22,124	3,18	15,500	2,38
Uzbekistan	6,000	0,88	6,200	0,90	6,500	6,50	6,300	0,90	6,700	1,03
Others	43,836	6,42	55,426	8,07	48,754	48,78	50,925	7,31	49,750	7,64
Subtotal	614,784	90,04	626,095	91,21	592,181	591,91	642,020	92,19	589,673	90,52
United States	68,016	9,91	60,366	8,79	60,062	60,06	54,413	7,81	61,755	9,48
World Total	682,800	100,00	686,461	100,00	652,243	651,97	696,433	100,00	651,428	93,54

Quadro 1- Produção mundial de trigo no mundo entre os anos de 2008 e 2012.
Fonte: Foreign Agricultural Service – United States Department of Agricultural (2012).

Observa-se que o Brasil neste período produziu em torno de cinco milhões de toneladas ao ano. Nos anos de 2010 e 2011 produziu mais (5,800 milhões de toneladas), comparando-se com os outros períodos. No entanto, no ano de 2012 apresentou a menor produção deste quadro comparativo, em relação a todos os outros anos, ficando com 5 milhões de toneladas. A União Europeia é o país que apresenta maior produção, comparado com todos os demais, mas também apresenta decréscimo na produção de ano para ano. A China e a Índia são países que também se destacam pela produção, além de

serem os únicos que mostram aumento de produção anual. Observando os demais países, nota-se que a maioria também apresenta declínios de produção. Em relação à produção mundial, também se percebe oscilações de produção e no ano de 2010 uma redução não só em relação a 2011, como aos demais anos.

O Quadro 2 exibe o consumo de trigo mundial, entre os anos de 2007 e 2012. Através destes dados observa-se que o Brasil consome anualmente em torno de 11 milhões de toneladas, ou seja, comparando-se com os dados do Quadro 1, a produção corresponde à metade do consumo, fato este que justifica a constante pesquisa com esta cultura no intuito de desenvolver cultivares melhoradas que apresentem características que venham a suprir este quadro de produção/consumo.

CONSUMO MUNDIAL DE TRIGO										
Países	2007/08		2008/09		2009/10		2010/11		* 2012	
	MILHÕES (t)	%								
Algeria	8,300	1,29	8,550	1,31	8,750	1,34	8,950	1,28	9,050	1,34
Brazil	10,700	1,66	11,000	1,68	10,800	1,65	11,200	1,60	11,000	1,63
Canada	7,977	1,24	6,927	1,06	7,822	1,19	9,729	1,39	8,350	1,24
China	105,500	16,40	107,000	16,37	110,500	16,88	122,500	17,54	122,000	18,07
Egypt	17,200	2,67	18,100	2,77	17,700	2,70	18,600	2,66	18,900	2,80
EU-27	127,000	19,74	125,000	19,12	122,250	18,67	127,500	18,26	123,500	18,29
India	70,924	11,03	78,150	11,95	81,760	12,49	81,406	11,66	85,400	12,65
Iran	15,800	2,46	16,800	2,57	16,200	2,47	15,500	2,22	15,200	2,25
Kazakhstan	7,500	1,17	7,600	1,16	6,200	0,95	7,400	1,06	7,000	1,04
Morocco	7,450	1,16	8,100	1,24	8,250	1,26	8,950	1,28	8,400	1,24
Pakistan	22,800	3,54	23,000	3,52	23,000	3,51	23,100	3,31	23,200	3,44
Russia	38,900	6,05	39,600	6,06	38,600	5,90	38,000	5,44	34,500	5,11
Turkey	16,900	2,63	17,100	2,62	17,300	2,64	18,100	2,59	17,500	2,59
Ukraine	11,900	1,85	12,300	1,88	11,600	1,77	14,950	2,14	11,800	1,75
Uzbekistan	7,100	1,10	7,500	1,15	7,700	1,18	8,000	1,15	7,700	1,14
Others	126,466	19,66	132,635	20,29	134,757	20,58	143,219	20,51	140,173	20,76
Subtotal	608,984	94,67	622,792	95,26	624,027	95,31	666,280	95,40	638,722	94,61
United States	34,293	5,33	30,978	4,74	30,710	4,69	32,155	4,60	36,414	5,39
World Total	643,277	100,00	653,770	100,00	654,737	100,00	698,435	100,00	675,136	100,00

Quadro 2 – Consumo mundial de trigo no mundo entre os anos de 2007 e 2012. Fonte: Foreign Agricultural Service – United States Department of Agricultural (2012).

Os países que se destacam no consumo são a União Européia, China e Índia. De forma geral, esta característica também mostra aumento considerável até o ano de 2010/2011, apresentando um declínio em 2012.

Mediante este cenário de produção/consumo, outro fato relevante é o aumento acelerado da população mundial, de forma desproporcional à produção de trigo, fazendo com que, para que este cereal continue sendo oferecido como alimento para as gerações futuras, técnicas que resultem em aumento de produção e controle de sanidade, precisem ser estudadas e adotadas. Uma forma de alcançar uma produção elevada é a interação da biologia da espécie com a tecnologia e fatores ecológicos, a fim de melhorar o rendimento e controlar o aparecimento de doenças (CURTIS, 2002).

Para atender a demanda de consumo com produção interna, a pesquisa e a biotecnologia são fatores bastante relevantes, uma vez que contribuem com informações para a agricultura. Desde a descoberta da estrutura da molécula de DNA, em 1953, por Watson e Crick, a aplicação da biotecnologia na medicina, na indústria e no agronegócio tem permitido a criação de soluções para vários problemas da humanidade, assim como a agregação de valor ou o desenvolvimento de novos produtos que atendam as necessidades da população mundial (NEPOMUCENO et al., 2007).

Neste sentido, instituições de pesquisa têm desenvolvido genótipos de trigo adaptados a diferentes regiões e que apresentem elevadas produtividades, fazendo com que espécies de interesse possam ser melhoradas (GUTKOSKI et al., 2007).

Skovmand et al., (2002) destacam que os recursos genéticos têm desempenhado um papel significativo no melhoramento de trigo. O crescente rendimento de grãos obtidos mostra a eficiência dos programas de melhoramento genético em desenvolver variedades com alto potencial. O uso adequado dos recursos genéticos fornece aos produtores a variabilidade que eles necessitam para melhoramento futuro, dedicando esforços no aumento do rendimento, por incorporação de novos genes ou combinações de genes visando resistência a doenças e pragas.

Deste modo, com a geração de novas variedades, o Brasil terá condições técnicas de produzir todo o trigo necessário para seu consumo interno, basta estabelecer uma política de estímulo continuada (MARINHO et al., 2007).

2.3 A potencialidade dos recursos genéticos vegetais no melhoramento de plantas

O Brasil é considerado o país detentor da maior biodiversidade genética vegetal do planeta. No entanto, a variabilidade reunida no passado não foi convenientemente conservada e em consequência, muitos genes não estão disponíveis para pesquisas atuais. Esta realidade começou a mudar quando alguns países, incluindo o Brasil, perceberam que esta variabilidade deveria ser resguardada para o futuro (BARBIERI, 2003).

A necessidade de manutenção ou melhoria da qualidade do ambiente de cultivo, as limitações à expansão das fronteiras agrícolas, associadas ao fato de que os agricultores começaram a

suprimir a diversificação do cultivo nas suas propriedades fazendo com que grande parte dos recursos vegetais fossem abandonados, com o risco de se extinguirem, tornaram imprescindíveis a coleta, caracterização e manutenção destes recursos genéticos, que poderão ser passíveis de utilização e melhoramento (GUERRA et al., 1998).

Conforme Bonow (2007), recursos genéticos são materiais genéticos portadores de genes que possuem valor real ou potencial, considerados a base para o desenvolvimento de variedades e cultivares, sempre tentando valorizar a diversidade genética presente. Skovmand et al., (2002) reforçam que estes recursos genéticos são pool gênicos disponíveis à pesquisa científica, incluindo uma ampla gama de diversidade genética, que é fundamental para melhorar e manter o potencial de rendimento, fornecendo novas formas de resistência e tolerância a estresses bióticos e abióticos.

Com o objetivo de conservar e utilizar essa variabilidade, um enorme esforço foi dedicado à coleta e conservação destes recursos. No Brasil, desde 1974 esta prática vem sendo desenvolvida, com a criação em Brasília-DF da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essa Unidade dispõe de infraestrutura para conservar um grande número de recursos genéticos a longo prazo (GOEDERT, 2007).

Além de manter a variabilidade de diversas espécies a conservação de recursos genéticos permite sua exploração, em programas de melhoramento genético. Para possibilitar um melhor acesso a estes recursos, foram criados os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) em unidades descentralizadas da Embrapa, que

conservam recursos em médio prazo, em menor número e fornecem estes acessos aos programas de melhoramento (IORCZESK et al., 2011).

Os autores anteriormente citados mencionam que características desejáveis podem ser encontradas em bancos de germoplasma, sendo úteis para os melhoristas, mas para isso é necessário a sua exploração. A falta de conhecimento destes genótipos conservados tem sido um dos maiores entraves no uso dos recursos genéticos. A dificuldade em se obter essas informações reside no fato da necessidade de uma equipe multidisciplinar para execução destas tarefas.

Uma alternativa para contornar a distância entre a conservação dos recursos genéticos nos bancos de germoplasma e o seu uso nos programas de melhoramento é a implantação de atividades de pré-melhoramento, que visa identificar características de interesse úteis aos programas de melhoramento (BONOW, 2011).

Segundo Skovmand et al., (2002), a chave para o trabalho com recursos genéticos é o desenvolvimento de um banco de dados, ou uma interconexão com sistemas de banco de dados, com capacidade de manejar e integrar todas informações, incluindo origem, dados de caracterização e evolução. Recursos genéticos devem ser estudados em várias etapas bem definidas, como coleta ou introdução, multiplicação, preservação e conservação, avaliação, caracterização e uso, sendo estas tarefas fundamentais a serem desempenhadas em um banco de germoplasma.

Para que a eficiência da utilização dos recursos genéticos em um banco de germoplasma seja alcançada, o domínio das informações sobre os acessos conservados é fundamental. Para isso, é necessário um adequado sistema de gerenciamento, que propicie a obtenção de informações estratégicas e permita a organização, armazenamento e análise de dados, além do acesso rápido e adequado às informações geradas (BONOW et al., 2008).

De acordo com Lopes & Mello (2006), o melhoramento genético vegetal, altamente dependente da variabilidade contida nos bancos de germoplasma, é uma das atividades mais relevantes da pesquisa científica e tem produzido resultados que contribuíram significativamente para os principais ganhos qualitativos e quantitativos alcançados pela agricultura brasileira nas últimas décadas.

2.4 Conservação de germoplasma e formação de coleções nucleares

As atividades de conservação de germoplasma podem ser divididas em duas grandes áreas que se complementam, a conservação *in situ* (no local de origem) e a conservação *ex situ* (fora do local de origem). A conservação *in situ*, se refere à ação de conservar espécies em suas comunidades naturais, como parques nacionais, reservas biológicas, reservas genéticas, estações ecológicas, etc. A coleção *ex situ* utiliza diferentes estruturas para manter a variabilidade genética: coleções de base, ativa e *in vitro*, coleções de trabalho e de campo *in vivo*, criopreservação e genômica (LOPES & MELLO, 2006).

Independente da forma de conservação, os recursos genéticos necessitam ser armazenados de maneira que permaneçam viáveis ao longo do tempo. O material que compõe a coleção deve ser monitorado continuamente, para que eventuais danos possam ser averiguados e o germoplasma deve ser periodicamente regenerado para garantir a viabilidade do material da coleção (BARBIERI, 2003).

De acordo com Borém (1998), dentre as coleções *ex situ*, duas têm importância relevante, a coleção-base preservada no longo prazo, e a coleção ativa, preservada no médio prazo. A coleção ativa deve possuir pequeno número de acessos, com características bem detalhadas. Esta coleção deve ser representativa da coleção-base e tem como função constituir-se na primeira fonte de variabilidade para os programas de melhoramento, de onde irão sair maioria dos acessos distribuídos pelo banco de germoplasma. A coleção-base, contendo o maior número possível de acessos, deve ser utilizada quando a coleção ativa não apresentar acessos com as características desejadas.

No Brasil, existem mais de 200 mil acessos de plantas conservados *ex situ*, em 160 bancos de germoplasma, implantados em mais de 50 locais, pois como a maioria das espécies das plantas superiores se propaga por sementes, esta é a forma mais comum de conservação. Destes acessos armazenados, atualmente cerca de 4% vem sendo utilizados no mundo. Isso se deve ao fato da dificuldade de caracterizar, avaliar e documentar grandes coleções, dificultando as tarefas de organização e manejo (VASCONCELOS et al., 2007).

Além disso, Bonow (2007) reforça que para atingir os objetivos de exploração dos recursos genéticos em um banco de

germoplasma que possui um grande número de acessos, são necessários altos investimentos, que nem sempre são disponíveis. Mediante esta realidade, a fim de representar a variabilidade de uma coleção de germoplasma com número reduzido de acessos, o estabelecimento de coleções nucleares (*core collections*) vem sendo proposto, com o objetivo de solucionar este problema.

Uma coleção nuclear possui um limitado grupo de acessos representando, com um mínimo de repetitividade, a máxima diversidade genética conservada de uma espécie e seus parentes silvestres. Representa com o máximo de fidelidade possível a riqueza alélica presente em determinada coleção, só podendo ser montada depois de o material estar bem caracterizado para não haver perda de alelos raros (BARBIERI, 2003; SHU et al., 2008).

Conforme Vasconcelos et al., (2007), grande importância tem sido dada, à obtenção de coleções nucleares, existindo, por exemplo, coleções para arroz, batata e cevada. Na China, a coleção nuclear de trigo tem sido baseada em análises bioquímicas e de marcadores de DNA (SHU et al., 2008).

BONOW (2007) destaca um trabalho visando à formação de uma coleção nuclear mundial de trigo, realizado pelo INRA (Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas da França), em 2007. Com a utilização de marcadores moleculares para a caracterização dos genótipos, os pesquisadores chegaram a uma coleção nuclear contendo 384 genótipos. Após serem formadas as coleções nucleares, esforços se concentram principalmente em relação à avaliação para

características agronômicas e moleculares, a fim de que as informações geradas possam contribuir para a pesquisa científica.

No Brasil, a Embrapa Trigo contém genótipos de 68 países, garantindo um bom potencial de diversidade conservada. No entanto, a exploração destes recursos envolve várias etapas, sendo o principal entrave do uso destes recursos a falta de conhecimento dos genótipos conservados, quanto a informações sobre a caracterização agronômica dos acessos. Para melhor explorar estes recursos mediante este cenário, o Banco de Germoplasma da Embrapa Trigo iniciou a formação da coleção nuclear de trigo, com o objetivo de avaliar e ampliar o pool gênico em uso no programa de melhoramento desta Unidade (IORCZESKI et al., 2011).

2.5 A importância da citogenética na caracterização de genótipos

Desde a época de Mendel, a Citologia e a Genética passaram a colocar seus conhecimentos numa área comum, mais tarde denominada citogenética. Esta área da ciência engloba todo e qualquer estudo relacionado com o cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação, quanto a sua variação e evolução (BRAMMER et al., 2007).

Conforme Gill & Friebe (2002), em 1930 iniciaram os estudos com trigo aneuploide que introduziu a era formal da análise citogenética e mapeamento de genes de cromossomos individuais em trigo. Em 1970, técnicas de coloração moderna foram usadas para

analisar subestruturas do cromossomo e o cariótipo citogenético do trigo foi desenvolvido.

O nível de desenvolvimento das técnicas citogenéticas adquiridas nos últimos 60 anos fez do trigo um grupo a parte dos outros cereais cultivados em termos de possibilidades para introdução genética de material proveniente de outras espécies (MORAES-FERNANDES et al., 2000). Dessa forma, foi possível identificar as alterações cromossômicas decorrentes das manipulações genéticas e com isso, a citogenética tornou-se uma ferramenta importante, auxiliando diretamente o melhoramento genético.

Tradicionalmente, os melhoristas têm utilizado descritores morfológicos como tamanho dos braços, posição do centrômero, número e localização das constrições secundárias dos cromossomos mitóticos, além do comportamento dos mesmos nas distintas fases da meiose. Mesmo que essa caracterização seja importante, a limitação deste tipo de descritor têm gerado a necessidade de busca por outras alternativas, tendo início em 1969 de uma nova era para estudos citogenéticos, com desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de hibridação *in situ*, que permitem identificar cromossomos, elucidando aspectos citotaxonômicos e permitindo a introgressão de genes de interesse (PEÑALOZA & POZZOBON, 2007).

Métodos não isotópicos de mapeamento de sequências de DNA *in situ* (hibridização) em cromossomos em lâminas de vidro foram usados para construir um cariótipo molecular de trigo. Com a implantação de técnicas de bandeamento, que permitem a visualização de blocos de coloração diferenciada (bandas), a caracterização

cromossômica foi melhorada significativamente (BRASILEIRO-VIDAL & GUERRA, 2002).

Estudos citogenéticos baseados em bandeamentos cromossômicos (bandeamento C e N) foram desenvolvidos para *T. aestivum* e funcionam como poderoso instrumento na análise citogenética e na manipulação deste genoma. A técnica do bandeamento C torna possível reconhecer as regiões de heterocromatina constitutiva e permite a identificação de cromossomos específicos. Desta forma, este procedimento pode ser empregado na detecção de alterações estruturais, como deleções, inversões e translocações (GILL et al., 1991).

Investigações cromossômicas com procedimentos que usam sinais fluorescentes permitem identificar sequências específicas, cromossomos, segmentos de cromossomos ou conjuntos inteiros de cromossomos para obter uma visão ampla do genoma de uma única vez. Tal perspectiva é valiosa para muitas aplicações incluindo a determinação de uma ampla distribuição do genoma, sequências repetitivas, visualização de rearranjos cromossômicos em células individuais e análises de comportamento cromossômico. Técnicas de citogenética tornam-se componentes necessários para estudos da organização cromossômica do genoma e sua associação com a cromatina (KATO et al., 2005).

2.6 Instabilidades genéticas determinadas via citogenética

Techio & Davide (2007) abordam que com avanço das pesquisas na área molecular, houve uma redução nos estudos

envolvendo análise genômica clássica. Tais autoras ressaltam que a utilização de dados de pareamento cromossômico apresenta algumas vantagens sobre outros procedimentos, pois permitem observar características dos cromossomos individuais e das configurações e estágios de condensação da cromatina, os quais fornecem informações sobre as propriedades dos cromossomos envolvidos. Além disso, a homologia/homeologia em relação à estrutura e ao conteúdo gênico observado nas diferentes configurações cromossômicas assumidas durante a meiose, fornecem a evidência direta de fluxo gênico entre as espécies parentais utilizadas em um cruzamento, demonstrando o grau de proximidade filogenética entre elas. Destacam, ainda, que a análise genômica utilizando dados do pareamento cromossômico é, portanto, ferramenta de suporte indispensável nas etapas de planejamento e seleção de genótipos, manipulação e monitoramento de um programa de melhoramento genético.

Em programas de melhoramento genético de plantas, a análise citogenética é usada para analisar a estabilidade genômica da espécie, a fertilidade, e principalmente, para monitorar a transferência gênica entre espécies, possibilitando auxiliar na seleção e maximizar tempo, recursos físicos e financeiros (BRAMBATTI, 2010).

Além disso, estudos citogenéticos fornecem comparações entre diferentes genótipos por meio de análises cromossômicas durante a divisão celular. Esta abordagem é extremamente válida, uma vez que programas de melhoramento necessitam de germoplasma adequado e também de informações sobre modo de reprodução, número de cromossomos e comportamento meiótico dentro de

espécies compatíveis para melhor orientar os cruzamentos (MENDES-BONATO et al., 2002).

Entretanto, o aumento nas frequências de plantas desviantes do padrão de cultivares conhecidas, causando falta de manutenção de uniformidade, traz certa preocupação para melhoristas e produtores. A uniformidade varietal supõe a manutenção da homozigose genética, desejada por inúmeras questões econômicas que vão desde a manutenção do potencial de produtividade e da tolerância ou da resistência às moléstias e estresses ambientais que caracterizam a cultivar, até os custos da execução dos trabalhos de multiplicação de produção de sementes, necessários a manutenção do padrão agrônômico (FERNANDES et al., 1991).

Alterações cromossômicas, numéricas ou estruturais, são comumente encontradas em Poaceae, afetando a estabilidade dos genótipos e repassando estas alterações às futuras gerações ou alterando o fenótipo da planta. Da mesma forma, a presença de anormalidades em grãos de pólen é um provável indicativo de irregularidade no processo meiótico ou de fatores bióticos e/ou abióticos que possam inferir baixa fertilidade masculina (BRAMBATTI, 2010).

A manutenção da uniformidade varietal, do ponto de vista do sistema de reprodução parte de dois acontecimentos fundamentais que caracterizam o chamado sistema genético da espécie: a meiose, divisão celular responsável pela formação do pólen e da oosfera e a fertilização, processo de fusão dos gametas masculino e feminino. Estes dois processos regulam o grau de variabilidade de cada espécie

vegetal. A meiose ocorrendo de forma correta resulta em gametas com exatamente metade da informação genética (n cromossomos) e a fertilização quando ocorre de forma correta resulta em um embrião da nova semente com a informação genética duplicada ($2n$ cromossomos) (FERNANDES et al., 1991).

A meiose é um processo genético altamente dinâmico controlado por uma rede genética complexa. Nas plantas sabe-se que genes mutantes podem afetar a meiose de várias maneiras e uma delas pode conduzir a formação de gametas $2n$ com composição genética variável, devido a diferentes tipos de irregularidades citológicas que podem acontecer nesta fase de desenvolvimento das plantas (REZAEI et al., 2010).

Love apud ZANOTTO et al., (2009) descreve uma análise citológica importante e que deve ser utilizada como seleção assistida ao programa de melhoramento genético que possibilita determinar se o comportamento meiótico dos cromossomos é normal, por meio da análise de grãos de pólen ou micrósporos, com um ou mais micronúcleos. Por esta técnica, centenas de grãos de pólen podem ser analisadas quanto à presença ou ausência de micronúcleos, fazendo com que o exame de polens jovens se torne um método rápido para determinar as anormalidades de comportamento cromossômico durante a meiose. Em uma fase mais tardia, a análise de grãos de pólen permite avaliar algumas características anatômicas e fisiológicas, fundamentais para o seu desenvolvimento, como número de núcleos e poros, tamanho do pólen e quantidade de amido.

Com relação à análise de micronúcleos esta é de grande valia, pois a partir deste tipo de estudo, pode-se inferir sobre a estabilidade dos genótipos, uma vez que micronúcleos se originam de fragmentos cromossômicos ou até mesmo cromossomos inteiros, que devido a eventos clastogênicos (que quebram cromossomos) ou aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) durante a anáfase, se perdem formando “massas de cromatina”. Estes podem também se originar a partir de interações entre agentes químicos, físicos e/ou biológicos com a possibilidade de promover distúrbios mitóticos. Além disso, os micronúcleos podem ser formados por cromossomos bivalentes não orientados, assim como por cromossomos com ascensão precoce ou retardatária que ocorrem nas metáfases e anáfases da primeira e/ou da segunda divisão da meiose (MENDES-BONATO, 2002). A principal consequência da ocorrência de micronúcleos é a perda de cromossomos e a formação de grãos de pólen geneticamente desbalanceados e/ou estéreis.

Em trigo, irregularidades meióticas têm sido frequentemente descritas, no entanto não existem muitas investigações sobre as causas destas irregularidades. Fatores ambientais são preocupantes, mas a maioria dos estudos é voltada aos efeitos de temperatura (BODANESE-ZANETTINI et al., 1983). No entanto, análises citológicas em triticales revelam várias irregularidades meióticas como não pareamento cromossômico, presença de micronúcleos, alta frequência de aneuploidias e esterilidade parcial (FALCÃO et al., 1981).

A análise polínica é uma ferramenta de grande importância na seleção de genótipos estáveis, e pode contribuir para o programa de melhoramento genético de plantas, utilizando os genótipos analisados como parentais em cruzamentos, ou gerando novas cultivares mais adequadas aos padrões vigentes na legislação brasileira de sementes (ROSA et al., 2006). Portanto, resultados obtidos por meio da análise citológica, poderão servir como fontes importantes de informações, para estabelecer os futuros cruzamentos dentro de programas de melhoramento genético.

2.7 Hibridização *in situ* FISH e GISH como estratégia na caracterização de genomas distintos

A técnica de hibridização *in situ* baseia-se no fato do DNA ser formado por duas fitas complementares, as quais podem ser facilmente desnaturadas e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla, devido ao restabelecimento das pontes de hidrogênio sob condições adequadas. O princípio da técnica reside na adição de uma sonda de DNA ou RNA marcada, logo após a desnaturação do DNA ou RNA, fazendo com que estas se liguem nas regiões complementares, permitindo sua localização tanto em cromossomos como em núcleos interfásicos (PEÑALOZA & POZZOBON, 2007; BRAMMER et al., 2009).

A FISH (hibridização fluorescente *in situ*) envolve a preparação de lâminas, o isolamento e a marcação da sequência de DNA que se deseja localizar *in situ* e a sua hibridização nos cromossomos. O DNA marcado funciona como uma sonda para

encontrar as sequências do DNA cromossomal complementar a ela, chamada de DNA alvo. Para visualizar as regiões hibridizadas com a sonda, é preciso associar um corante fluorescente (fluorocromo) à sonda e outro ao restante dos cromossomos (BRASILEIRO-VIDAL & GUERRA, 2002). Atualmente a técnica de FISH tem sido muito usada para a integração de mapas cromossômicos ou citogenéticos (PINTO-MAGLIO, 2007).

De acordo com Cuadrado et al., (2008), a detecção de sequências *in situ* tem gerado avanços importantes na citogenética molecular de plantas, proporcionando a construção de mapas cromossômicos e a investigação detalhada da estrutura cromossômica e com isso, revolucionando a citogenética, além de permitir estudos evolutivos e genéticos quanto à estabilidade cariotípica dos materiais.

A FISH é especialmente usada quando examinamos sequências de DNA repetitivo, como por exemplo, as localizadas nas regiões organizadoras do nucléolo (NOR), combinando sequências de genes altamente conservados, que codificam RNA ribossomal, com espaçadores intergênicos de tamanhos variáveis (PEÑALOZA & POZZOBON, 2007).

O genoma do trigo tem 17000 milhões de bases (Mb) e é composto por 80% de DNA repetitivo. Muitas destas sequências repetitivas são retrotransposons e sequências dispersas no genoma (Bennett & Smith apud CUADRADO et al., 2008). Microssatélites ou SSRs (simple sequence repeat), por exemplo, são sequências de DNA formadas pela disposição em série de nucleotídeos repetidos em arranjos formados entre dois e seis pares de bases (MORGANTE &

OLIVIERE, 1993) e devido a suas características também como marcadores cito-moleculares, se tornaram uma importante ferramenta para ligar variações gênicas e variações do fenótipo (MAIA et al., 2007).

Estes microssatélites servem com um valioso marcador de DNA em plantas porque é abundante e tem alto grau de polimorfismo. Atualmente a identificação destes marcadores citogenéticos tornou-se um procedimento rápido com o desenvolvimento de novos métodos (FUJITA et al., 2009).

Portanto, a técnica de FISH com o uso de sondas que permitam identificar regiões de DNA repetitivo, o que é o caso do genoma de muitas plantas, contribui para que estudos detalhados sejam possíveis, fornecendo informações mais precisas aos pesquisadores.

Já a técnica de GISH (hibridização genômica *in situ*) usa DNA genômico total de uma espécie como sonda marcada. A GISH têm aplicações na caracterização de genomas e cromossomos poliploides híbridos, plantas híbridas, aloploiploides parciais, poli-haplóides, assim como na identificação de translocações e inversões. Estas aplicações têm grande importância nos estudos evolutivos (PENÁLOZA & POZZOBON, 2007).

Do mesmo modo, análises citogenéticas juntamente com as de biologia molecular são ferramentas que auxiliam o melhoramento varietal, pois possibilitam a detecção e estudo das translocações, a partir do uso de técnicas como hibridização genômica *in situ* associada a marcadores moleculares. A detecção de

translocações é essencial na escolha de parentais estáveis em programas de melhoramento genético, possibilitando eliminar genótipos indesejáveis no início do processo de cruzamentos (CASSASOLA & BRAMMER, 2012).

O genoma do trigo hexaploide ($2n = 6x = 42$), é alopoliploide (AABBDD), cuja origem se deu pela combinação de distintas espécies (*T. monococum*, *Aegilops squarrosa* e, possivelmente *Aegilops speltoides*). Esta poliploidia confere características que possibilitam a incorporação de genes de espécies relacionadas (MORAES-FERNANDES et al., 2000).

O trigo hexaploide mantém um segmento do cromossomo 1R do centeio, translocado no braço longo do cromossomo 1B de trigo (1B/1R), sendo este fenômeno amplamente utilizado na agricultura. A transferência genética de natureza diferente em programas de melhoramento genético de trigo e cereais, tem sido associadas com a exploração da variabilidade genética de diferentes espécies relacionadas (hibridação intergenérica), bem como a hibridação interespecífica. Estes métodos permitem a hibridação/incorporação de variação genética nova para estresses bióticos/abióticos (ANGELOVA & GEORGIEV, 2006)

De acordo com Cassasola & Brammer (2011), as translocações podem ocorrer de maneira natural durante o cruzamento inter ou intraespecífico. Entre as espécies de trigo e centeio, as translocações mais comuns são primeiramente a 1BL.1RS, que envolvem o braço longo (L) do cromossomo 1 do genoma B de trigo com o braço curto (S) do cromossomo 1 do centeio (R).

Os estudos de translocações têm sido amplamente utilizados, pois são extremamente úteis quando se objetiva a introgressão gênica entre espécies relacionadas, impulsionando a busca por novos genes, potencialmente úteis ao melhoramento genético.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os materiais biológicos utilizados foram cultivares de trigo, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo, cujas sementes encontravam-se armazenadas sob temperatura de 3°C e umidade relativa do ar entre 32 e 35%. Estas cultivares foram divididas em dois grupos de estudo, de acordo com as datas de seu lançamento e de seu uso em diferentes análises e estratégias metodológicas.

3.1.1 Grupo 1 – cultivares modernas

No grupo 1 foram selecionadas 17 cultivares de trigo em que o lançamento foi posterior ao ano de 2000 (Tabela 1). Tais cultivares são recomendadas e utilizadas por grande parte dos produtores de trigo, por apresentarem bom desempenho agrônômico e serem portadoras de características genéticas de interesse para a agricultura. A proposta metodológica empregada para este grupo de estudo incluiu a análise de tétrades meióticas e o estudo da viabilidade polínica, propiciando a caracterização citogenética quanto à

estabilidade genética/cromossômica, e a determinação de padrões citomoleculares em algumas das cultivares deste grupo, por meio de FISH e de GISH.

Tabela 1- Cultivares de trigos brasileiros com lançamento posterior ao ano de 2000 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo e seus cruzamentos – Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.

Cultivares	Cruzamentos
BRS Angico	PF 87107/2*IAC 13
BRS 194	CEP 14/BR 23//CEP 19
BRS 220	Embrapa 16/TB 108
BRS Camboatá	PF 93232 SEL 14
BRS Guabijú	PF 86743/BR 23
BRS Guamirim	Embrapa 27/Buck Nandu//PF93159
BRS Louro	PF 869114/BR 23
BRS Timbaúva	BR 23/PF 86912
BRS Umbu	Century/BR 35
BRS208	CPAC89118/3/BR23//CEP19/PF85490
CNT 10	IAS-C46-Curitiba/IAS-C49-Pioneiro//IAS-C46-Curitiba/Tokai 66
Ônix	CEP-24/(Sibi) Rubi [2574] [2981]
Safira	PF-9090/OR-1//Granito [2981]
Trigo BR 24	IAS 58*2/EAGLE
Trigo BR 25	BH 1146*/Alondra Sib
Trigo BR 32	IAS60/Indus//IAS62/3/AlondraSib/4/IAS 59
Trigo BR 33	Buckbuck SIB/Bluejay SIB

Fonte: Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo

Para as análises de FISH e GISH foi usada a cultivar Chinese Spring como controle citogenético. Esta cultivar foi estudada por Cuadrato et al., (2008) para aumentar o número de marcadores físicos em cromossomos de trigo usando microssatélites, sendo que neste estudo, os autores utilizaram como sondas 14 oligonucleotídeos sintéticos. Através deste trabalho um cariótipo baseado em sondas microssatélites foi construído para a cultivar Chinese Spring.

Da mesma forma, a referida cultivar também foi estudada pelo Consórcio Internacional para a Sequenciação do Genoma do Trigo (“International Wheat Genome Sequencing Consortium” – IWGSC), com o objetivo de construir um mapa físico dos 21 cromossomos do trigo mole ‘Chinese Spring’, para desenvolver novos marcadores, aumentar o conhecimento sobre a organização do genoma do trigo e avaliar as tecnologias de sequenciamento (MORAIS, 2010). Sendo assim, é amplamente utilizada como padrão universal.

3.1.2 Grupo 2 – cultivares antigas

Para o grupo 2 foram escolhidas 70 cultivares, com lançamentos anteriores ao ano de 2000 (Tabela 2). Estas, atualmente não estão mais entre os trigos cultivados pelos produtores, pelo fato do surgimento de novas cultivares melhoradas e com maior potencialidade para as características agronômicas necessárias as exigências do mercado atual. No entanto, ainda são conservadas nos bancos de germoplasma por serem recursos genéticos importantes visando à prospecção de genes, que ao serem identificados, podem ser aproveitados através de programas de melhoramento genético.

Para este grupo, o estudo incluiu análises citogenéticas para verificar somente a viabilidade polínica, a fim de inferir sobre a estabilidade genética.

Tabela 2 – Cultivares de trigos brasileiros com lançamento anterior ao ano de 2000 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo e seus cruzamentos. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.

Cultivares	Cruzamentos
BH 1146	PG1//Fronteira/Mentana
Bagé	Correcaninos/Alondra SIB/3/IAS 54-20/Cotipora//CNT 8
BRS 177	PF 8389/PF 813//Embrapa 27 SIB
BRS 179	BR 35/PF 8596/3/PF 772003*2/PF 813//PF 83899
BRS 207	SERI 82/PF 813
BRS 49	BR 35/PF 83619//PF858/PF8550
Caçador 2	Desconhecido
Candeias	Cardenal//Sonora 64/Klein Redentor
Candiota	PF 11-1000-62/Super X
CD 105	PFAU “S”/2* Ocepar 14/ IAPAR 41
Centeira	Centenario/Fronteira
CEP 14- Tapes	PL 72380/Arthur 71
CEP 17-Itapuã	PEL 72380/Arthur 71//CEP 70336/3/Alondra Sib/PF 72707//PAT 19
CEP 24- Industrial	BR 3/CEP 7887//CEP 7775/CEP 11
Charrua	AS 3423/IAS 57
Cincana	Mentana/M5
CNT 4	Lerma Rojo 50/3/IAS 31//IAS 20-Iassul/Reliance
CNT 5	IAS-C46-Curitiba/BH 546
Colônias	Trintecinco/SL 242-30
Colonista	Seleção de uma cultivar primitiva (roxo) do Rio Grande do Sul- Brasil
Cotiporã	Veranopolis*2/Egypt Na.101
Don Filiciano	Trintani//Timsteun/Newthatch
Embrapa 10	CNT 8*3/Sonora 64
Embrapa 16	Hulha Negra/CNT 7//Amigo/CNT 7
Embrapa 22	Veery Sib/3/Klein Toledo Sib/PAT 19//Mochis/Jupateco
Embrapa 27	PF 83743/5/PF 83182/4/CNT 10*//Lagoa Vermelha*5/Agatha/3/
Embrapa 40	PF 7650/NS 18-78//CNT 8/PF 7577
Embrapa 42	LAP 689/s 7936
Florestana	Florestana/Mentana
Fronoso	Polyssu/Alfredo Chaves 6-21
Frontana	Fronteira/Mentana
Fundacep 30	BR 32/CEP 21//Ciano 79
IAC 24-Tucuruí	IAS 51/4/SON 64/Yaqui 50E/GB/2* Ciano
IAC 5 - Maringá	Frontana/Kenya 58/PG 1
IPR 84	Ana 75/PF7455/PF 2556/3/Pamir “S”/ALD/Kavko”S”
IPR 85	IAPR 30/BR 18
Jacuí	Colotana 824-51/Yaktana-54//Carazinho/3/Toropi
Jesuíta	Polyssu/Alfredo Chaves 3-21
Lagoa Vermelha	Veranopolis*2//Marroqui/Newthatch
MGS 1 Aliança	PF 858/Ocepar 11
Missões	Polyssu/Alfredo-Chaves-3-21
Montes Claros	Trigo local antigo (Minas Gerais)

Nobre	Colotana 824-51/Yaktana 54//Colotana 296-52
Nordeste	Alfredo Chaves 3-21/Novera//Pelon/XIIIAP
Novo Sulino	Desconhecido
Ocepar 12-Maitaca	PF 71124/PAT 72162
OR 1	Embrapa 27/Bagula'S'
Palotina	CHEG 285/Gaboto/3/Sonora 64//Tezanos Pintos
	Precoz/Nainari 60
PAT 7392	J 12326-67/IAS 55
Patriarca	Trintecinco/Minuano
Peladinho	Desconhecido
PG 1	Seleção em Polyssu
Pitana	Petiblanco/Floreana
Planalto	S44-27/Vilmorin 23//Roxo
RS 1 Fenix	PF 70100/J 15157-69
RS 8 Westphalen	CNT 10/Burgas 2//Jacuí
Santa Bárbara	Trintecinco/Kenya Farmer
Toropi	Frontana/quaderna-A//Petiblanco 8
Trigo BR 15	IAS 54*2/Tokai 80//PF 69193
Trigo BR 18	Alondra Sib=D6301/Nainari 60/Weique/Red
	Mace/3/Ciano*2/Cris
Trigo BR 22	PF 71130/CNT 10
Trigo BR 23	Correcaninos/Alondra SIB/3/IAS 54-20/Cotipora//CNT 8
Trigo BR 35	IAC 5-Maringa*2/3/CNT 7*3/Londrina//IAC 5-
	Maringa/Hadden
Trigo BR 40-Tuiúica	Anahuac 75/Huacamayo Sib
Trigo BR 41 Ofaié	BH 1146*6/Alondra Sib
Trigo BR 6	IAS 20/Toropi
Trigo BR 7	IAS 20-Iassul x Toropi
Tucano	Sonora 64/EL Gaucho
Vacaria	Veranópolis/Trapeano//Colotana 1838-51
Veranópolis	Trintecinco/Frontana

Fonte: Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo

Ressalta-se que por consistir de um grande número de cultivares, estas análises também foram realizadas pela equipe do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, servindo, deste modo, de subsídio para as discussões do presente trabalho.

3.2 Métodos

3.2.1 Semeadura das cultivares e obtenção do material biológico

Sementes das cultivares dos grupos 1 e 2 foram semeadas no ano de 2011, no mês de julho, em vasos de plástico com solo corrigido e cultivadas em telado da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, (Figura 2).



Figura 2 – Cultivares de trigo semeadas em baldes com solo e mantidas em telado da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011. Foto: URIO, E. A., 2011.

Foram mantidas cinco plantas por vaso e com duas repetições, totalizando dez plantas/cultivares. Cuidados fitossanitários

foram realizados para o pleno desenvolvimento das plantas, até o momento da obtenção e coleta das inflorescências e sementes. Esta etapa foi de fundamental importância, pois permitiu que todas as cultivares permanecessem em condições ambientais adequadas, evitando-se contato com fatores externos, tais como estresse hídrico, oscilações bruscas de temperatura e exposição a insetos e pragas, que pudessem interferir no desenvolvimento das plantas.

3.2.2 Coleta e fixação das inflorescências para a análise de tétrades e viabilidade polínica

Para avaliar as tétrades, a fim de identificar a presença de micronúcleos nas cultivares do grupo 1, foram coletadas cinco espigas por cultivar, no estágio anterior à antese, as quais foram fixadas em Carnoy 3:1 (álcool etílico absoluto:ácido acético glacial) por 24 h em temperatura ambiente e armazenadas em álcool 70% a temperatura de -20 °C, até o momento de uso (Figura 3). Para avaliar a viabilidade polínica, outras cinco espigas de cada cultivar dos grupos 1 e 2 foram coletadas no estágio de pólen maduro, as quais foram fixadas e armazenadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após estas coletas, as plantas pertencentes ao grupo 1 foram mantidas ainda no telado, visando à obtenção de sementes para uso nas análises de FISH e GISH. Para isso, duas espigas de cada genótipo foram protegidas com envelopes de papel para evitar a polinização cruzada, a fim de obtenção de sementes geneticamente puras, conforme Figura 4.



Figura 3 – Cultivares de trigo com as espigas em estágio de quarteto (tétrades). (A) Visualização das espigas em telado. (B) Coleta das espigas em estágio de tétrede. (C) Fixação das espigas em Carnoy. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011. Foto: URIO, E. A., 2011.

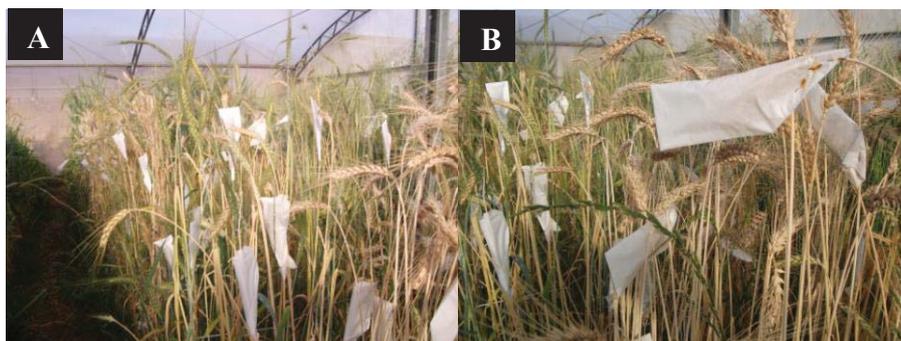


Figura 4 – Cultivares de trigo mantidas em telado para obtenção de sementes. (A) Plantas protegidas com envelopes de papel para evitar polinização cruzada. (B) Detalhe de espiga protegida com envelope. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011. Foto: URIO, E. A., 2011.

3.2.3 Preparação das lâminas para análise de tétrades

As análises citológicas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia, área de Citogenética e Genética Molecular da Embrapa Trigo. Para verificar a estabilidade ou anormalidades meióticas, as lâminas foram preparadas usando três anteras da mesma flor,

coletadas da região mediana da espiga, com cinco repetições (cinco espigas por cultivar). A técnica utilizada foi da maceração e coloração das anteras, com corante carmin acético 2% (Figura 5). O referido corante foi utilizado por ser bastante empregado em técnicas de rotina para estudos de análise de tétrades e viabilidade polínica. Após adição do corante, uma lamínula 22 x 22 mm era colocada sobre a lâmina, sendo aquecida rapidamente sobre bico de Bunsen por aproximadamente 3x e vedada com uma mistura de cera de abelha e breu (“LUTO”), aquecida no momento da montagem lâmina/lamínula. As variáveis analisadas foram: tétrades normais, tríades e presença de micronúcleos.

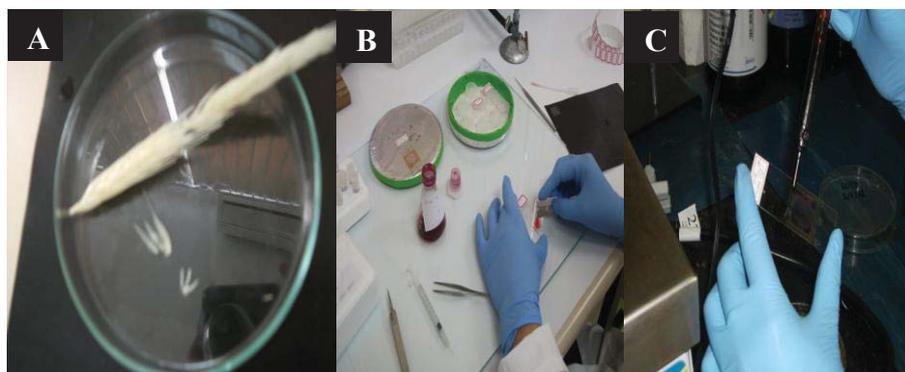


Figura 5 – Preparo das lâminas de trigo para análise das tétrades. (A) Retirada das anteras da espiga. (B) Maceração e coloração com carmin acético 2%. (C) Inserção da lamínula e vedação da lâmina. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011. Foto: URIO, E. A., 2011.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Analisaram-se 17 cultivares, sendo que cada uma representou um tratamento. De cada tratamento, foram feitas cinco repetições, onde cada repetição foi representada por uma espiga.

As espigas foram coletadas de plantas diferentes em cada parcela. Para cada espiga foi confeccionada uma lâmina, totalizando cinco lâminas/cultivar. Em cada lâmina, as primeiras 200 tétrades foram contadas e analisadas quanto à presença ou ausência de micronúcleos, em microscópio óptico com aumento de 400 x.

O índice meiótico (IM) foi calculado seguindo a fórmula proposta por LOVE apud Loguercio & Battistin (2004), onde $IM = \text{número de tétrades normais/número total de tétrades analisadas} \times 100$. As cultivares com IM superior a 90% foram consideradas meioticamente estáveis.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias foram analisadas pelo teste Scott e Knott 5%. Após a disponibilização dos dados estatísticos, foi realizada uma análise de diversidade entre as cultivares pelo método de Tocher, para estimar a variabilidade existente entre elas, através da construção de um dendrograma e verificar qual a proximidade e distância entre as mesmas, a fim de selecionar as cultivares usadas para a FISH e GISH.

3.2.4 Preparação das lâminas para viabilidade polínica

Para esta análise, as inflorescências dos grupos 1 e 2 foram coletadas no estágio de pólen maduro (fase anterior à antese) e fixadas em Carnoy. Neste caso, também se usou três anteras da mesma flor, coletadas da região mediana da espiga, com cinco repetições (cinco espigas por cultivar). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Para o grupo 1, analisaram-se 17 cultivares e para o grupo 2, 70 cultivares. Cada

cultivar representou um tratamento e de cada tratamento, foram feitas cinco repetições, onde cada repetição foi representada por uma espiga, seguindo-se os mesmos procedimentos experimentais do item 3.2.3.

A diferença nestas análises é que em cada lâmina, 100 grãos de pólen foram contados e analisados. As variáveis analisadas foram: 1) grãos de pólen bi/trinucleados e com presença de amido, considerados viáveis; 2) grãos de pólen vazios, inviáveis; 3) grãos de pólen com tamanhos diferentes e 4) grãos de pólen com mais de um poro. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias foram analisadas pelo teste Scott e Knott 5%.

3.2.5 Semeadura, coleta e fixação das pontas das raízes para a FISH e GISH

As cultivares BRS 220, BR 24, BRS Timbaúva e BRS 208 pertencentes ao grupo 1 e Chinese Spring (testemunha), foram selecionadas a partir da análise de estimativa de variabilidade obtida pelo método de Tocher. As sementes destas cultivares foram lavadas em água sanitária 4% por cinco min (Figura 6), seguidas de lavagens em água destilada por 3x de cinco min cada. Realizado este procedimento de desinfestação, as sementes foram semeadas em papel Germitest® e mantidas por 24 h a 25 °C em câmara de germinação. Após, foram transferidas para BOD, em temperatura de 4 °C por 48 h e posteriormente retornaram a temperatura de 25 °C por 24 h, visando à sincronização da divisão celular e obtenção de maior número de divisões celulares na fase de metáfase/mitótica. A coleta das raízes,

emitidas destas sementes, foi realizada quando apresentavam comprimento de 1 a 1,5 vezes o tamanho da semente (Figura 6).

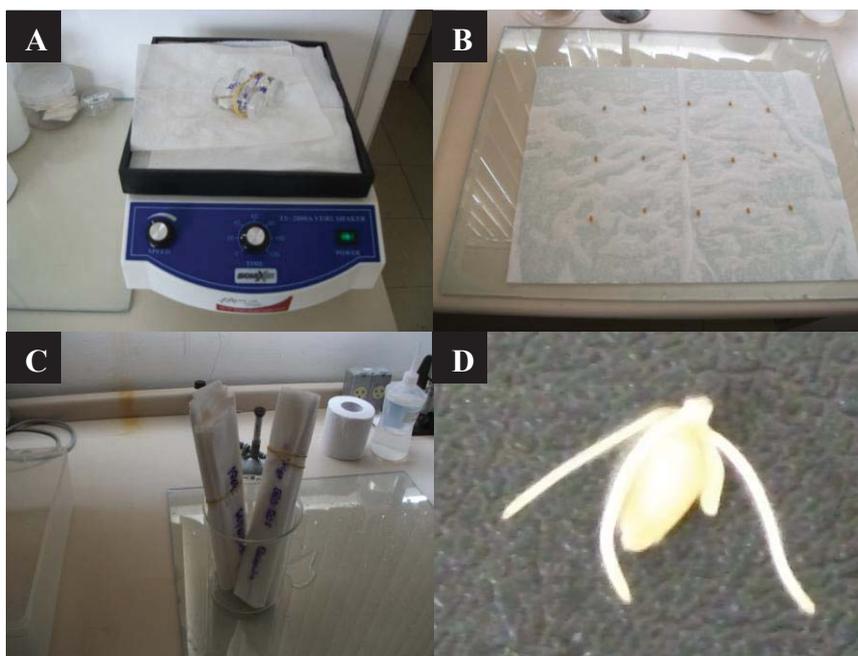


Figura 6 – Preparação das sementes de trigo para semeadura em papel. (A) Processo de lavagem das sementes. (B) Sementes desinfetadas e semeadas em papel Germitest®. (C) Sementes mantidas em papel Germitest®. (D) Raízes com comprimento de 1 a 1,5 vezes o tamanho da semente. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012. Fotos: URIO, E. A., 2012.

Em seguida, as raízes foram pré-tratadas e mantidas em água ultra pura (tipo Milli-Q), no gelo por 24 h a 4 °C. Após, o material foi fixado em Carnoy por um período de 24 h em temperatura ambiente e seguido de estocagem a -20 °C até a confecção das lâminas (Figura 7).

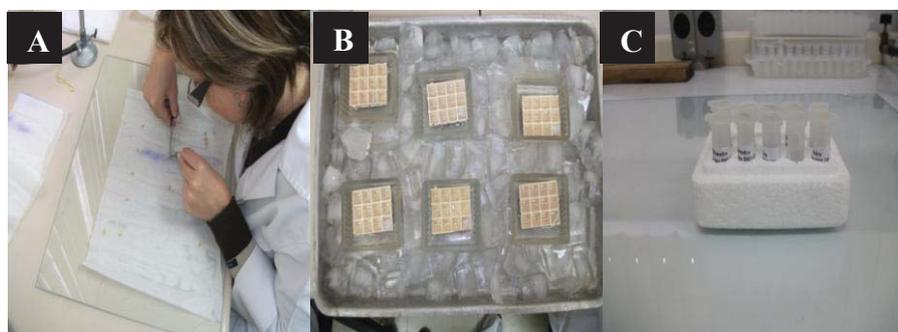


Figura 7 – Coleta, pré-tratamento a 4 °C e fixação das raízes. (A) Coleta das raízes. (B) Pré-tratamento das raízes em água ultra-pura em gelo. (C) Fixação das raízes em Carnoy. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012. Fotos: URIO, E. A., 2012.

3.2.6 Preparação das lâminas para FISH e GISH

Primeiramente, fez-se a lavagem das raízes em água destilada, seguida da retirada da coifa e o restante da raiz, deixando somente a região do meristema, sob uma lâmina de vidro. Estas foram acondicionadas em câmara úmida para o tratamento em solução enzimática de celulase 2% e pectinase 20% em tampão citrato 0,01M. Cada raiz recebeu 20 μ l de solução enzimática e permaneceu em estufa a 37 °C por 50 min (Figura 8).

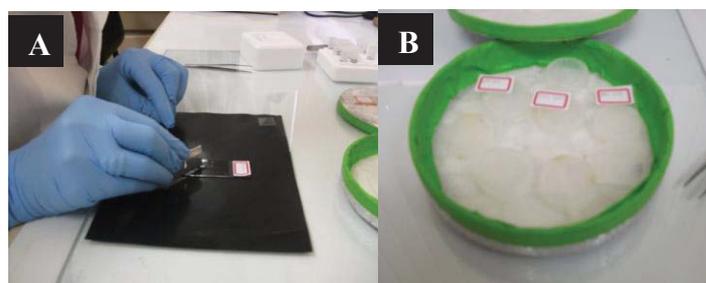


Figura8 – Preparação das lâminas para a FISH e GISH. (A) Retirada da coifa e do restante da raiz. (B) Acondicionamento em câmara úmida com solução enzimática de celulase 2% e pectinase 20% em tampão citrato 0,01 M. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012. Fotos: URIO, E. A., 2012.

Após, as raízes foram novamente lavadas com água destilada, retirado o excesso com auxílio de papel filtro e colocadas em solução de ácido acético 45% por 20 min à temperatura ambiente. O ácido acético também foi retirado com papel filtro, colocou-se uma gota de água destilada sobre cada raiz e transferiu-se para geladeira por 20 min. Após este período e retirado o excesso de água, foram colocados 16 μ l de ácido acético 45%. Com o auxílio de uma lupa, cada raiz foi dilacerada com agulha histológica, permitindo que as células ficassem totalmente individualizadas e com os núcleos expostos. Após, acrescentou-se uma lamínula sobre o material e com uma pinça de ponta rombuda, pequenas batidas foram dadas sobre a lamínula para espalhar as células contendo os cromossomos. Durante este procedimento as lâminas foram observadas em microscópio óptico visando verificar a distribuição e o espalhamento dos cromossomos (Figura 9).

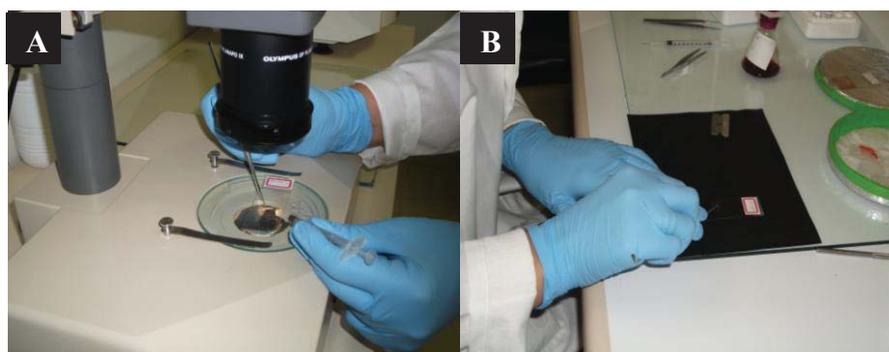


Figura 9 – Preparo das lâminas para hibridização. (A) Dilaceração da raiz com agulha histológica. (B) Espalhamento do material com pinça de ponta rombuda. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012. Fotos: URIO, E. A., 2012.

Em seguida as lâminas foram aquecidas em bico de Bunsen cerca de três vezes para a fixação do material. As lâminas com espalhamento dos cromossomos adequado e com citoplasma pouco denso foram congeladas em nitrogênio líquido para a retirada da lamínula e secas ao ar em temperatura ambiente, seguida de estocagem a -20°C (Figura 10).



Figura 10 – Etapa final de confecção das lâminas. (A) Aquecimento da lâmina em bico de Bunsen. (B) Congelamento da lâmina em nitrogênio líquido. (C) Retirada da lamínula. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012. Fotos: URIO, E. A., 2012.

3.2.7 Obtenção e marcação das sondas para FISH e GISH

Para as análises de FISH foram usados como sondas os oligonucleotídeos sintéticos $(\text{AAC})_5$ e $(\text{AAG})_5$, descritos por Cuadrado et al., (2008), a fim de verificar a sua localização física bem como determinar a variabilidade genética entre as cultivares em estudo. A escolha dos oligonucleotídeos foram baseados por possibilitarem a caracterização dos cromossomos dos genomas A e B e dos cromossomos 1D, 2D e 7D das cultivares de trigo em estudo. Os microssatélites foram marcados com digoxigenin-11-dUTP e com fluorocromo FITC usando a técnica de End Tailing (DIG

Oligonucleotide 3'-End Lab. Kit Roche), conforme instruções do fabricante.

Para quantificar estes oligonucleotídeos sintéticos, os mesmos foram diluídos à concentração de aproximadamente, 50 ng/ μ l. A partir destas diluições, foi preparado um gel de agarose a 1,5% de concentração onde foram aplicadas as amostras e migrado em uma cuba de eletroforese com voltagem de 125 W durante 50 min, onde se utilizou o marcador Ladder de 100 pb como controle, para quantificação (Tabela 3)

Tabela 3 – Reagentes aplicados no gel de agarose a 1,5% para confirmação de (AAG)₅ e (AAC)₅ Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.

	Marcador 50 ng/μl	Oligonucleotídeo AAG₍₅₎	Oligonucleotídeo AAC₍₅₎
	8 μ l	2 μ l	2 μ l
Stop solution	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Água	2 μ l	8 μ l	8 μ l
Total	12 μ l	12 μ l	12 μ l

Após, o gel foi fotografado em transluminador. A confirmação dos oligonucleotídeos e seu tamanho podem ser observados na Figura 11.

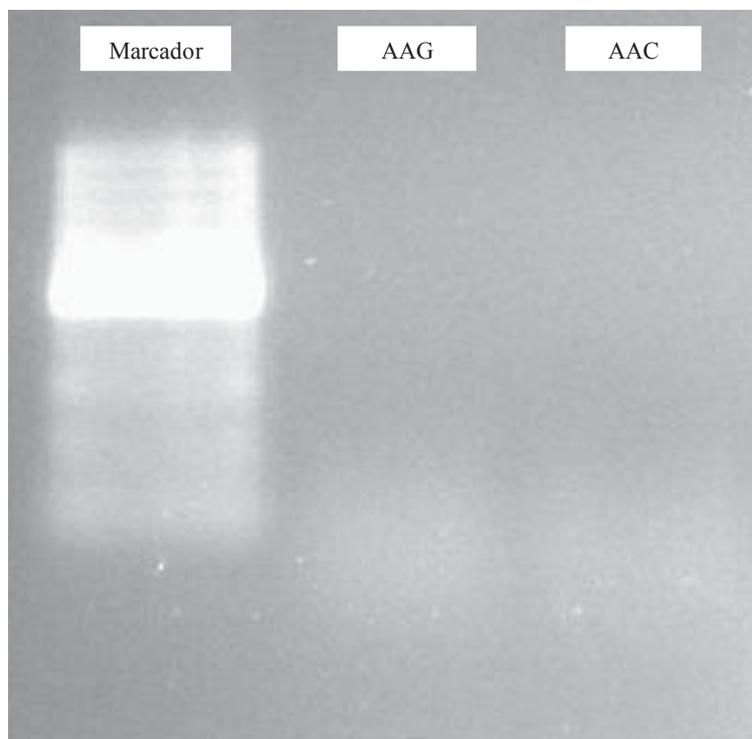


Figura 11 – Gel de agarose a 1,5% mostrando a quantificação dos oligonucleotídeos (AAG)₅ e (AAC)₅. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012. Foto: URIO, E. A., 2012.

No caso da sonda usada para análises de GISH utilizou-se o DNA genômico de centeio (*Secale cereale*), cultivar Centeio BR 1, além de DNA genômico do Trigo BR 35, servindo, neste caso, como bloqueio. Inicialmente, fez-se a extração de DNA genômico da sonda e do bloqueio, utilizando-se tecido foliar jovem, segundo método de CTAB, descrito em Bonatto (2008) e a purificação do material extraído, conforme Brammer et al., (2009). Os DNAs, tanto sonda como bloqueio, foram quantificados em gel de agarose 0,8%. A etapa seguinte consistiu na clivagem do DNA bloqueio em autoclave a 121

°C por 5 minutos, conforme Brammer et al., (2009), para fragmentá-lo em torno de 300 pb. Após, concentrou-se este DNA a 500 ng/uL, uma vez que é a concentração desejada para a etapa posterior.

A sonda de centeio foi marcada por Nick Translation (Roche), em termociclador a 15 °C por, aproximadamente, 1h e 30 min, de modo direto, utilizando o fluorocromo fluoresceína 12-dUTP (Roche). Após a marcação, a sonda foi estocada a -20 °C, para ser utilizada posteriormente na mistura de hibridização na proporção de 1:10, em relação ao DNA bloqueador de trigo.

3.2.8 Hibridização *in situ* FISH e GISH

A desnaturação dos cromossomos e das sondas, os banhos pós-hibridização e a detecção foram efetuados de acordo com Heslop-Harrison et al., (1991), exceto pela lavagem de estringência que foi realizado banho em 0,1x SSC a 42 °C. Para a desnaturação da sonda, usou-se a mistura de hibridização que consistiu de: formamida 50% (v/v), dextran sulfato 10% (p/v), 20x SSC, 1 ng/μL de sonda (oligonucleotídeo), a qual foi incubada em banho-maria em temperatura de 73 °C para abertura das fitas de DNA, durante 10 min, seguido da manutenção em gelo para manter as fitas abertas. Após foi aplicado em cada lâmina 5 μL, colocado uma lamínula 22x22, vedado com cola de borracha e mantido em câmara úmida em temperatura de 37 °C por aproximadamente 18 h. Após este período foi realizada a retirada da lamínula e seguiu-se com lavagens de soluções 2x SSC, 0,1x SSC e 4x SSC + 0,1% de acordo com Brammer et al., (2009). Em seguida o material foi montado em Vectashield (Vector).

Para a sonda de centeio, a mistura consistiu dos mesmos componentes anteriormente citados e mesmo procedimento, porém utilizou-se 0,5 ng/ μ L de sonda de centeio e mais 0,5 ng/ μ L de DNA bloqueio, ao invés do oligonucleotídeo.

Para as análises de GISH, visando à detecção da translocação 1BL.1RS, foram reibridizadas as mesmas lâminas usadas para a FISH. Para isso, as lâminas foram imersas em solução de 4x SSC + 0,1% Tween para a retirada da lamínula e passaram por três lavagens de 30 min cada com a mesma solução. Após as lavagens, as lâminas foram fixadas em Carnoy por 30 min, lavadas novamente em álcool 70° e álcool absoluto por 5 min cada e, por último ficaram mantidas em temperatura ambiente por 1 hora para secagem. A mistura de reibridização foi então aplicada. As lâminas foram vedadas com cola de borracha e colocadas em câmara úmida onde permaneceram na estufa a 37 °C por aproximadamente 18 h. Após este período foi realizada a retirada da lamínula, seguindo-se com lavagens e montagem das lâminas do mesmo modo que para FISH.

3.2.9 Análises cromossômicas

Para as análises das tétrades e viabilidade polínica, as lâminas foram observadas em microscópio óptico. A captura das melhores imagens foi realizada pelo programa Honestech TVR 2.5 utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX5, com aumento de 400x.

No caso de FISH e GISH, as lâminas foram analisadas com microscópio de epifluorescência modelo AxioScop 40 Zeiss,

mediante uma câmera AxioCam MRm Zeiss e programa AxioVision Release 4.6.3. O aumento utilizado para estes casos foi de 400x e 1000x.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise das tétrades

A proposta inicial do trabalho foi de analisar 17 cultivares de trigo no grupo 1. No entanto, encontrou-se certa dificuldade em coletar as espigas no estágio de tétrades. As cultivares estudadas, lançadas após o ano de 2000 diferem bastante entre si quanto a características agronômicas, principalmente com relação ao ciclo de emergência ao espigamento. Mediante este fato, para não haver discrepância entre os resultados, selecionou-se para o teste estatístico somente as cultivares onde foi possível realizar a coleta de espigas com tétrades, pois algumas já se encontravam no estágio de pólen maduro.

Desta forma, as cultivares BRS Angico, BRS Guabijú, BRS Guamirim, BRS Umbú e CNT 10 foram retiradas desta análise. Sendo assim, no grupo 1, para as análises de tétrades somente 12 cultivares foram avaliadas. A Tabela 4 apresenta as 12 cultivares que permaneceram nesta análise

Tabela 4 – Cultivares de trigos brasileiros com lançamento posterior ao ano de 2000 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo e seus cruzamentos. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011.

Cultivar	Cruzamentos
BRS 194	CEP 14/BR 23//CEP 19
BRS 220	Embrapa 16/TB 108
BRS Camboatá	PF 93232 SEL 14
BRS Louro	PF 869114/BR 23
BRS Timbaúva	BR 23/PF 86912
BRS 208	CPAC89118/3/BR23//CEP19/PF85490
Ônix	CEP-24/(Sibi) Rubi [2574] [2981]
Safira	PF-9090/OR-1//Granito [2981]
Trigo BR 24	IAS 58*2/EAGLE
Trigo BR 25	BH 1146*/Alondra Sib
Trigo BR 32	IAS60/Indus//IAS62/3/AlondraSib/4/IAS 59
Trigo BR 33	Buckbuck SIB/Bluejay SIB

Fonte: Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo

As avaliações foram realizadas quanto à presença de tétrades normais, tríades e tétrades com micronúcleos. Em relação à análise de variância, os resultados evidenciaram que há diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para a variável tétrade com micronúcleos (Figura 12)

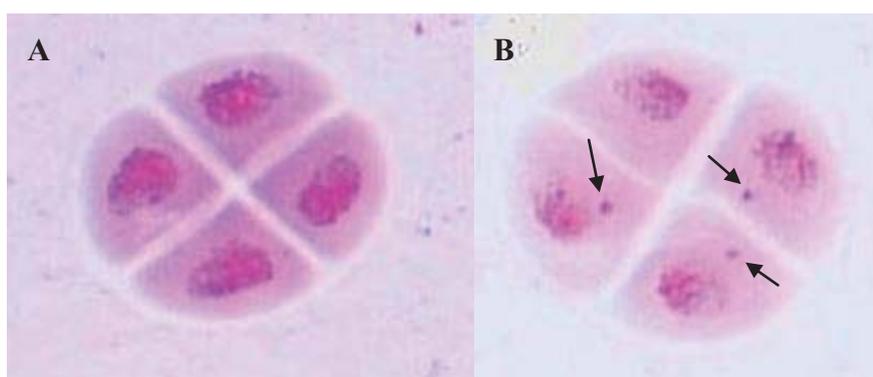


Figura 12 – Células de trigo em estágio de tétrade. (A) Tétrade normal. (B) Tétrade com micronúcleos (seta). Aumento: 400 x. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011. Fotos: URIO, E. A., 2011.

Em razão da natureza dos dados, fez-se necessário o uso do teste estatístico Scott e Knott para a normalização dos mesmos, principalmente pelo fato de que nem sempre foi possível analisar 200 tétrades por lâmina. Este teste estatístico mostra um agrupamento de médias.

Existe mais facilidade em aplicar testes onde o resultado mostrado é uma comparação de médias, porém, estes procedimentos apresentam resultados de difícil interpretação, devido à ambiguidade apresentada. Esta ambiguidade ocorre quando dois tratamentos, tidos como diferentes entre si, não diferem de um terceiro. Deste modo, os métodos de comparação múltipla baseados em análises de agrupamento univariada, como o teste de Scott e Knott, eliminam este tipo de problema, pois têm por objetivo separar as médias de tratamentos em grupos homogêneos, pela minimização da variação dentro, e maximização entre grupos (SANTOS, 2000).

A Tabela 5 apresenta o agrupamento de médias para o índice meiótico, bem como a diferença estatística significativa para a presença de micronúcleos. Em relação a tétrades normais e tríades, confirmando o teste de variância, as cultivares testadas não diferiram entre si. Para a variável micronúcleo, os trigos BRS 208 e BRS 220 foram estatisticamente diferente dos demais

Tabela 5 – Índice meiótico e médias obtidas na análise de tétrades de cultivares de trigo analisadas pelo teste Scott e Knott a 5%. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.

Cultivares	Índice meiótico	Tétrades normais (médias)	Triádes (médias)	Triádes %	Micronúcleos (médias)	Micronúcleos %
BRS 208	92,1	96,20	3,2	1,6	5,0 a	2,5
BRS 220	89,3	107,2	8,8	4,4	4,0 a	2,0
Safira	92,4	115,5	5,6	2,8	2,0 b	1,0
BR 25	88,4	59,80	6,2	3,1	2,0 b	1,0
BRS Timbaúva	98,6	192,8	3,4	1,7	1,2 b	0,6
BR 33	97,0	193,6	5,4	2,7	1,0 b	0,5
BR 32	97,7	130,2	5,4	2,7	1,0 b	0,5
BR 24	98,2	128,2	2,4	1,2	0,0 b	0,0
Onix	91,4	183,3	10	5,0	0,4 b	0,2
BRS Louro	93,7	126,0	5,8	2,9	0,0 b	0,0
BRS Camboatá	98,2	139,4	2,6	1,3	0,0 b	0,0
BRS 194	97,1	125,8	5,0	2,5	0,2 b	0,1

*Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna no nível de 5% de probabilidade.

O índice meiótico (IM) foi estimado de acordo com Love apud Pozzobon et al., (2011). Assim tétrades com quatro células de tamanho igual foram consideradas normais, e qualquer desvio como anormal. Para os referidos autores, plantas com índice meiótico inferior a 90% trazem problemas quando usadas em cruzamentos.

As cultivares analisadas neste estudo exibem alto índice meiótico, podendo então, ser indicadas para cruzamentos em programas de melhoramento genético, por mostrarem meiose regular, com exceção das cultivares BRS 220 e BR 25 que mostraram valores abaixo do indicado (90%). Ainda, as cultivares BRS 220 e BRS 208 apresentaram micronúcleos em suas tétrades, diferindo estatisticamente das demais. Sendo assim, sugere-se certo respaldo na utilização das mesmas em blocos de cruzamento, pois estes resultados indicam que pode haver discrepância na transmissão de suas características, principalmente em relação a cultivar BRS 220, que além de apresentar índice meiótico baixo, também apresentou micronúcleos.

Heddle apud Andrade Junior et al., (2008) definem micronúcleos como estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular e por isso não são incluídas nos núcleos das células-filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas. Na telófase, essas estruturas são incluídas nas células-filhas e podem fundir-se com o núcleo principal ou formar um ou mais “núcleos” secundários menores no citoplasma, os micronúcleos.

Baptista-Giacomelli et al., (2000) também observaram a presença de micronúcleos em *Avena sativa* L., e relataram que em

uma das variedades, após a formação do micrósporo, o micronúcleo foi eliminado por um mecanismo no qual os micronúcleos aproximaram-se da parede do micrósporo, separaram-se e foram eliminados como um micrócito, originando um grão de pólen pequeno e estéril. De acordo com os autores, este fenômeno ocorre comumente em híbridos interespecíficos e intergenéricos.

Para Ramulu et al., (1991), micronúcleos grandes observados em baixas concentrações de antimetabólitos (em estudos induzidos), são atribuídos a “má” separação dos cromossomos metafásicos. A despolimerização parcial dos microtúbulos conduz a um menor movimento cromossômico e em consequência, permanecem mais unidos, formando micronúcleos maiores.

Estudando o comportamento meiótico de espécies de Meliaceae, Grossi et al., (2011) observaram irregularidades no processo de segregação dos cromossomos em seis espécies analisadas. Como consequência desta segregação irregular dos cromossomos na meiose I e II e da organização irregular dos fusos na meiose II, o padrão de citocinese também foi irregular, originando tétrades com micrócitos e tríades, resultando em micrósporos desbalanceados e de núcleo restituído ($2n$). Apesar das irregularidades descritas, as espécies analisadas apresentaram uma frequência normal de produto final de meiose, acima de 93,39%.

Para Guerra (1988) cromossomos em ascensão precoce para os polos também podem estar relacionados ao processo de terminalização precoce dos quiasmas, pois os quiasmas são geralmente responsáveis pela manutenção dos bivalentes para que a perfeita segregação possa ocorrer em anáfase I.

Em estudo realizado com cultivares de triticales, Guerra et al., (2011) observaram várias irregularidades meióticas, como presença de univalentes, cromossomos retardatários e micronúcleos em tétrades, que comprometeram o comportamento e o índice meiótico.

No entanto, para serem usados na transferência genômica parcial, especialmente para transferir características controladas por poligenes, genes desconhecidos ou genes de plantas silvestres para culturas domesticadas, os micronúcleos representam um considerável potencial (BINSFELD, 1999).

A presença de micronúcleos em tétrades, portanto, irá resultar na formação de grãos de pólen com material genético diferente da célula-mãe. A meiose quando acontece de forma regular, deve ter ao final do processo de divisão, quatro células-filhas com a metade do número de cromossomos da célula original. No entanto, estes cromossomos devem ser íntegros e conter todos os genes que a célula original possui.

A perda de material genético pode ser ocasionada por mutações gênicas, que são definidas como mudanças que ocorrem dentro de um gene, ou como mutações cromossômicas que alteram a estrutura ou o número de cópias dos cromossomos. Muitas mutações cromossômicas causam anomalias na célula e funcionamento do organismo. Essas anomalias são baseadas em mudanças no número de genes ou posição gênica. Em alguns casos, uma mutação cromossômica resulta de quebra cromossômica, que se ocorrer dentro de um gene, resulta na perturbação funcional do mesmo (GRIFFITHS et al., 2008).

Verificando os resultados obtidos pela análise de tétrades, observou-se que a maioria das cultivares apresentou meiose regular, o que certamente resultaria em grãos de pólen viáveis e com material genético idêntico à célula original, contribuindo para a fertilidade destes grãos e para a fiel transmissão das características hereditárias. Estas cultivares que apresentaram normalidade na meiose, podem ser utilizadas em blocos de cruzamento de programas de melhoramento, por consequência de sua estabilidade genética.

Uma variável que merece ser comentada embora não tenha mostrado resultado estatístico significativo, são as tríades, que neste estudo foram observadas em todas as cultivares analisadas embora, em baixa incidência (Figura 13).

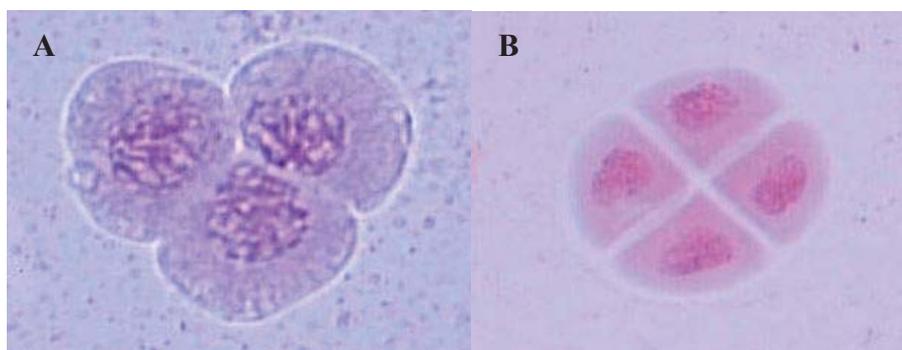


Figura 13 – Análise de tétrades em cultivares de trigo. (A) Tríade. (B) Tétrade normal. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011. Aumento 400x. Foto: URIO, E. A., 2011.

De acordo com Endow (1999) o processo de divisão meiótica é controlado por vários genes e a orientação dos fusos está sob controle genético. A formação de fusos em forma de T ou V ocorre devido à organização irregular dos fusos, que ao invés de se arranjam de forma paralela, se organizam de forma transversa ou

convergente, apresentando a configuração T ou V, respectivamente. Na forma convergente pode ocorrer uma fusão entre dois núcleos que estão próximos, na telófase II, formando um produto final de meiose na forma de tríade ao invés de tétrade.

Karsburg & Batistin (2006), ao verificarem o índice meiótico e o número de cromossomos em espécies da família Urticaceae, observaram em duas das espécies estudadas, anormalidades cromossômicas, cromossomos fora da placa equatorial, cromossomos compactados e a formação de díades e tríades. Como consequência, estas espécies também apresentaram valores de índice meiótico menores (64,4% e 76,47%) em relação às plantas que não mostraram anormalidades, que obtiveram índice meiótico com valores de 80%.

Ribeiro et al., (2010), ao verificarem a estabilidade cromossômica, através da análise citogenética, em genótipos de trigo armazenados a longo e médio prazo na Embrapa, observaram que a formação de tétrades normais predominou em relação àquelas portando irregularidades, como presença de micronúcleos. Consequentemente, os acessos que apresentaram normalidades meióticas tiveram índice meiótico normal, sendo considerados citologicamente estáveis, enquanto que acessos que mostraram irregularidades refletiram este fato apresentando baixo índice meiótico.

De acordo com Rajjou & Debeaujon (2008) a longevidade de sementes armazenadas resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, tais como temperatura de estocagem, quantidade de umidade nas sementes e qualidade da semente, que podem implicar na estabilidade genética do material.

Investigando a instabilidade meiótica em cultivares de triticales e analisando o número de micrósporos formados nas células mãe de pólen em fase de tétrade, diferenças foram apontadas entre genótipos quanto à frequência de tétrades irregulares (ROSA et al., 2006).

Do mesmo modo, Correa et al., (2005) analisando a meiose de 17 espécies de aráceas coletadas em matas e jardins do Rio Grande do Sul, verificaram tétrades normais em 10 dos genótipos analisados.

No presente trabalho, não se pode afirmar qual a exata formação dos micronúcleos, pois apenas fez-se este tipo de análise. Para poder inferir melhor sobre esta questão, outras análises deveriam ser realizadas, principalmente em outros estádios de meiose.

Sabe-se que o entendimento da constituição cromossômica no sistema genético do trigo comum ajuda a entender a origem dos desviantes e a magnitude dos efeitos das irregularidades meióticas. O trigo tem 42 cromossomos que formam 21 pares na meiose. Estes 21 pares derivam de três espécies ancestrais diferentes com similaridade genética parcial (homeologia) com os pares equivalentes das outras duas (FERNANDES et al., 1991).

De acordo com Mackey apud FERNANDES et al., (1991) a ocorrência de anormalidades que levem a perda ou ao ganho ocasional de um cromossomo inteiro ou parte dele, poderia ser letal se o trigo não tivesse tais níveis de duplicação genética, consequência de sua condição poliploide. Estes mutantes chamados aneuploides sobrevivem e fazem parte das populações de trigo por causa do chamado “efeito tampão da poliploidia”.

4.2 Viabilidade polínica

Para verificar a viabilidade polínica do grupo 1, foram analisadas as 17 cultivares de trigo quanto as seguintes variáveis: grãos de pólen viáveis (bi/trinucleados e com presença de amido), inviáveis (vazios), com mais de um poro e com diferença de tamanho. A análise de variância apontou diferença significativa ($p < 0,05$) somente para a variável diferença de tamanho (Figura 14), as demais variáveis apresentaram normalidade.

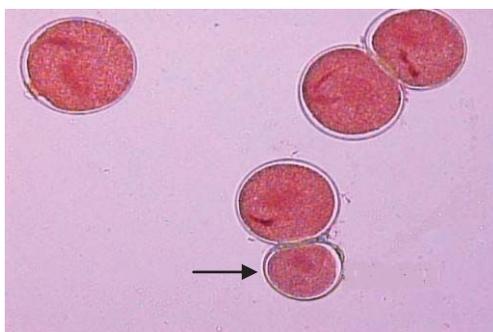


Figura 14 – Grãos de pólen de trigo viáveis com tamanhos distintos. A seta indica um grão de pólen com menor tamanho. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012. Aumento: 400 x. Foto: URIO, E. A., 2012.

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos na análise da viabilidade polínica do grupo 1, bem como o tempo de armazenamento das sementes e as medidas dos grãos de pólen em μm

Tabela 6 - Viabilidade polínica de cultivares de trigo com lançamento posterior ao ano de 2000, analisados pelo teste Scott e Knott a 5%.
Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.

Cultivares	Tempo de armazenamento da semente (anos)	Grão de pólen viável (médias)	Grão de pólen inviável (médias)	Grão de pólen com mais de um poro (médias)	Grão de pólen com tamanho diferente (médias)	Medida do diâmetro em µm
BR 24	2	97,6	0,2	0,0	2,2 a	48,3
BR 25	19	99,2	0,4	0,0	0,4 b	58,5
BRS 208	2	96,2	3,8	0,0	0,0 b	59,0
BR 33-Guará	2	99,0	1,0	0,0	0,0 b	54,0
BR 32	2	96,4	3,6	0,0	0,0 b	58,9
Safira	2	98,2	1,8	0,0	0,0 b	58,6
Onix	2	99,6	0,4	0,0	0,0 b	57,6
CNT 10	1	99,0	1,0	0,0	0,0 b	57,8
BRS Umbu	2	99,2	0,8	0,0	0,0 b	56,5
BRS Timbaúva	2	99,6	0,2	0,0	0,2 b	55,5
BRS Louro	2	99,2	0,6	0,2	0,0 b	60,0
BRS Guamirim	2	99,0	1,0	0,0	0,0 b	54,7
BRS Guabijú	2	97,2	2,0	1,0	0,0 b	56,9
BRS Camboatá	2	98,6	1,4	0,0	0,0 b	59,5
BRS Angico	2	98,4	1,6	0,0	0,0 b	55,9
BRS 220	2	99,0	0,8	0,0	0,2 b	61,8
BRS 194	2	98,4	1,6	0,0	0,0 b	59,7

*Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna no nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao tempo de armazenamento, condição que pode influenciar para que ocorra a formação de grãos de pólen inviáveis, observa-se que a maioria das cultivares haviam sido multiplicadas recentemente (2 anos), com exceção da cultivar BR 25, que encontrava-se armazenada por 19 anos. A referida cultivar apresentou índice meiótico abaixo do normal (88,4%) na análise de tétrades, no entanto, exibiu viabilidade polínica alta (99,2%). Neste caso, o índice meiótico não influenciou na viabilidade polínica da mesma.

As medidas dos grãos de pólen em diâmetro variaram entre 48,3 μm e 61,8 μm . A cultivar BR 24 que apresentou resultado significativo quanto à diferença de tamanho, é uma cultivar desenvolvida pela Embrapa Trigo. Foi introduzida para experimentação no Brasil Central pela Embrapa Cerrados e testada em ensaios de rendimento de grãos pela Comissão Centro-Brasileira de Pesquisa de Trigo. Foi indicada para cultivo de 1988 a 1997 nas seguintes unidades da federação: MG, GO e DF. Essa cultivar apresenta como características agrônômicas ciclo curto e estatura alta, espiga mútica com aristas apicais muito curtas, e gluma branca, de quilha curva e dente curtíssimo. É moderadamente resistente ao crestamento. Apresenta grão vermelho-escuro. Quanto à qualidade industrial, a cultivar foi classificada, em 1993, como da classe Intermediário (SOUZA, 2002). Considerando as análises em estudo, nenhuma publicação foi encontrada.

Entretanto, sugere-se que a diferença no tamanho de grãos de pólen, apresentada pela cultivar BR 24, pode estar relacionada ao fato desta mesma ser indicada para estados onde o clima é diferente do

Rio Grande do Sul, pois em MG, GO e DF as temperaturas são elevadas.

Poças (2004), descreve grãos de pólen da família Graminae como pólen de forma esférica, com opérculo rodeado por engrossamento da exina nas proximidades do poro, formando um anel e dimensões variando entre 20 e 70 μm .

Em estudo realizado por Rosa et al., (2006) onde foi verificado o tamanho e a viabilidade de grãos de pólen de triticales, os grãos de pólen menores do que 45 μm foram considerados pequenos, os com 45 a 48 μm , médios e grãos grandes, aqueles maiores do que 48 μm . A diferença de tamanho entre os grãos foi observada, no entanto, a viabilidade polínica foi preponderante, mesmo em genótipos que apresentaram grãos de pólen pequenos e médios.

Análises citogenéticas realizadas por Cardoso (2007) em trigo e espécies relacionadas evolutivamente, foi constatado que existe uma correlação positiva entre o tamanho do grão de pólen e ploidia com a viabilidade polínica. Em um acesso de *Ae. tauschii*, diploide ($2n = 2x = 14$) apresentou grãos de pólen com menor diâmetro (39,14 μm) comparado com cultivares de trigos brasileiros e também com sintéticos de *Triticum aestivum*, hexaploides ($2n = 6x = 42$) que apresentaram grãos de pólen bem maiores (55,82 a 59,87 μm).

De acordo com Rosa et al., (2006) é comum na família Triticeae encontrar grãos de pólen com tamanhos diferentes, sendo que na maior parte dos genótipos avaliados eles apresentam quantidade adequada de amido, estando em estádios binucleados ou trinucleados.

No presente estudo, analisando as medidas obtidas, pode-se verificar então, que as cultivares analisadas possuem grãos de pólen dentro do padrão observado por outros autores, considerados de tamanho médio e grande. Podemos também inferir que o tamanho não influenciou na viabilidade.

Fazendo uma comparação entre o índice meiótico e a viabilidade dos grãos de pólen, observou-se que a maioria das cultivares apresentaram elevado índice meiótico e alta viabilidade polínica (acima de 90%), com exceção das cultivares BR 25 e BRS 220, que mostraram índice meiótico abaixo do normal, e além disso, também, a cultivar BRS 220 apresentou micronúcleos, porém, ambas possuem alta viabilidade polínica.

Nos resultados obtidos para o segundo grupo, em que foram analisadas 70 cultivares de trigo, o teste de variância não evidenciou diferenças significativas ($p < 0,05$) para as variáveis analisadas. No entanto, o teste de agrupamento de médias apontou diferença significativa para variáveis como grãos de pólen inviáveis (Figura 15), viáveis e com diferença de tamanho.

Como este grupo era constituído de um número maior de cultivares em relação aos demais, as diferenças entre eles foram mais constantes, tratando-se de plantas com características agronômicas bastante diferenciadas.

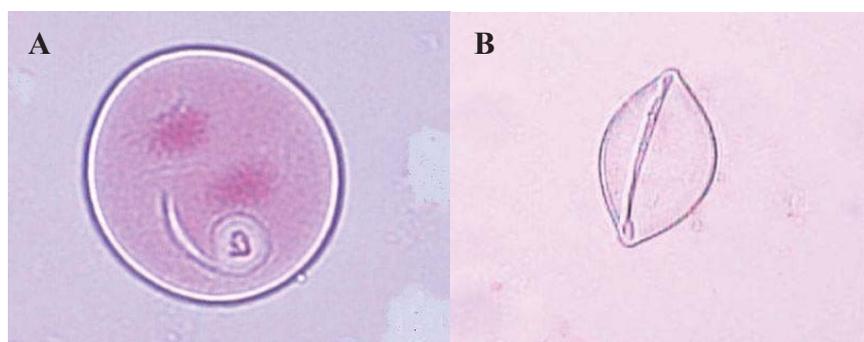


Figura 15 – Comparação entre dois grãos de pólen de trigo. (A) Grão de pólen viável. (B) Grão de pólen inviável. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012. Aumento: 400 x. Foto: URIO, E. A., 2012.

Os resultados do agrupamento de médias do grupo 2 são mostrados na Tabela 7

Tabela 7 – Viabilidade polínica de cultivares de trigo com lançamento anterior ao ano de 2000, analisados pelo teste Scott e Knott a 5%. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012.

Cultivares	Tempo de armazenamento da semente (anos)	Grão de pólen viável (médias)	Grão de pólen inviável (médias)	Grão de pólen com mais de um poro (médias)	Grão de pólen com diferença de tamanho (médias)
Cotiporã	1	100 a	0,0 b	0,0	0,00 d
BR 7	2	100 a	0,0 b	0,0	0,00 d
BR 18	2	100 a	0,0 b	0,0	0,00 d
Fronroso	2	100 a	0,0 b	0,0	0,00 d
BRS 207	2	99,8 a	0,2 b	0,0	0,00 d
Jacuí	2	99,8 a	0,2 b	0,0	0,00 d
IAC 5	2	99,8 a	0,2 b	0,0	0,00 d
Embrapa 10	1	99,6 a	0,0 b	0,4	0,00 d
BRS 177	2	99,6 a	0,4 b	0,0	0,00 d
Toropi	1	99,6 a	0,2 b	0,2	0,00 d
Peladinho	3	99,6 a	0,0 b	0,0	0,40 d
CEP 14 Tapes	1	99,6 a	0,4 b	0,0	0,00 d
Veranópolis	8	99,4 a	0,4 b	0,0	0,20 d
Embrapa 16	2	99,4 a	0,6 b	0,0	0,00 d
Pitana	16	99,4 a	0,4 b	0,2	0,00 d
BR 35	2	99,2 a	0,6 b	0,0	0,20 d
Candiota	1	99,2 a	0,8 b	0,0	0,00 d
Tucano	14	99,0 a	1,0 b	0,0	0,00 d
BR 40	18	99,0 a	0,4 b	0,0	0,60 d
Colônias	1	99,0 a	0,8 b	0,0	0,20 d
BRS 49	2	99,0 a	0,0 b	0,0	1,00 d

Jesuíta	2	98,8 a	1,2 b	0,0	0,00 d
BRS 179	2	98,8 a	0,4 b	0,0	0,80 d
PAT 7392	2	98,8 a	1,2 b	0,0	0,00 d
Santa Bárbara	16	98,8 a	0,6 b	0,0	0,60 d
CEP 17	1	98,6 a	1,4 b	0,0	0,00 d
BR 41	19	98,6 a	0,8 b	0,4	0,20 d
BR 15	1	98,4 a	1,2 b	0,2	0,20 d
IPR 84	2	98,2 a	1,0 b	0,0	0,80 d
IAC 24	2	98,2 a	1,8 b	0,0	0,00 d
Vacaria	16	98,0 a	0,4 b	0,0	1,60 d
Embrapa 27	2	98,0 a	0,8 b	0,0	1,20 d
BR 22	19	97,8 a	1,4 b	0,0	0,80 d
BR 23	2	97,8 a	1,0 b	0,0	1,20 d
Novo Sulino	17	97,8 a	1,6 b	0,0	0,60 d
Frontana	2	97,6 a	2,0 b	0,4	0,00 d
Patriarca	2	97,6 a	0,0 b	0,0	2,40 d
RS 8	14	97,6 a	2,2 b	0,0	0,20 d
Embrapa 40	2	97,6 a	0,0 b	0,0	2,40 d
Colonista	2	97,4 a	2,6 b	0,0	0,00 d
Nobre	19	97,4 a	0,0 b	0,2	2,40 d
Charrua	1	97,4 a	0,4 b	0,0	2,20 d
Lagoa	2	97,2 a	0,6 b	0,2	2,00 d
Vermelha					
Candeias	1	97,2 a	1,4 b	0,0	1,40 d
IPR 85	2	97,0 a	0,2 b	0,0	2,80 d
MGS 1	2	97,0 a	0,8 b	0,0	2,20 d
Aliança					
OR 1	2	96,8 a	3,0 b	0,0	0,20 d
CNT 4	17	96,8 a	3,0 b	0,0	0,20 d
Cincana	1	96,8 a	2,4 b	0,0	0,80 d
RS 1 Fenix	2	96,6 a	0,4 b	0,0	3,00 d
Fundacep 30	2	96,4 a	0,6 b	0,0	3,00 d
CEP 24	2	96,4 a	0,8 b	0,0	2,80 d
Missões	1	96,2 a	2,8 b	0,0	1,00 d
Nordeste	17	96,2 a	1,4 b	1,0	1,40 d
Embrapa 42	2	95,6 a	1,2 b	0,2	3,00 d
PG 1	2	95,4 a	3,0 b	0,0	1,60 d
Dom Feliciano	25	94,6 a	0,6 b	0,0	4,80 c
Planalto	13	94,6 a	1,0 b	0,0	4,40 c
Embrapa 22	2	94,6 a	1,4 b	0,0	4,00 c
CNT 5	1	94,2 a	1,0 b	0,2	4,60 c
Caçador	20	94,2 a	4,2 b	0,2	1,40 d
BH 1146	2	94,0 b	1,0 b	0,2	4,80 c
Centeira	1	93,4 b	2,6 b	0,0	4,00 c
CD 105	2	93,0 b	1,2 b	0,0	5,80 c
Ocepar	18	92,6 b	1,4 b	0,0	6,00 c
Montes Claros	16	91,8 b	8,0 b	0,2	0,00 d
Palotina	1	91,2 b	0,2 b	0,0	10,6 b
BR 6	2	89,8 b	1,6 b	0,4	4,00 c
Florestana	16	85,2 c	0,8 b	0,2	13,8 a
Bagé	1	77,4 d	22 a	0,6	0,00 d

*Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna no nível de 5% de probabilidade.

Mediante os resultados observados nos dois grupos analisados, verifica-se que as variáveis pólen inviável e pólen viável, com diferença estatística significativa, foram observadas apenas no grupo 2. Em relação à variável pólen com diferença de tamanho, esta foi observada nos dois grupos analisados. Entretanto, grãos de pólen com mais de um poro foram identificados, porém não obtiveram resultados significativos.

No grupo 1, a viabilidade polínica variou entre 97,2 e 99,6%, confirmando a estabilidade genética das cultivares estudadas. No grupo 2, a viabilidade ficou entre 77,4 e 100%, sendo que neste grupo apenas a cultivar Bagé apresentou diferença estatística significativa, podendo ser considerada instável neste tipo de análise.

Segundo Lagos (1983) a cultivar Bagé foi lançada em 1949, na Estação experimental de Bagé/RS e recomendada para o plantio nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. A referida cultivar surgiu em virtude de trabalhos seletivos de trigo que se concentraram em três pontos principais: 1) criação de variedades aptas para o plantio do tarde; 2) resistentes à ferrugens e 3) variedades precoces. No decorrer das fases do melhoramento que deu origem a esta cultivar, nos blocos de cruzamento se observava grande variabilidade no porte das plantas, tamanho e forma das espigas, perfilhamento, rendimento, resistência a doenças, valor industrial, entre outros, mostrando grande amplitude de variação. Estudos citológicos apontaram grande instabilidade meiótica, com índice meiótico baixo. Mesmo assim, esta cultivar teve uma duração efêmera na lavoura, assim como outras oriundas de seu grupo de

cruzamentos, pois somente em 1956 é que a Estação Experimental de Bagé voltou a lançar outra variedade de trigo precoce.

Assim sendo, podemos inferir que os resultados para inviabilidade podem estar relacionados com a instabilidade meiótica, verificada nos blocos de cruzamento que deram origem a cultivar Bagé.

De acordo com Love apud Zanotto et al., (2009), a análise de grãos de pólen, em fase mais avançada do desenvolvimento, permite avaliar algumas características anatômicas e fisiológicas importantes, que são fundamentais para sua completa maturação e desenvolvimento, tais como: número de núcleos e poros, tamanho do pólen e quantidade de amido.

Segundo Brambatti (2010) a presença de anormalidades em grãos de pólen, detectada através de análises citogenéticas é um provável indicativo de irregularidade no processo meiótico ou de fatores bióticos e/ou abióticos que venham inferir baixa fertilidade masculina. Para que um grão de pólen seja considerado viável ou fértil, todas as etapas que incluem a divisão meiótica e a microsporogênese precisam acontecer de forma adequada, sem nenhuma influência negativa que possa interferir na constituição genética destas células.

Cada grão de pólen leva consigo toda a informação genética consequente da heterozigose, fazendo com que estas características sejam transmitidas para a próxima geração (SOUZA et al., 2002). Assim sendo, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos e de variabilidade genética.

Brambatti (2010) verificou a viabilidade polínica de 29 genótipos secundários de triticales pertencentes ao bloco de cruzamentos do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo. As variáveis analisadas foram grãos de pólen binucleados e trinucleados, considerados viáveis; grãos de pólen com pouco amido; grãos de pólen vazios (inviáveis); grãos de pólen com mais de um poro e grãos de pólen com tamanho diferente, observados na mesma lâmina/genótipo. Os materiais avaliados apresentaram-se estáveis quanto à viabilidade polínica.

Cardoso et al., (2009), buscando avaliar a viabilidade polínica e a possibilidade de cruzamentos entre cultivares e acessos não comerciais de *Gerbera hybrida* Hort, verificaram que a viabilidade do pólen variou entre 87,67% e 99,17%. Segundo os autores, a alta viabilidade polínica e o sucesso de obtenção de sementes torna possível a produção de híbridos com novas combinações alélicas e transferência de caracteres desejáveis entre acessos comerciais e não comerciais.

Investigando a instabilidade meiótica em cultivares de triticales e analisando o número de micrósporos formados nas células mãe de pólen em fase de tetrade e o tamanho e a viabilidade dos grãos de pólen, diferenças foram apontadas entre genótipos quanto à frequência de tétrades irregulares. No entanto, foi verificado que genótipos que apresentam irregularidades nas tétrades produziram grãos de pólen em quantidade suficiente para boa fecundação. Porém, a frequência de grãos irregulares entre eles, evidencia que estes podem variar entre si nessa e em outras características, mudando o comportamento destes genótipos (ROSA et al., 2006).

Analisando dados citogenéticos para *Paspalum notatum* Flügge, Dahmer et al., (2008) observaram que a fertilidade do pólen variou entre 82,5% entre os acessos diploides e de 74,4% entre os tetraploides. Os mesmos autores afirmam que a fertilidade do pólen deve ser suficientemente alta para assegurar a formação do endosperma.

Martins et al., (2010), estudando o comportamento meiótico e a viabilidade polínica em quatro acessos de espécies de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum* observaram que a divisão celular mostrou resultados normais, porém com algumas anormalidades como migração precoce de cromossomos em metáfases I e II e cromossomos retardatários em anáfases I e divisão assincrônica. O índice meiótico variou entre 75,6% e 93,6% e a viabilidade polínica em todos os acessos foi superior a 90%, demonstrando que as irregularidades meióticas observadas não comprometeram a viabilidade.

Da mesma forma, no presente estudo observou-se que os genótipos BRS 208 e BRS 220 apresentaram tétrades com micronúcleos, no entanto, ao analisar a viabilidade polínica os mesmos obtiveram 96,2% e 99% de viabilidade, respectivamente. Assim sendo, podemos inferir que as anormalidades meióticas também não influenciaram na viabilidade dos grãos de pólen estudados neste trabalho.

Corrêa et al., (2005) analisando a meiose e a viabilidade polínica em 17 espécies diferentes, na família Araceae observaram que a frequência de polens viáveis foi significativamente superior à frequência média de anormais e de inviáveis, apontando 81,9% de

viabilidade. Ainda observaram que tétrades anormais são capazes de produzir grãos de pólen viáveis, devido ao processo seletivo que acontece no sentido de descarte dos produtos anômalos da microsporogênese.

De forma geral pode-se afirmar que no estudo das 12 cultivares analisadas, apenas duas obtiveram resultados estatísticos significativos para a presença de micronúcleos, sendo que as demais mostram estabilidade genética. Em relação aos que obtiveram inviabilidade polínica e diferença de tamanho nos grãos de pólen, sugere-se que seja feito a análise de tétrades visando confirmar tais anormalidades. Da mesma forma sugere-se que sejam avaliadas as tétrades de cultivares que estão armazenadas a longo/médio/curto prazo em câmaras de armazenamento a fim de verificar a influência do tempo de armazenamento sobre possíveis irregularidades.

4.3 Hibridização *in situ* fluorescente

As sementes das cultivares BRS 220, BR 24, BRS Timbaúva e BRS 208 pertencentes ao grupo 1, foram selecionadas mediante a estimativa da maior variabilidade, determinada pelo método de Tocher (Figura 16).

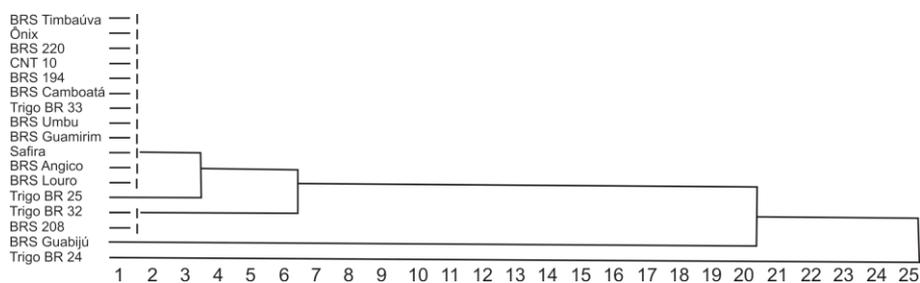


Figura 16 – Variabilidade das cultivares representada pelo dendrograma obtido pelo método de Tocher. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 201

4.3.1 FISH

Os resultados da FISH, para as cinco cultivares analisadas, com marcação dos oligonucleotídeos $(AAC)_5$ e $(AAG)_5$, são apresentados nas figuras que seguem. Quanto ao nível de ploidia todos mostraram-se hexaploides ($2n = 6x = 42$).

A Figura 17 apresenta o padrão dos sítios fluorescentes para a cultivar BRS 220. O oligonucleotídeo $(AAC)_5$ mostrou-se mais fortemente marcado que o oligonucleotídeo $(AAG)_5$ (Figura 18). Comparativamente, as regiões marcadas encontram-se próximas ao centrômero para $(AAC)_5$ e nas cromátides para $(AAG)_5$.

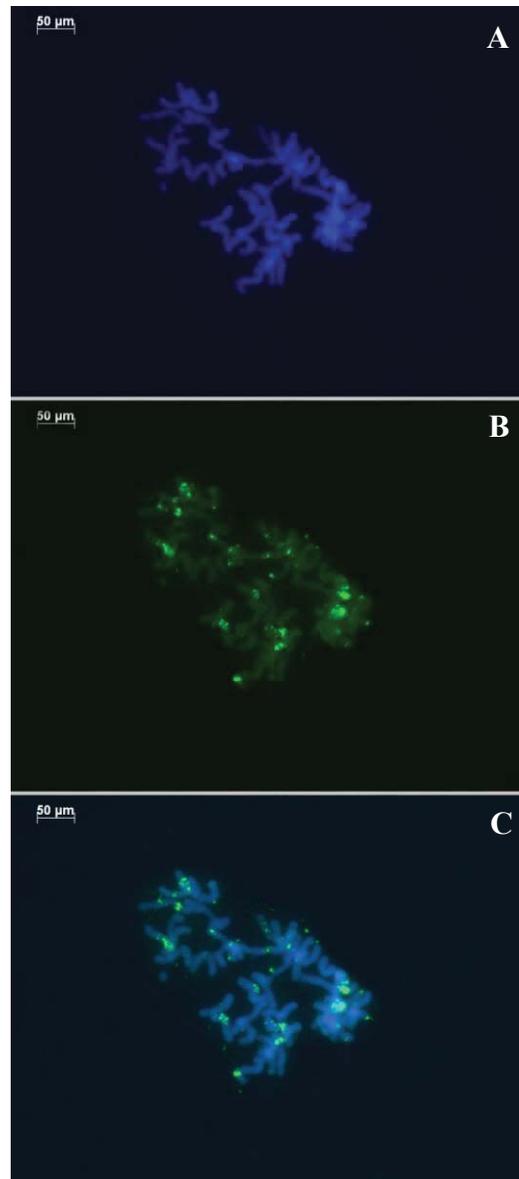


Figura 17 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS 220. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda $(AAC)_5$ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000 x Foto: URIO, E. A., 2013.

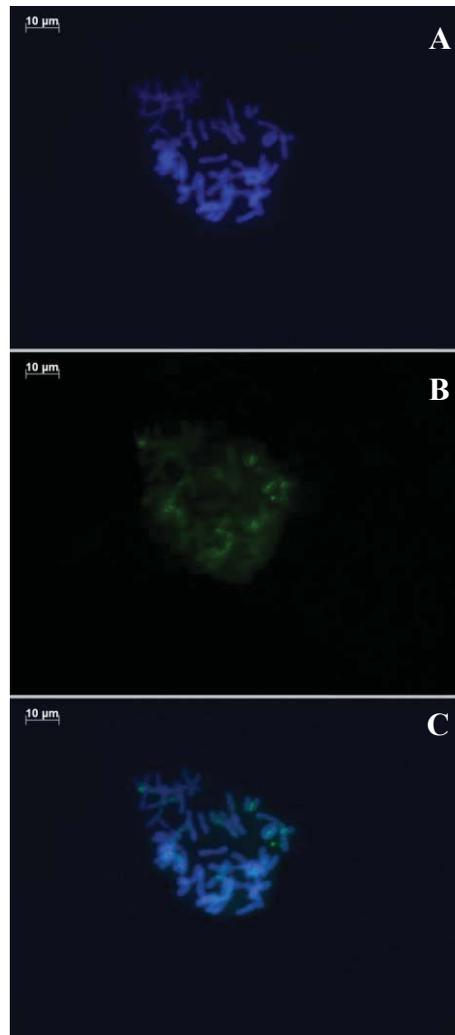


Figura 18 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS 220. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda $(AAG)_5$ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000 x Foto: URIO, E. A., 2013.

Na cultivar BR 24 (Figura 19) o oligonucleotídeo $(AAC)_5$ também mostra-se mais marcado em relação ao $(AAG)_5$ (Figura 20). As regiões marcadas estão distribuídas pelos cromossomos,

observando-se sítios, tanto na região centromérica como ao longo das cromátides.

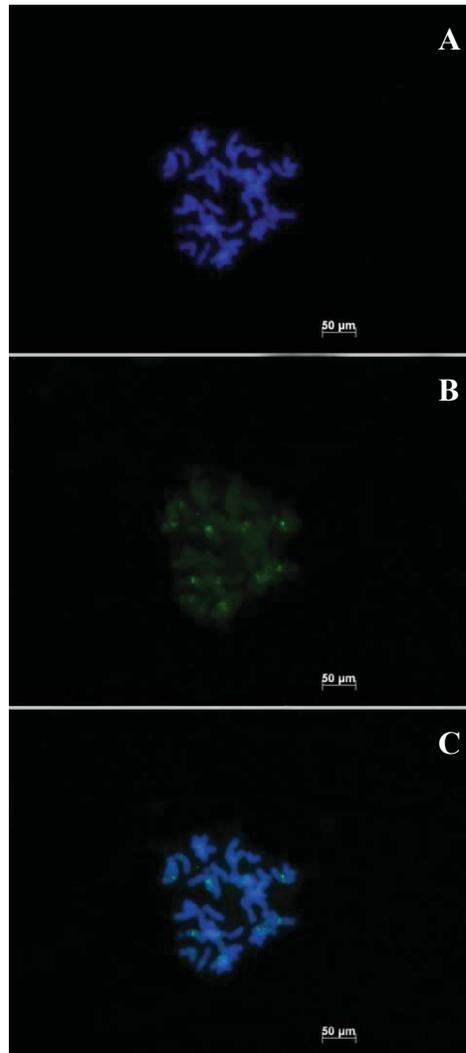


Figura 19 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BR 24. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda $(AAC)_5$ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000 x Foto: URIO, E. A., 2013.

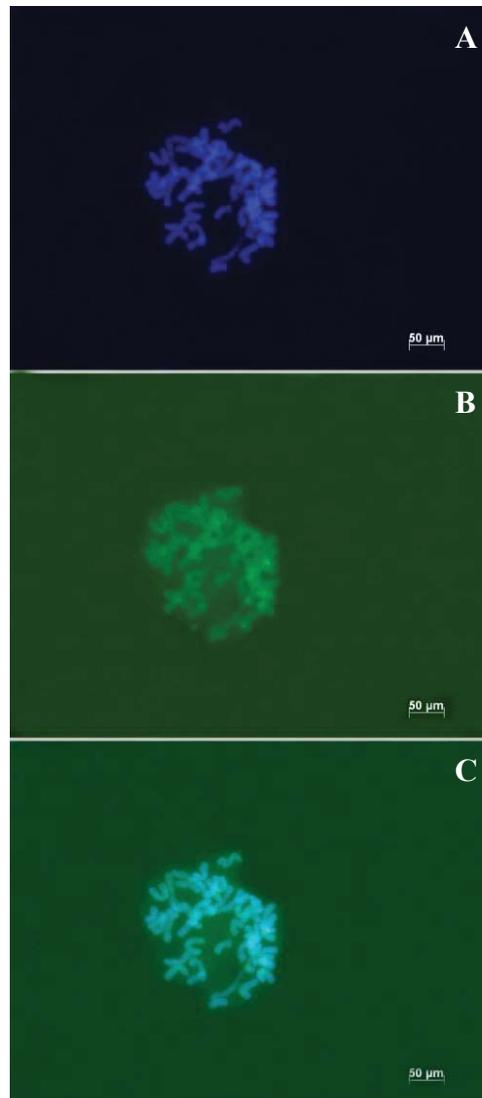


Figura 20 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BR 24. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda $(AAG)_5$ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000 x Foto: URIO, E. A., 2013.

A Figura 21 exibe o padrão de marcação fluorescente da cultivar BRS 208. Da mesma forma que as cultivares anteriormente descritas, a marcação é mais intensa para o oligonucleotídeo $(AAC)_5$,

quando comparado com (AAG)₅ (Figura 22). Nos cromossomos marcados com estes oligonucleotídeos, os sítios estão distribuídos em diferentes regiões dos cromossomos.

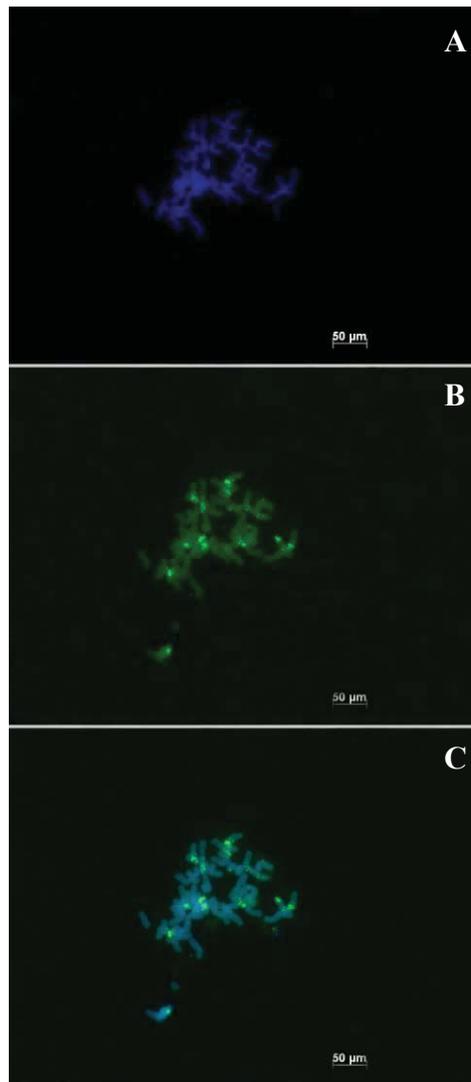


Figura 21 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS 208. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAC)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000x Foto: URIO, E. A., 2013.

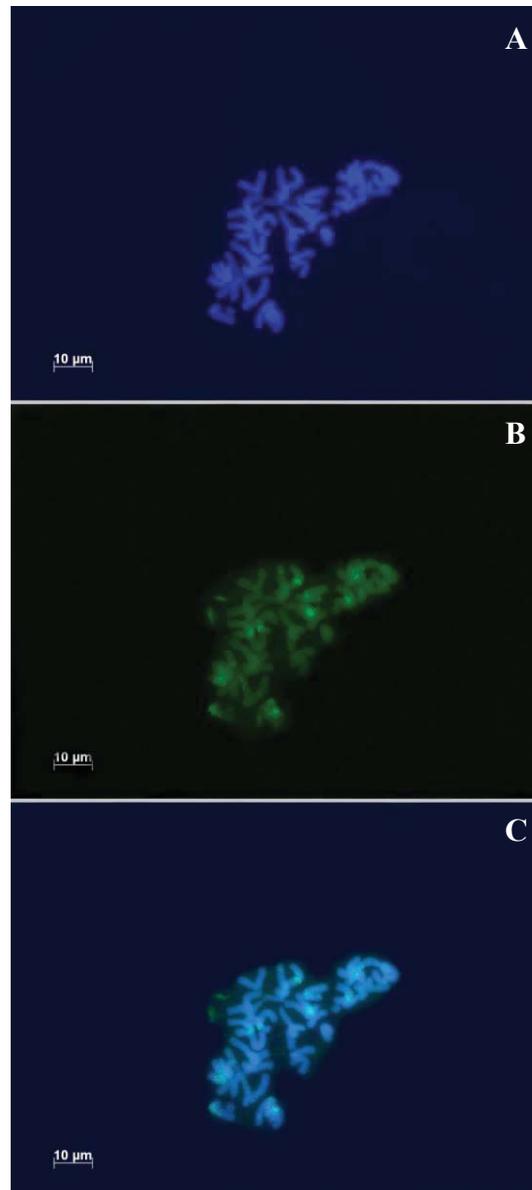


Figura 22 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS 208. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAG)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000x Foto: URIO, E. A., 2013.

A imagem a seguir mostra a cultivar BRS Timbaúva. Entretanto, para esta cultivar tanto o oligonucleotídeo (AAC)₅ (Figura 23) como (AAG)₅ (Figura 24) apresentam poucos sítios marcados, demonstrando nitidamente diferenças entre esta cultivar das demais.

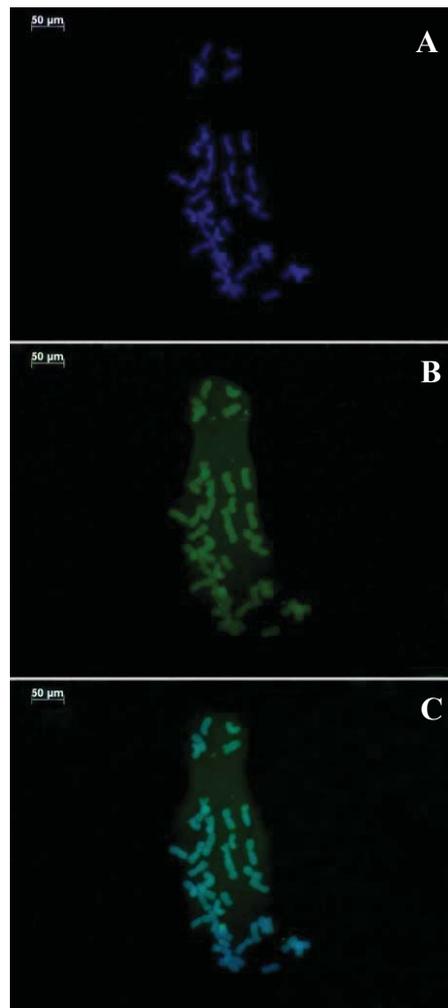


Figura 23 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS Timbaúva. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAC)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000 x Foto: URIO, E. A., 2013.

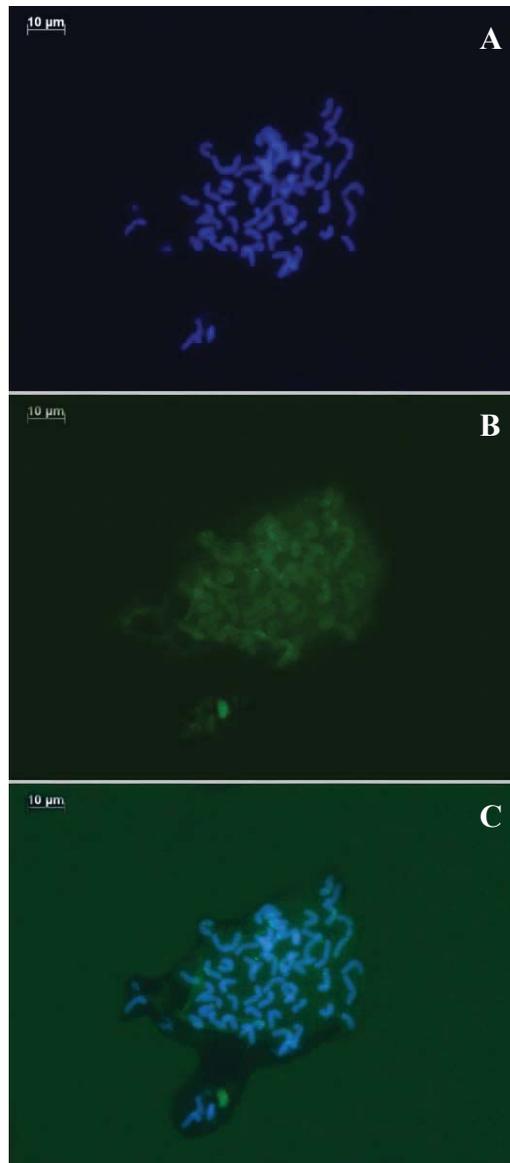


Figura 24 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar BRS Timbaúva. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAG)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000 x Foto: URIO, E. A., 2013.

A Figura 25 apresenta o padrão da cultivar Chinese Spring, usada neste trabalho como controle positivo. Nesta cultivar também se percebe que os cromossomos estão mais fortemente marcados com (AAC)₅ em relação ao (AAG)₅ (Figura 26).

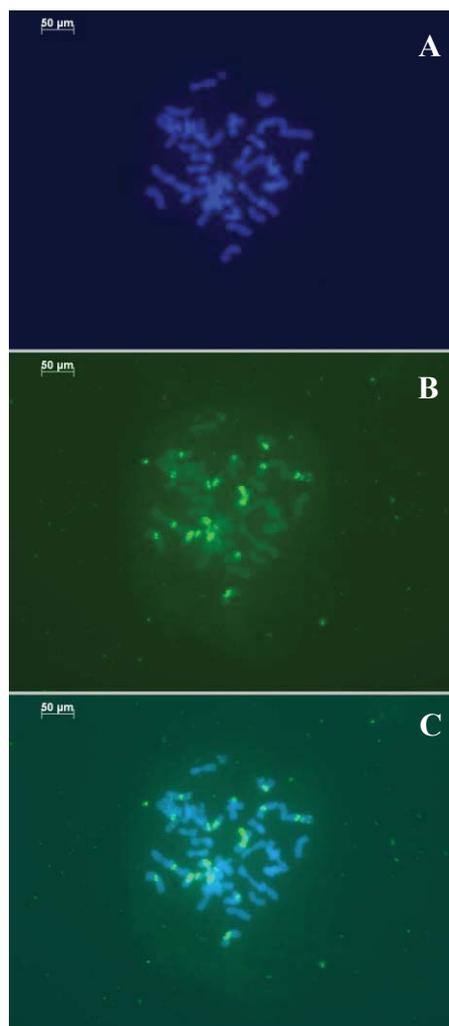


Figura 25 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar Chinese Spring. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAC)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000 x Foto: URIO, E. A., 2013.

Para os cromossomos marcados com (AAC)₅ os sinais encontram-se mais próximos ao centrômero, embora existam marcas também nas cromátides. Em relação ao (AAG)₅ as marcas também concentram-se próximas ao centrômero.

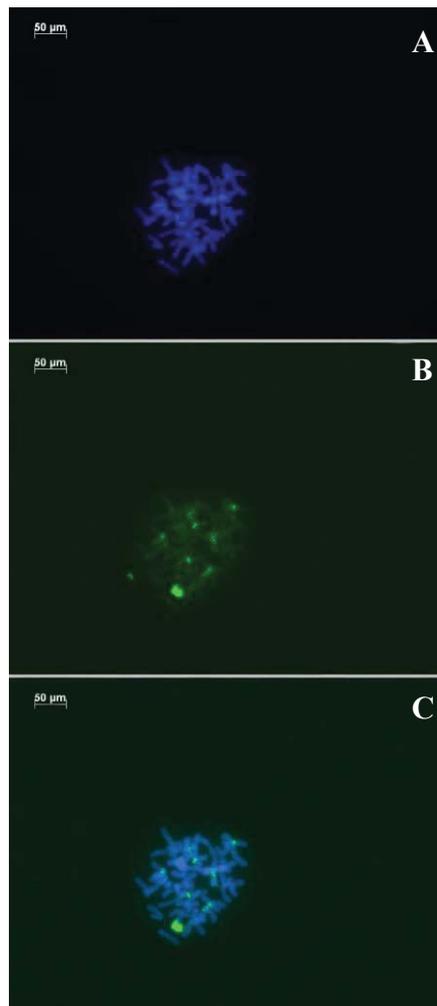


Figura 26 – Hibridização *in situ* Fluorescente em cromossomos metafásicos ($2n = 6x = 42$) de *Triticum aestivum*, cultivar Chinese Spring. (A) Cromossomos contra-corados com DAPI (azul). (B) Células hibridizadas *in situ* com a sonda (AAG)₅ detectadas com fluoresceína (FITC) em (verde). (C) Imagem sobreposta de A e B. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000 x Foto: URIO, E. A., 2013.

A aplicação da técnica de FISH neste estudo revela que existe diferente padrão de distribuição dos oligonucleotídeos (AAC)₅ e (AAG)₅ em trigo, mostrando a variabilidade existente dentro destas cultivares estudadas. Desta forma, estes oligonucleotídeos ou microssatélites podem ser utilizados como valiosos marcadores citogenéticos para estes materiais.

Em estudo realizado por Cuadrado & Schwarzacher (1998), observando a organização de simples sequências repetitivas nos genomas de trigo e centeio marcados com os oligonucleotídeos (AG)₁₂, (CAT)₅, (AAG)₅, (GCC)₅ e (GACA)₄, verificaram que todos os microssatélites mostraram-se distribuídos ao longo das cromátides. Alta densidade de sinais foi observada particularmente nas regiões pericentroméricas no genoma B.

Posteriormente, Cuadrado et al., (2000) buscando identificar diferentes classes de cromatina em trigo usando hibridização *in situ* com sequências de oligonucleotídeos (AAC)₅, (AAG)₅, (AG)₁₂ e (CAT)₅ verificaram que (AAC)₅ hibridizou fortemente na região pericentromérica e em vários sítios intercalados do genoma B. Muitos sítios mostraram-se co-localizados com (AAG)₅, embora a intensidade do sinal foi diferente em algumas marcações.

Na mesma linha de pesquisa, Cuadrado et al., (2008) buscaram aumentar o número de marcadores cito-moleculares para trigo pela exploração de classes de di e tri-nucleotídeos repetidos com sondas sintéticas pela técnica de FISH. Alguns destes oligonucleotídeos foram encontrados dispersos nos cromossomos, enquanto que outros, em sítios específicos. Neste estudo, usaram a

cultivar Chinese Spring, sendo observado que os oligonucleotídeos (AAC)₅ e (AAG)₅ mostraram alta densidade de sinais na região pericentromérica em regiões dos cromossomos do genoma B. Estes dois oligonucleotídeos mostraram os mais ricos padrões para distinguir o genoma B, bem como alguns cromossomos dos genomas A e D.

Molnár et al., (2011), com o objetivo de analisar a distribuição de microssatélites em *Aegilops biuncialis* e *Ae. geniculata* e sua relação com as translocações intergenômicas nestes alotetraploides selvagens, visando encontrar recursos genéticos para a melhoria de trigo, utilizaram métodos para verificar a localização cromossômica de (ACG)_n e (GAA)_n e nos seus genitores diplóides *Ae. comosa* e *Ae. umbellulata* foi investigada via hibridização *in situ* com sondas de oligonucleotídeos específicos. Foram evidenciados na região pericentromérica sinais de (ACG)_n e vários sinais de (GAA)_n nas regiões teloméricas, levando a conclusão que os microssatélites servem como marcadores adicionais para análise cariotípica de genomas.

Relacionando os trabalhos desenvolvidos por Cuadrado e colaboradores e demais pesquisas desenvolvidas nesta temática com os resultados obtidos no presente trabalho, bem como para a cultivar Chinese Spring, pode-se verificar que todas as plantas analisadas apresentaram marcações em diferentes regiões de seus cromossomos. Os sítios marcados nos diferentes cromossomos, correspondem aos genomas A, B e D, representando excelente ferramenta na caracterização citogenética, propiciando, deste modo, o desenvolvimento de marcadores cito-moleculares, além do fato de

permitir análises de cromossomos individuais dentro destes genomas. Nestes casos, o uso de sondas específicas para cada genoma, deve ser a estratégia de análise.

Esta caracterização torna-se importante quando se pretende identificar cromossomos distintos e portadores de características desejáveis, como também, podem fazer parte de genes de interesse, além de confirmar a conservação destas marcas ao longo da domesticação e evolução da planta. Além disso, a identificação de padrões específicos para as cultivares analisadas poderão também ser usados em análises de fingerprinting, como subsídios na proteção de cultivares.

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente é amplamente utilizada na genética humana para a detecção de síndromes, pelo fato de haver sondas específicas para cada caso. Em plantas, este tipo de análise está em fase de expansão, pois o principal entrave é a ausência de sondas associadas a características agrônômicas de interesse. Além disso, no Rio Grande do Sul as instituições de pesquisa que desenvolvem trabalhos com cereais, ainda não utilizam esta estratégia de análise.

Ressalta-se deste modo, que o emprego da FISH na caracterização de cultivares de trigo foi um desafio ao presente estudo, principalmente por ser o trigo hexaploide uma das culturas mais importantes do mundo e apresentar um baixo nível de polimorfismo intraespecífico, porém na distribuição local dos microssatélites houve variação nas diferentes cultivares estudadas. Assim sendo, a busca e o desenvolvimento de novas sondas torna-se um fator preponderante.

Entretanto, durante a realização do estudo, percebeu-se que a confecção de lâminas, tarefa imprescindível para o sucesso das hibridizações é um trabalho que exige que o protocolo seja seguido com seu devido rigor, pois pequenos detalhes podem interferir na qualidade do material, que deve ficar totalmente espalhado e sem sobreposição. Além disso, prática e persistência também são necessárias, pelo fato de que o trigo é constituído de 42 cromossomos, número este considerado grande, quando se necessita de um excelente espalhamento na lâmina. Destaca-se, portanto, que os resultados obtidos servirão de base para que a técnica de FISH possa ser utilizada nas atividades de rotina do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, para que outras cultivares de trigo possam ser igualmente caracterizadas, bem como outras espécies de cereais.

Em relação ao presente trabalho, sugere-se a repetição do estudo buscando atingir um maior número de células para confirmar a presença das marcações e dos sítios e também para permitir a identificação dos genomas A, B e D do trigo, bem como para identificar cromossomos pertencentes a cada genoma. O número ideal de células a serem hibridizadas seria entre três e cinco, com excelente espalhamento, permitindo assim a clara observação de toda a estrutura de cada cromossomo, bem como a nítida localização da sonda utilizada.

4.3.2 GISH

Ainda neste estudo as cultivares BRS 220, BRS 208, BRS Timbaúva e BR 24 foram avaliadas via GISH, visando detectar a

translocação 1BL.1RS. Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 8

Tabela 8 - Resultados para a presença (+) ou ausência (-) de translocações entre trigo e centeio via Hibridização genômica *in situ* GISH. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013.

Genótipo	Translocação
BRS 220	-
BRS 208	+
BRS Timbaúva	-
BR24	-

Analisando os dados da tabela, observa-se que de todas as cultivares utilizadas neste estudo, a única que apresentou a translocação 1BL.1RS foi a BRS 208 (Figura 27).

A cultivar BRS 208 foi desenvolvida pela Embrapa Trigo e indicada para todo o Estado do Paraná, com excelente potencial de rendimento, ampla adaptação, resistente às doenças e dotada de força de glúten adequada à fabricação de pão tipo francês e de forma. Os progenitores desta cultivar são linhagens desenvolvidas no Rio Grande do Sul e nos Cerrados e cultivares criadas no Rio Grande do Sul, com alta resistência às principais doenças e com ampla adaptação, e uma linhagem de origem mexicana, com elevada força de glúten. Em relação a doenças (oídio, manchas foliares e giberela), a cultivar BRS 208 destacou-se nas regiões em que foi testada quando comparada com duas testemunhas consideradas de bom nível de resistência. Em relação à qualidade industrial da cultivar BRS 208, foram analisadas amostras de grãos obtidas de vários experimentos realizados para avaliação de rendimento, principalmente nas localidades de Londrina (IAPAR e Embrapa Soja), na região norte, Campo Mourão, Cascavel e Palotina, na região centro-oeste, e Ponta Grossa e Guarapuava, na

região Sul. Na média geral, a força de glúten -4 (W) obtida foi de 282 (x 10 J), enquadrando-se, portanto, na Classe de Trigo Pão, de acordo com a Instrução Normativa N° 1, de 27/01/99, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (DOTTO, 2001).

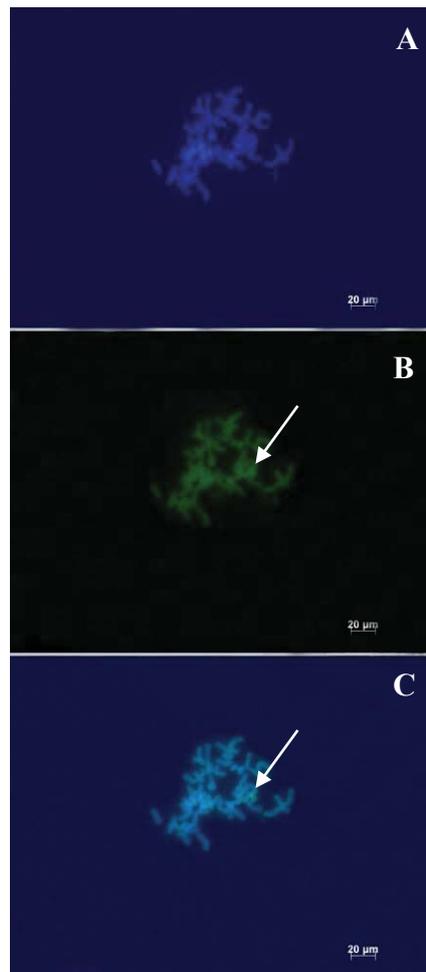


Figura 27 - Hibridização genômica *in situ* (GISH) em célula de trigo ($2n = 6x = 42$), cultivar BRS 208, usando DNA de centeio como sonda (verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos em A foram contra-corados com DAPI (azul), em B corados com FITC (verde) e em C imagem sobreposta de A e B. A seta indica a translocação 1BL.1RS. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2013. Aumento: 1000 x. Foto: URIO, E. A., 2013.

Segundo Cassasola & Brammer (2012), translocações são rearranjos cromossômicos estruturais que envolvem segmentos cromossômicos de extensão variada, pertencentes a cromossomos homólogos ou não homólogos. Estes segmentos podem ser portadores de genes de resistência a estresses bióticos e abióticos, sendo assim uma ferramenta utilizada no melhoramento de plantas.

Casassola (2012) aborda sobre genes de interesse agrônomo que estão presentes na translocação 1BL.1RS (trigo.centeio). Destaca vários genes de resistência presentes no centeio, tais como o gene *Sr31* (ambos conferem resistência à ferrugem do colmo), *Lr26* (resistência à ferrugem da folha), *Yr9* (resistência à ferrugem amarela) e *Pm8* (oídio) e que foram introgrididos e mantêm-se estáveis no genoma no trigo. Entretanto, ao mesmo tempo em que carrega genes de resistência como os anteriormente citados, a partir do braço cromossômico 1R, ocorre a introdução do gene das secalinas no genoma do trigo, causando a perda das gliadinas e gluteninas (proteínas de reserva e componentes do glúten, sendo as responsáveis pela força e extensibilidade da massa) no braço curto do cromossomo 1B. Como consequência, esta translocação diminui a qualidade da farinha e, conseqüentemente, de panificação.

No entanto, em relação a cultivar BRS 208 que possui a translocação 1BL.1RS, para a criação da mesma priorizou-se nos cruzamentos genitores que apresentavam boa resistência e adaptação. O primeiro cruzamento foi realizado entre a cultivar CEP 19, com resistência às doenças foliares do trigo, e a linhagem de bom tipo agrônomo PF 85490. A linha originada foi cruzada com a cultivar

BR 23, de bom tipo agrônômico, produtiva e de ampla adaptação. A F1 deste cruzamento foi cruzada com a linhagem CPAC 89118, com boa adaptação no norte do Paraná e com alta força de glúten (DOTTO, 2001). Deste modo, observa-se que a característica de qualidade que pode ser diminuída com a presença da translocação, foi resgatada através de cruzamentos com cultivares portadoras desta característica.

Angelova & Georgiev (2006) aplicaram a técnica da hibridização genômica *in situ* para detectar segmentos cromossômicos de centeio em trigo e relatam que a técnica em questão mostra grande potencial para detectar cromossomos de natureza diferente, bem como segmentos.

Tang et al., (2009) também utilizaram a técnica da hibridização genômica *in situ* para análise de bandas C em três variedades de trigo e observaram que ambas continham o braço do cromossomo 1RS do centeio fundido com o braço do cromossomo 1BL do trigo. De acordo com os autores, a fluorescência permitiu identificar nitidamente a estrutura dos cromossomos translocados entre uma variedade em relação às outras duas. Os resultados fornecem um novo recurso para o melhoramento do trigo.

Portanto, caracterizar as cultivares de trigo, também por esta estratégia, permitirá a escolha correta por parte dos melhoristas, no momento dos cruzamentos intergenéricos e/ou interespecíficos, uma vez que o trigo cruza facilmente com o centeio, triticale, espécies afins como o *Thinopyrum ponticum*, entre outras.

5 CONCLUSÕES

- A caracterização citogenética, em cultivares de trigos brasileiros é possível quando se utiliza diferentes estratégias metodológicas e permite avaliar quanto as cultivares diferem entre si.
- No grupo 1 (cultivares modernas) as cultivares BRS 208 e BRS 220 apresentam a presença de micronúcleos nas tétrades, com valores de 5% e 4%, respectivamente. Isso é um indicativo de irregularidades genéticas, embora estudos mais detalhados em meiose devam ser realizados, uma vez que a porcentagem é elevada em relação às outras cultivares estudadas, que exibem entre 1 e 3%, ou não apresentam micronúcleos.
- O valor do índice meiótico das cultivares do grupo 1 está acima de 90%, considerado normal para este tipo de análise, com exceção das cultivares BRS 220 e BR 25, que mostraram valores abaixo do normal, 88,4 e 89,3 %, respectivamente.
- Em relação à viabilidade polínica, as cultivares do grupo 1 apresentam estabilidade genética. Assim sendo, sugere-se que estas cultivares podem ser utilizadas em programas de melhoramento para a transferência de genes de interesse, com exceção daquelas que apresentam índice meiótico abaixo do normal e micronúcleos.
- As cultivares do grupo 2 (antigas) apresentam diferenças significativas para viabilidade/inviabilidade e também diferença de tamanho nos grãos de pólen, indicando que, para

este grupo, estas variáveis possibilitaram novamente a inferência de instabilidades genéticas.

- A técnica de FISH pode ser empregada para detectar a presença e localização de microssatélites com eficiência, tornando estes marcadores valiosos fingerprinting em espécies e variedades e para a construção de mapas genéticos.
- As cultivares BRS 220, BR 24, BRS 208 e BRS Timbaúva exibem variabilidade genética quanto aos oligonucleotídeos (AAC)₅ e (AAG)₅.
- A técnica de GISH é eficiente para a detecção de fragmentos translocados com facilidade e precisão. Na aplicação desta técnica, a cultivar BRS 208 apresenta a translocação 1BL.1RS.
- As informações da caracterização citogenética clássica e molecular destas cultivares podem ser utilizadas pelo Banco de Germoplasma da Embrapa Trigo para a realização do pré-melhoramento, bem como para o programa de melhoramento genético de trigo.

REFERÊNCIAS

ABITRIGO. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/trigo.asp>>. Acesso em: 19/06/2011.

ANDRADE JUNIOR, S. J. de; SANTOS JUNIOR, J. C. S.; OLIVEIRA, J. L.; CERQUEIRA, E. M. M.; MEIRELES, J. R. C. Micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallid* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom: alterações genéticas decorrentes de poluição aérea urbana. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, vol. 30, n. 3, p. 295-301, 2008.

ANGELOVA, Z.; GEORGIEV, S. Visualization of *Secale cereale* DNA in wheat germoplasm by genomic *in situ* hybridization. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Bulgaria, vol. 20, n. 3, p. 26-29, 2006.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Elimination of micronuclei from microspores in Brazilian Oat (*Avena sativa*) Variety. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n.3, p. 681-684, 2000.

BARBIERI, R. L. Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 403 – 413.

BATISTI, G. K.; WENTZ, R.; OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, S. B. V.; SILVA, J. A. G. *Fontes de adubação nitrogenada na interação genótipo com sistema de sucessão no trigo alterações no rendimento de grãos.* Disponível em: <www.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/pdf/CA/CA_00538.pdf>. Acesso em: 30/03/2011.

BINSFELD, P. C. Transferência genômica parcial: emprego no melhoramento de plantas. *Biotecnologia*. v. 8, p. 86-88, 1999. Encarte Especial.

BODANESE-ZANETTINI, M. H.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; SALZANO, F. M.; Genetic and environmental effects on the frequency of meiotic disturbances in wheat. *Revista Brasileira de Genética*, v. 6, n. 1, p. 13-57, 1983.

BONATO, A. L. V. *Extração de DNA genômico de cereais de inverno na Embrapa Trigo*. Passo Fundo, Embrapa Trigo, 2008, 11 p.

BONOW, S. *Coleções nucleares em bancos de germoplasma: conceito e utilização atual em trigo*. Passo Fundo: Embrapa, 2007. Circular técnica 80. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do80.htm>. Acesso em: 02/04/2011.

BONOW, S.; ALBUQUERQUE, A. C. S.; IORCZESKI, E. J.; SCARIOT, E. F. M.; MULLER, E. *Sistema de gerenciamento dos Bancos Ativos de Germoplasma da Embrapa Trigo*. Passo Fundo: Embrapa, 2008. Comunicado técnico 233. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co233.htm>. Acesso em: 05/04/2011.

BONOW, S. Pré-melhoramento: elo entre recursos genéticos e programas de melhoramento de plantas. 2011. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobios.com/Artigos/2011_3/PreMelhoramento/index.htm>. Acesso em: 21/12/2012.

BORÉM, A. *Melhoramento de Plantas*. 2ª Ed. Viçosa: UFV, 1998. 453 p.

BRAMBATI, A. *Viabilidade polínica e hibridização genômica in situ aplicada ao melhoramento de triticale*. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2010.

BRAMMER, S. P. *A citogenética na caracterização genômica do trigo*. Passo Fundo: Embrapa, 2003. Circular técnica 31. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do31.htm>. Acesso em: 02/04/2011.

BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. *Citogenética vegetal: da era clássica à molecular*. Passo Fundo: Embrapa, 2007. Circular técnica 85. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm>. Acesso em: 03/04/2011.

BRAMMER, S. P.; POERSCH, L. B.; OLIVEIRA, A. R.; VASCONCELOS, S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. *Hibridização genômica in situ em Triticeae: um enfoque metodológico*. Passo Fundo: Embrapa, 2009. Comunicado técnico 270. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co270.htm>. Acesso em: 22/04/2011.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. *Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal*. Passo Fundo: Embrapa, 2002. p. 277-298.

CARDOSO, B. M. Análises citogenéticas em linhagens sintéticas de *Triticum aestivum* (*T. durum* X *T. tauschii*) e seus cruzamentos com cultivares de trigo, visando à introgressão de resistência à ferrugem da folha. 2007. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CARDOSO, R. D. L.; GRANDO, M. F.; MS-BASSO, S.; SEGEREN, M. I.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M. Caracterização citogenética, viabilidade de pólen e hibridação artificial em gérbera. *Horticultura Brasileira*, v. 27, p. 40-44, 2009.

CASASSOLA, A. *Caracterização agronômica e postulação de genes de resistência à ferrugem do colmo em genótipos de trigo parcialmente resistentes à ferrugem da folha*. 2012.134 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

CASSASOLA, A.; BRAMMER, S. P. Translocações cromossômicas entre trigo e centeio: uma alternativa ao melhoramento. Santa Maria, *Ciência Rural*, vol. 41, n.8, p. 1307-1314, 2011.

CASSASOLA, A.; BRAMMER, S. P. Translocações cromossômicas entre trigo e espécies relacionadas e seu potencial uso no melhoramento genético. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 10, n. 2, p. 235-243, 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/2013 – Terceiro Levantamento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_06_09_10_01_boletim_portugues_dezembro_2012.pdf>. Acesso em 19 de dezembro de 2012.

CÔRREA, M. G. S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J. B. da; ÁVILA, P. F. V. de; BUSATO, G. R.; LEMES, J. S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Botanica Brasilica*, v. 19, n. 2, p. 295-303, 2005.

CUADRADO, A.; SCHWARZACHER, T. The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genome. *Chromosoma*, v. 107, p. 587-594, 1998.

CUADRADO, A.; SCHWARZACHER, T.; JOUVE, N. Identification of different chromatin classes in wheat using in situ hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. Colney, *Theoretical and Applied Genetics*, v. 101, p. 711-717, 2000.

CUADRADO, A.; CARDOSO, M.; JOUVE, N. Increasing the physical markers of wheat chromosomes using SSRs as FISH probes. Canadá, *Genome*. v. 51, p. 809-815, 2008.

CUNHA, R. C.; PIRES, J. L. F.; VARGAS, L. Bases para produção competitiva e sustentável de trigo no Brasil. In: PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA, G. R. da; *Trigo no Brasil: bases para produção competitiva e sustentável*. 1ª Ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. p. 19-26.

CURTIS, B. C. Wheat in the world. In: CURTIS, B. C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, H. G. *Bread wheat: improvement and production*. 1ª ed. Rome: FAO, 2002. p. 1-17.

DAHMER, N.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M.; CASTRO, B. de. Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flüggé accessions. *Scientia Agricola*, v. 65, n.4, p. 381-388, 2008.

DOTTO, S. R. Cultivar de trigo BRS 208: produtividade, rusticidade e qualidade. Londrina: Embrapa Soja, 2001. Circular técnica 31. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/446142/1/circte_c31.pdf>. Acesso em: 22/05/20

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. EMBRAPA. *O trigo no Brasil*. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/aunidade/trigo_brasil.htm>. Acesso em: 28 de dezembro de 2012.

ENDOW, S. A. Microtubule motors in spindle and chromosome motility. *European Journal of Biochemistry*, v. 262, p. 12-18, 1999.

FALCÃO, T.M.M.A.; MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Genotypic and environmental effect on meiotic behavior and the influence of chromosomal abnormalities on fertility of hexaploid Triticale (*X Triticosecale* Wittmack). Ribeirão Preto, *Revista Brasileira de Genética*, v.4, n.4, p.611-624, 1981.

FEDERIZZI, L. C.; SCHEEREN, P. L.; NETO, J. F. B.; MILACH, S. C. K.; PACHECO, M. T. Melhoramento do Trigo. In: BORÉM, A. *Melhoramento de espécies cultivadas*. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 659-715.

FERNANDES, I. B. de M.; BODANEZE-ZANETTINI, M. H.; ZANATTA, A. C. A. Fatores responsáveis pela desuniformidade varietal no trigo *Triticum aestivum* (L.) Thel e o papel da instabilidade cromossômica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n. 3, p. 353-369, 1991.

FUJITA, Y.; HIROYUKI, F.; HIROSHI, Y. Identification of wheat cultivars using EST-SSR markers. *Breeding Science*. v. 59, p. 159-167, 2009.

GILL, B. S.; FRIEBE, B.; ENDO, T. R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*. v. 34, p. 830-839, 1991.

GILL, B. S.; FRIEBE, B. Cytogenetics, phylogeny and evolution of cultivated wheats. In: CURTIS, B. C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, H. G. *Bread wheat: improvement and production*. 1^a ed. Rome: FAO, 2002. p. 71-88.

GOEDERT, C. O. História e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, L. *Recursos Genéticos Vegetais*. Brasília, Distrito Federal: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. *Introdução à genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 712 p.

GROSSI, J. A.; GODOY¹, S. M. de.; MACEDO¹, C. R.; PAULA, G. B. N. de.; ROMAGNOLO, M. B.; RISSO-PASCOTTO, C. Comportamento meiótico durante a microsporogênese em espécies da família Meliaceae. Umuarama, *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 14, n. 1, p. 51-56, 2011.

GUERRA, D.; PACHECO, M. T.; FEDERIZZI, L. C. Analysis of self-fertilization and meiotic behavior of eleven Brazilian triticale cultivars at two sowing dates. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, vol. 11, p. 114-124, 2011.

GUERRA, M. *Introdução a citogenética geral*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. dos; ORTH, A. I. A diversidade dos recursos genéticos vegetais e a nova pesquisa agrícola. Santa Maria, *Ciência Rural*, v. 28, n. 3, p. 521-528, 1998.

GUTKOSKI, L. C.; KLEIN, B.; PAGNUSSAT, F. A.; PEDÓ, I. Características tecnológicas de genótipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivados no Cerrado. Lavras, *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 3, p. 786-792, 2007.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWAZARCHER, T., ANAMTHAWAT-JÓNSSONN K.; LEITCH, A. R.; SHI, M. *In situ* hybridization with automated chromosome desnaturation. *Technique*, v. 3, p. 109-115, 1991.

IORCZESKI, E. J.; ALBUQUERQUE, A. C. S.; BONOW, S.; CONSOLI, L.; TORRES, G. A. M.; BRAMMER, S. P. Pré-melhoramento de cereais de inverno: uma abordagem para ampliar a base genética. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. da F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. *Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso*. Brasília, Distrito Federal: Embrapa Informação Tecnológica, 2011, p. 379-400.

KARSBURG, I. V.; BATTISTIN, A. Meiose e número cromossômico de cinco espécies da família Urticaceae do Rio Grande do Sul. *Revista de Ciências Agro-Ambientais*. v. 4, n. 1, p. 47-60, 2006.

KATO, A.; VEGA, J. M.; FANGPU, H.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 8, p. 148-154, 2005.

KILIAN, B.; OZKAN, H.; DEUSCH, O.; EFFGEN, F.; BRANDOLINI, A.; KOHL, J.; MARTIN, K. W.; SALAMINI, F. Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, n.1, p. 217-227, 2007.

LAGOS, M. B. *História do melhoramento do trigo no Brasil*. Instituto de Pesquisas Agronômicas do Rio Grande do Sul. Boletim Técnico, Nº 10, 79 p., 1983.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A. Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Myrtaceae oriundos do Rio Grande do Sul-Brasil. Uruguaiana, *Revista da FZVA*, v.11, n. 1, p. 95-106, 2004.

LOPES, M. A.; MELLO, S. C. M. *Estratégias para melhoria, manutenção e dinamização do uso dos bancos de germoplasma relevantes para a agricultura brasileira*. Brasília: Embrapa Recursos

Genéticos e Biotecnologia, 2006. Disponível em: <<http://www.cria.org.br/cgee/documentos/dinamizaçãogronegocio.doc>>. Acesso em: 03/05/2011.

MAIA, L. C. *Desenvolvimento de ferramenta e análise in silico da ocorrência de microssatélites (Single Sequence Repeat) no genoma do arroz*. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

MAPA. Ministério da agricultura e agropecuária. Brasil Projeções do Agronegócio 2011/2012 a 2021/2022. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%20_0.pdf>. Acesso em 20 de dezembro de 2012.

MARCHIORO, V. S. & FRANCO, F. A. de. Informações técnicas para trigo e triticales – Safra 2011. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 4., 2010, Cascavel. *Proceedings...*Cascavel: COODETEC, 2010. 170 p.

MARINHO, V. L. A.; MENDES, M. A. S.; CARLOS, M.; TENENTE, R. C. V. *Intercâmbio e quarentena de germoplasma vegetal no período de 2004 à 2007*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. Comunicado Técnico 158. Disponível em: <<http://www.cenargem.embrapa.br/publica/trabalhos/cot158.pdf>>. Acesso em: 10/05/2011.

MARTINS, K. C.; PEREIRA, T. N. S.; SOUZA, S. A. M.; COSTA, F. R. da. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. Santa Maria, *Ciência Rural*, v. 40, n. 8, p. 1746-1751, 2010.

MENDES-BONATO, A. B.; VALLE, C. B.; PAGLIARINI, M. S.; PENTEADO, M. I. O. Caracterização de acessos de *Brachiara brizantha*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 20 p. html. (*Embrapa Gado de Corte. Boletim de pesquisa e Desenvolvimento*; 15).

MOLNÁR, I.; CIFUENTES, M.; SCHNEIDER, A.; BENAVENTE, E.; MOLNÁR-LÁNG, M. Association between simple sequence repeat-rich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats. *Annals of Botany*, v. 107, p. 65-76, 2011.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. Citogenética. In: OSÓRIO, E. A. *Trigo no Brasil*. vol. 1, Campinas: Fundação Cargil, 1982. p. 96-143.

MORAES-FERNANDES, M. I. B.; ZANATTA, A. C. A.; PRESTES, A. M.; CAETANO, V. R.; BARCELLOS, A. L.; ANGRA, D. C.; PANDOLFI, V. Cytogenetics and immature culture embryo at Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Genetics and Molecular Biology*. v. 23, p.1051-1062, 2000.

MORAIS, F. C. C. *Caracterização de uma colecção antiga de trigos portugueses através de marcadores morfológicos e moleculares*. 2010.110 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2010.

MORGANTE, M.; OLIVIERE, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*. v.3, n.1, p.175-182, 1993.

NEPOMUCENO, A. L.; DOSSA, D.; FARIAS, J. R. B. Biotecnologia na agricultura. Qual caminho o Brasil deve seguir? *Política Agrícola*, n. 4, p. 114-120, 2007.

PEÑALOZA, A. D. P. S. & POZZOBON, M. T. Caracterização Citogenética de Germoplasma Vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). *Recursos Genéticos Vegetais*. 1ª ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 308-342.

PETERSEN, G.; SEBERG, O.; MERETE, Y.; BERTHELSEN, K. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B and G genomes of common wheat (*Triticum*

aestivum). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 39, p. 70-82, 2006.

PIANA, C. F. B.; CARVALHO, F. I. F. Trigo. In: BARBIERI, R. L.; STUMPI, E. R. T. *Origem e evolução de plantas cultivadas*. 1ª Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 821-851.

PINTO-MAGLIO, C. A. F. Mapeamento cromossômico em espécies de café através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). *O agrônomo*. Campinas, v.. 59, n. 1, p. 66-67, 2007.

POÇAS, M. E. P. *Palinologia*. Disponível em <[http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/577/16/Cap%20I V.pdf](http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/577/16/Cap%20I%20V.pdf)>. Acesso em: 21/05/2013.

POZZOBON, M. T.; SOUZA, K. R. R.; CARVALHO, S. I. C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. *Horticultura Brasileira*. n. 2, v. 29, p. 212-216, 2011.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies*. v. 331, p. 796-805, 2008.

RAMULU, K. S.; VERHOEVEN, H. A.; DIJKHUIS, P. Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl and colchicine in potato. *Protoplasma*. n.160, p. 65-71, 1991.

REZAEI, M.; ARZANI, A.; SAYED-TABATABAEI, B. E. Meiotic behaviour of tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) and their synthetic hexaploid wheat derivatives influenced by meiotic restitution and heat stress. *Journal of Genetics*. v. 89, n. 4, p. 401-407, 2010.

RIBEIRO, M. R.; SILVA, R. C. da; PEÑALOZA, A. del P. S. de; BRAMMER, S. P.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GOEDERT, C. O.; SANTOS, S. dos; OLIVEIRA, A. R. S. da; POZZOBON, M. T. *Análise citogenética em genótipos de trigo armazenados a longo e médio prazo*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Brasília, 2010. Disponível em:

<<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/2010/bpd/bpd287.pdf>>.

Acesso em: 27 de dezembro de 2012.

ROSA, P. S.; CÔRREA, M. G. S.; NASCIMENTO Jr, A.; BRAMMER, S. P.; VIÉGAS, J. *Análise de tétrades e grãos de pólen em triticale hexaplóide*. Disponível em: <www.ufpel.edu.br/cic/2006/resumo_expandido/CB/CB_00895.pdf> Acesso em: 10/05/2012.

SANTOS, C. Novas alternativas de testes de agrupamentos avaliadas por meio de simulação Monte Carlo. 2000. 85 p. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agropecuária), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SHU, K.; LUO, P. G.; REN, Z. L.; ZHANG, H. Y.; YAN, B. J.; ZHANG, H. Q.; ZHANG, J.; ZENG, X. The suggested strategies to use wheat core collection based on some important agronomic traits evaluation. China, *Americam Eurasian Network for Scientific Information*. v. 2, n. 3, p. 315-323, 2008.

SKOVMAND, B.; RAJARAM, S.; RIBAUT, J. M.; HEDE, A. R. Wheat genetic resources. In: CURTIS, B. C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, H. G. *Bread wheat: improvement and production*. 1^a Ed. Rome: FAO, 2002. p. 89-101.

SOUZA, C. N. A. de. *Cultivares de trigo no Brasil. IV-Cultivares de siglas CNT e Trigo BR*. Embrapa Trigo: Passo Fundo, 2002. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do17.htm>. Acesso em: 29 de dezembro de 2012.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. *Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener)*. Lavras, *Ciência e Agrotecnologia*, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

TANG, Z. X. et al. Characterization of three wheat cultivars possessing new 1BL.1RS wheat-rye translocations. *Plant Breeding*, vol. 128, p. 524-527, 2009. Disponível em:

<http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14390523.2008.01598.x/abstract>>. Acesso em: 15 de março de 2013.

TECHIO, V.H. & DAVIDE, L.C. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. *Biotemas*, v. 20, n.4, p. 7-18, 2007.

USDA. USDA Agricultural Projections to 2017. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/publications/oce081>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2012.

VASCONCELOS, E. S. de.; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; FERREIRA, A. Estratégias de amostragem e estabelecimento de coleções nucleares. Brasília, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 4, p. 507-514, 2007.

ZANOTTO, M.; BRAMMER, S. P.; JUNIOR, A. N.; SCAGLIUSI, S. M. Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de triticale. Lavras, *Ciência e Agrotecnologia*, v. 33, p. 2078-2082, 2009.