

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

CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E
POSTULAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À
FERRUGEM DO COLMO EM GENÓTIPOS DE
TRIGO PARCIALMENTE RESISTENTES À
FERRUGEM DA FOLHA

ALICE CASASSOLA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, março de 2012.

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

CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E
POSTULAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À
FERRUGEM DO COLMO EM GENÓTIPOS DE
TRIGO PARCIALMENTE RESISTENTES À
FERRUGEM DA FOLHA

ALICE CASASSOLA

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Patussi Brammer

Coorientadora: Dra. Márcia Soares Chaves

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, março de 2012.



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.


“Caracterização agrônômica e postulação de genes de resistência à ferrugem do colmo em genótipos de trigo parcialmente resistentes à ferrugem da folha”

Elaborada por

ALICE CASASSOLA

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

Aprovada em: 05/03/2012
Pela Comissão Examinadora


Dra. Sandra Patussi Brammer
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


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


Dra. Márcia Soares Chaves
Embrapa Trigo
Co-orientadora


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dr. Paulo Roberto da Silva
Unicentro


Dra. Magali Ferrari Grando
FAMV/UPF

CIP – Catalogação na Publicação

C335c Casassola, Alice

Caracterização agronômica e postulação de genes de resistência à ferrugem do colmo em genótipos de trigo parcialmente resistentes à ferrugem da folha / Alice Casassola. – 2012.

134 f. : il. ; 25 cm.

Orientação: Prof^a. Dra. Sandra Patussi Brammer.

Coorientação: Dra. Márcia Soares Chaves.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2012.

1. Trigo – Melhoramento genético. 2. Agricultura.

3. Ferrugem. I. Brammer, Sandra Patussi, orientadora.

II. Chaves, Márcia Soares, coorientadora. III. Título.

CDU: 633.11

Catalogação: Bibliotecária Angela Saadi Machado - CRB 10/1857

DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO

À minha família...

Meus pais Fiorentino e Lourdes e minha irmã Aline:

Pela compreensão...

Pelo apoio...

Pelo amor...

Ao meu noivo Cassiano:

Pela paciência...

Pela amizade e companheirismo...

Pelo amor...

A todos que acreditaram em mim, me ensinaram e me apoiaram durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo pela oportunidade e pela concessão da bolsa de estudos;

À minha orientadora Sandra Patussi Brammer, pela confiança, pelo suporte, pelos ensinamentos e, principalmente, pela amizade;

À minha coorientadora Márcia Soares Chaves por acreditar no meu potencial, pela ajuda e compreensão durante esta caminhada;

Ao pesquisador Eduardo Caierão pelo apoio técnico e conhecimentos compartilhados;

A pesquisadora Martha Zavariz de Miranda pela colaboração nas análises de qualidade e dureza do grão;

À Dra. Paula Wiethölter pela contribuição e atenção prestadas durante a realização dos experimentos;

Aos professores do curso pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio emocional;

À todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, Valdirene Volpato, Andréa Moras, Jordalan Muniz e Adriana Favaretto, pelo companheirismo, pelo auxílio, e, principalmente, pela amizade.

A todos que se envolveram neste trabalho direta ou indiretamente.

À Deus principalmente pela saúde e pela vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	1
ABSTRACT	4
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 O trigo: histórico, características gerais e melhoramento genético.	10
2.2 Ferrugens da folha e do colmo do trigo.....	13
2.2.1 Translocação 1BL.1RS e incorporação de genes de resistência..	19
2.2.2 Marcadores moleculares: variabilidade genética e identificação gênica.....	21
 CAPÍTULO I - SIMILARIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA DE GENÓTIPOS DE TRIGO PARCIALMENTE RESISTENTES À FERRUGEM DA FOLHA	 25
RESUMO	25
ABSTRACT	28
1 INTRODUÇÃO	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 Material vegetal.....	33
2.2 Extração do DNA.....	36
2.3 Marcadores moleculares e variabilidade genética.....	36
2.4 Caracterização agronômica.....	38
2.4.1 Estatura de planta.....	39
2.4.2 Ciclo.....	39
2.4.3 Cor do grão.....	39
2.4.4 Dureza, peso e diâmetro do grão.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4 CONCLUSÕES	54
5 PERSPECTIVAS	54
 CAPÍTULO II - HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA <i>IN SITU</i> E MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES NA IDENTIFICAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO COLMO <i>Sr31</i> EM GENÓTIPOS DE TRIGO	 55
RESUMO	55
ABSTRACT	57
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAIS E MÉTODOS	62
2.1 Local.....	62

2.2	Material vegetal.....	62
2.3	Hibridização genômica <i>in situ</i> - GISH.....	63
2.3.1	Obtenção de raízes	63
2.3.2	Preparo das lâminas e pré-hibridização	63
2.3.3	Hibridização genômica <i>in situ</i> (GISH)	64
2.3.4	Montagem das lâminas e análise cromossômica.....	65
2.4	Marcadores moleculares	65
2.4.1	Extração do DNA.....	65
2.4.2	Primers e reações de PCR	66
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4	CONCLUSÕES.....	73

CAPÍTULO III – REAÇÃO EM CAMPO E POSTULAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO COLMO EM LINHAGENS DE TRIGO PARCIALMENTE RESISTENTES À FERRUGEM DA FOLHA.....

	RESUMO	75
	ABSTRACT	77
1	INTRODUÇÃO	79
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
2.1	Material.....	81
2.1.1	Material vegetal.....	81
2.1.2	Marcadores moleculares	81
2.2	Métodos	82
2.2.1	Avaliação da resistência	82
2.2.2	Postulação dos genes <i>Sr</i> via marcadores moleculares	83
2.2.2.1	Extração do DNA.....	83
2.2.2.2	Reações de PCR e migração das amostras.....	84
2.2.2.3	Determinação dos controles positivos	84
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.1	Avaliação da resistência	85
3.2	Avaliação da presença ou ausência dos genes <i>Sr</i>	87
4	CONCLUSÕES.....	97
5	PERSPECTIVAS.....	97
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela

1. Produção mundial de trigo, arroz e milho (volume em milhões de tons/ano) 12
2. Genes *Lr* de resistência à ferrugem da folha e sua localização cromossômica..... 16
3. Genes *Sr* que conferem resistência em fase de plântula ou de planta adulta à raça Ug99 de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, origem e efetividade..... 18

CAPÍTULO I

Tabela

1. Genótipos utilizados neste estudo com suas respectivas genealogias, Embrapa Trigo, 2010..... 34
2. Relação dos marcadores microsátélites utilizados neste estudo, previamente desenvolvidos para trigo, com sua localização cromossômica, Embrapa Trigo, 2010..... 37
3. Classificação de índice de dureza do grão de trigo..... 40
4. Marcadores moleculares polimórficos utilizados neste estudo com sua referida localização no genoma, número de alelos, faixa de fragmentos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) obtidos, Embrapa Trigo, 2010..... 46
5. Tabela comparativa entre os genótipos mais similares e suas respectivas genealogias, Embrapa Trigo, 2010..... 48
6. Genótipos de trigo e suas características agronômicas avaliadas, Embrapa Trigo, 2010..... 50

CAPÍTULO II

Tabela

1. Marcadores moleculares utilizados no estudo, sua respectiva sequência, fragmento esperado e temperatura de anelamento, Embrapa Trigo, 2010..... 67
2. Resultados para a presença (+) ou ausência (-) de translocações entre trigo e centeio via GISH, Embrapa

Trigo, 2010.....	68
3. Genótipos de trigo e resultados quanto à postulação de presença (+) ou ausência (-) do gene <i>Sr31</i> com a utilização dos marcadores moleculares SCM9 e J071, Embrapa Trigo, 2010.....	71
4. Genótipos de trigo e resultados quanto à postulação de presença (+) ou ausência (-) do gene <i>Sr31</i> com a utilização das técnicas de GISH e marcadores SSR, SCM9 e J071.....	73

CAPÍTULO III

Tabela

1. Marcadores moleculares para genes <i>Sr</i> e sua respectiva seqüência, Embrapa Trigo, 2011.....	82
2. Padrões para os genes <i>Sr</i> em estudo, Embrapa Trigo, 2011.....	85
3. Genótipos de trigo, sua classificação quanto à reação de resistência à ferrugem do colmo e quanto à postulação de presença (+) ou ausência (-) dos genes <i>Sr</i>	86

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura

1. A e B) Câmara de crescimento com controles de fotoperíodo apropriado para o desenvolvimento das plantas até a fase de espigamento. C e D) Plantas com nove semanas de crescimento. Embrapa Trigo, 2010..... 35
2. Marcador molecular wms186. Gel de agarose 2%. Genótipos: 1. PF030132, 2. PF960258, 3. Frontana, 4. PF970313, 5. PF010089, 6. BR23, 7. BR35, 8. Toropi, 9. IWT04019, 10. Alondra I, 11. PF030065, 12. PF001178, 13. IPF74231, 14. PF040453, 15. PF970339, 16. PF9027, 17. PF010091, 18. PF010066P, 19. PF93318, 20. PF010069, 21. IPF70872P, 22. BRS Tarumã, 23. PF970345, 24. PF030401, 25. PF003295A/B, 26. PF980414, 27. PF040488, 28. PF950351, 29. PF979002, 30. PF940266..... 42
3. Matriz de Jaccard evidenciando as similaridades entre os 30 genótipos analisados. Os números da primeira linha e primeira coluna correspondem aos genótipos. Genótipos: (1) PF 030132, (2) PF 960258, (3) Frontana, (4) PF 970313, (5) PF 010089, (6) BR 23, (7) BR 35, (8) Toropi, (9) IWT 04019, (10) Alondra I, (11) PF 030065, (12) PF 001178, (13) IPF 74231, (14) PF 040453, (15) PF 970339, (16) PF 9027, (17) PF 010091, (18) PF 010066P, (19) PF 93318, (20) PF 010069, (21) IPF 70872P, (22) BRS Tarumã, (23) PF 970345, (24) PF 030401, (25) PF 003295A/B, (26) PF 980414, (27) PF 040488, (28) PF 950351, (29) PF 979002 e (30) PF 940266..... 43
4. Dendrograma de similaridade genética obtido a partir do Coeficiente de Jaccard, para os 30 genótipos avaliados. . Genótipos: (1) PF 030132, (2) PF 960258, (3) Frontana, (4) PF 970313, (5) PF 010089, (6) BR 23, (7) BR 35, (8) Toropi, (9) IWT 04019, (10) Alondra I, (11) PF 030065, (12) PF 001178, (13) IPF 74231, (14) PF 040453, (15) PF 970339, (16) PF 9027, (17) PF 010091, (18) PF 010066P, (19) PF 93318, (20) PF 010069, (21) IPF 70872P, (22) BRS Tarumã, (23) PF 970345, (24) PF 030401, (25) PF 003295A/B, (26) PF 980414, (27) PF 040488, (28) PF 950351, (29) PF 979002 e (30) PF 940266..... 44
5. Dendrograma de similaridade genética obtido a partir do

Coefficiente de Jaccard, para os seis genótipos indicados.... 53

CAPÍTULO II

Figura

1. Hibridização genômica *in situ* (GISH) em células de trigo ($2n = 6x = 42$), genótipo BR35, usando DNA de centeio como sonda (verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos em A foram contra-corados com DAPI (azul). Em seguida os mesmos foram corados com FITC (B) e, após, foi realizada a sobreposição de A e B (C)..... 69

CAPÍTULO III

Figura

1. Frequência de patótipos amostrados no Quênia nos anos de 2007, 2008 e 2009. Total de isolados: 91. Adaptado de FAO (2010)..... 83
2. Marcador molecular csSr2, gel de agarose 2%. Banda de presença de 337pb. Ladder 50pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição)..... 88
3. Amplificação via PCR do marcador molecular Sr24#12. Os produtos foram separados em gel de agarose 2%. Ladder 50pb. A banda de 500pb é característica da presença do gene Sr24. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF

- 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição)..... 90
4. Gel de agarose 2%. Primer PSY-D1 (PSY1_DF2/R3 - P4). Bandas de presença 175pb. Ladder 50pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição)..... 92
5. Marcador molecular SECA2/SECA3. Gel de agarose 2%, banda de presença de 412pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição)..... 93
6. Marcador molecular O11B3/O11B5. Gel de agarose 2%,

- banda de presença de 636pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição)..... 94
7. Marcador molecular URIC/LN2 para identificação do cluster gênico Sr38/Yr17/Lr37. Gel de agarose 2%, ladder 50pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição)..... 96

CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E POSTULAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO COLMO EM GENÓTIPOS DE TRIGO PARCIALMENTE RESISTENTES À FERRUGEM DA FOLHA

Alice Casassola¹, Sandra Patussi Brammer², Márcia Soares Chaves³

RESUMO – Com o aumento populacional e as perdas ocasionadas por doenças nas principais culturas de importância mundial, o avanço do melhoramento genético se tornou vital. Considerando o trigo, o rendimento de grãos e a resistência às ferrugens da folha e do colmo são algumas das características com maior enfoque. Uma caracterização agronômica adequada bem como uma caracterização genotípica quanto aos genes de resistência presentes no germoplasma, fornecem informações essenciais, facilitando o trabalho do melhorista na escolha dos parentais e, conseqüentemente, diminuindo o tempo de obtenção de cultivares com resistência durável e rendimento elevado. Desta forma, este trabalho objetivou avaliar caracteres fenotípicos e caracterizar geneticamente, quanto à similaridade genética e à presença de genes de resistência à ferrugem do colmo, cultivares comerciais e linhagens desenvolvidas pelo Programa de

¹ Farmacêutica, 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).

² Orientadora, Bióloga, Professora do PPGAgro, Pesquisadora da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

³ Coorientadora, Engenheira Agrônoma, Pesquisadora da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

Melhoramento Genético de Trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Trigo. As análises moleculares foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia e as avaliações agronômicas foram realizadas em câmara de crescimento e em casa de vegetação da Embrapa Trigo. A caracterização quanto à resistência à ferrugem do colmo foi realizada previamente em campos experimentais do Kenya Agricultural Research Institute (KARI) no Quênia, África, em colaboração com Centro Internacional de Melhoramento de Trigo e Milho – CIMMYT e Embrapa Trigo. Para a caracterização agronômica e análise da variabilidade genética foram utilizados 30 genótipos. Destes, as linhagens PF 9027, PF 950351, PF 030132, PF 979002, PF 040488 e IWT 04019 apresentaram caracteres agronômicos adequados com os padrões requeridos pelo programa de Melhoramento Genético da Embrapa Trigo bem como apresentaram variabilidade genética. Os demais genótipos podem ser utilizados no melhoramento varietal, contudo necessitam de uma etapa de pré-melhoramento. Considerando as metodologias para a detecção do gene de resistência à ferrugem do colmo, *Sr31*, a utilização dos marcadores moleculares microssatélites J071 e SCM9 associados à hibridização genômica *in situ* (GISH) gerou resultados satisfatórios. Estes dados demonstram, inclusive, que a aplicação desta estratégia é viável de utilização rotineiramente no Laboratório de Biotecnologia, a qual, por sua vez, detectou a presença do gene *Sr31* em 37% do germoplasma estudado. Para a avaliação da resistência à ferrugem do colmo e postulação da presença de genes de resistência, foram utilizados 37 genótipos e 6 marcadores moleculares SSR específicos. Destes genótipos nove apresentaram resistência ou resistência

moderada e 16 foram moderadamente suscetíveis à ferrugem do colmo, representando 67,5%. Porém, dos genes identificados nenhum isoladamente foi responsável pela explicação dessa resistência, pois genes presentes em genótipos resistentes também estavam presentes em genótipos suscetíveis.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, *Puccinia graminis*, *Puccinia triticina*, resistência genética, melhoramento vegetal, biotecnologia.

**AGRONOMIC CHARACTERIZATION AND POSTULATION
OF STEM RUST RESISTANCE GENES IN WHEAT
GENOTYPES PARTIALLY RESISTANT TO LEAF RUST**

**Alice Casassola¹, Sandra Patussi Brammer², Márcia Soares
Chaves³**

ABSTRACT – With the increasing of the population and the losses caused by diseases in major crops of global importance, the advancement of the genetic breeding has become vital. Considering the wheat, grain yield and resistance to leaf and stem rust are some characteristics with greater focus. Appropriate agronomic characterization and genotypic characterization of resistance genes present in the germplasm, provide essential information, facilitating the work of the breeders in the choice of parental and, consequently, reducing the time of obtaining cultivars with durable resistance and high yield. Thus, this study aimed to evaluate phenotypically and to characterize genetically, for the genetic similarity and presence of resistance genes to stem rust, cultivars and lines developed by the program for genetic improvement of wheat from the Brazilian Agricultural Research Corporation - Embrapa Wheat. The molecular analyzes were conducted at the Laboratory of Biotechnology and the

¹ Pharmaceutical, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine (PPGAgro) – University of Passo Fundo.

² Advisor, Biologist, faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo. Researcher at Embrapa Wheat.

³ Co-advisor, Agronomist, researcher at Embrapa Wheat.

agronomic evaluations were conducted in a growth chamber and greenhouse at Embrapa Trigo. The characterization for resistance to stem rust had been carried out in experimental fields of the Kenya Agricultural Research Institute (KARI) in Kenya, Africa, in collaboration with the International Center for Maize and Wheat Improvement - CIMMYT and Embrapa Wheat. Thirty genotypes were used for the agronomic characterization and analysis of genetic similarity. Of these, the lines PF 9027, PF 950351, PF 030132, PF 979002, PF 040488 and IWT 04019 showed agronomic traits suitable to the standards required by the breeding program of the Embrapa Wheat and presented genetic variability. The other genotypes may be used in varietal improvement, but require a pre-breeding stage. Considering the methodologies for detecting the resistance gene to stem rust, *Sr31*, the use of the J071 and SCM9 microsatellite markers associated with genomic hybridization in situ (GISH) gave satisfactory results. These data also showed that the implementation of this strategy is feasible to use routinely in the Biotechnology Laboratory, which, in turn, detected the presence of the gene *Sr31* in 37% of the germplasm studied. Thirty seven genotypes were evaluated to resistance to stem rust and postulation of stem rust resistance genes. Six specific *Sr* genes molecular markers were used for the postulation. Of these genotypes, nine were resistant or moderately resistant to stem rust and 16 were moderately susceptible, representing 67.5% of the total. However, none of the genes identified was totally responsible to explain the resistance, since effective genes present in resistant genotypes were also present in susceptible ones.

Key words: *Triticum aestivum*, *Puccinia graminis*, *Puccinia triticina*, genetic resistance, vegetal breeding, biotechnology.

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma das culturas de importância mundial juntamente com o milho e o arroz. A produção deste cereal na safra 2011/2012 está projetada para 692,88 milhões de toneladas (USDA, 2012). O Brasil não é um dos principais países produtores tanto por questões econômicas quanto pelo clima favorável ao desenvolvimento de doenças (BACALTCHUK et al., 2006).

Diversas são as doenças que atacam esta cultura, contudo dentre as que mais se destacam no sul do Brasil atualmente estão as ferrugens. A ferrugem da folha tem potencial de destruição elevado quando associada ao uso de cultivares suscetíveis e as condições climáticas do sul do Brasil são propícias ao seu desenvolvimento. O uso de cultivares parcialmente resistentes, bem como a existência de diversos genes de resistência efetivos que foram incorporados às cultivares suscetíveis tem contido a doença (BRAMMER et al., 2001; CHAVES & BARCELLOS, 2006; SANTANA & CHAVES, 2009).

A ferrugem do colmo, por sua vez, é uma doença muito destrutiva, porém no Brasil, ela foi controlada pelo uso de cultivares resistentes. O surgimento de uma nova raça deste fungo no leste africano, conhecida como Ug99, tem sido motivo de grande preocupação, pois vem suplantando a resistência conferida por diversos genes, se constituindo num risco a triticultura mundial (PRETORIUS et al., 2000; JIN et al., 2008b; BARCELLOS, 2011).

Assim, o melhoramento genético de trigo tem buscado, além do aumento no rendimento de grãos, também a resistência às ferrugens. Genótipos que possuam caracteres agronômicos desejáveis

e genes de resistência às ferrugens da folha e do colmo são considerados de extremo valor. Estes genótipos podem ser utilizados diretamente no melhoramento varietal como fontes de genes agronomicamente interessantes que, por sua vez, podem ser transferidos utilizando-se técnicas convencionais de melhoramento ou ferramentas biotecnológicas (BRAMMER et al., 2000; BRAMMER et al., 2001; ALMEIDA et al., 2007).

A biotecnologia, por sua vez, vem auxiliar os programas de melhoramento, fornecendo informações e tecnologias que visam aperfeiçoar e acelerar estes programas (BRAMMER, 2000). A identificação e mapeamento de genes no genoma do trigo é uma estratégia biotecnológica que fornece informações importantes quanto ao tipo de resistência envolvida. A principal técnica utilizada para essa identificação são os marcadores moleculares. Existem diversos tipos de marcadores com finalidades distintas. Esta tecnologia associada com o melhoramento genético clássico torna um programa de melhoramento mais eficaz e eficiente (MILACH, 1998). Assim este trabalho busca contribuir na identificação de genótipos úteis ao programa de melhoramento genético de trigo da Embrapa, fornecendo informações relevantes sobre resistência à ferrugem do colmo do trigo e outros caracteres agronômicos de interesse, visando o desenvolvimento de genótipos mais produtivos e resistentes às ferrugens que possam, por sua vez, melhorar o sistema agrícola sul-brasileiro.

O presente trabalho teve como objetivo geral gerar informações relevantes sobre a resistência à ferrugem do colmo do trigo e determinar alguns caracteres agronômicos de cultivares

comerciais e linhagens desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Trigo da Embrapa. Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar caracteres agronômicos (estatura de planta, ciclo e características de grão) de linhagens de trigo parcialmente resistentes à ferrugem da folha;
- b) Avaliar a variabilidade genética de linhagens de trigo parcialmente resistentes à ferrugem da folha;
- c) Identificar genótipos de trigo promissores para serem utilizados nos programas de melhoramento genético de trigo da Embrapa;
- d) Identificar em genótipos de trigo a presença do gene de resistência à ferrugem do colmo *Sr31*, a partir de análises citomoleculares;
- e) Detectar a presença de genes de resistência à ferrugem do colmo em genótipos de trigo, previamente caracterizados quanto à reação em condições de campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O trigo: histórico, características gerais e melhoramento genético

O trigo é uma cultura de importância econômica e, por isso, considerada uma commodity agrícola. Muitos alimentos são produzidos diretamente ou possuem componentes derivados deste cereal. Duas espécies de trigo têm importância econômica: o trigo comum ou para pão, *Triticum aestivum* L., e o trigo duro ou para macarrão, *Triticum turgidum* var. *durum* (CUNHA, 2009).

Estudos comprovam que o trigo faz parte da alimentação humana desde 28 mil anos a.C., sendo que as primeiras espécies cultivadas de *T. monoccocum*, estão datadas de 8.000 a 7.500 anos a.C. na Síria. O trigo hexaploide, espécie mais cultivada atualmente, tem seu cultivo datado de 7.000 a.C. (BARBIERI, 2008). Na América do Sul, o trigo foi introduzido por Martim Afonso de Souza somente em 1534 (SOUZA & ROSA, 1985).

Conforme Barbieri (2008) o grão de trigo contém em média 60 a 80% de carboidratos, 1,5 a 2% de gorduras, 1,5 a 2,0% de vitaminas do complexo B, E e minerais e 8 a 15% de proteínas, das quais as gliadinas e gluteninas são as principais envolvidas na qualidade da panificação. Na moagem do trigo, por sua vez, obtém-se aproximadamente 76% de farinha, 23% de farelo e 1% de perdas (ABITRIGO, 2010).

O Brasil não figura entre os principais países produtores de trigo, sendo que a participação brasileira no total da produção mundial costuma variar entre 0,5 a 1%. A safra nacional 2011/2012

deste cereal somente alcançou 5,788 milhões de toneladas, ou seja, menos de um por cento da projeção mundial. Os Estados que apresentaram crescimento na área plantada em relação a safra 2010/2011 foram apenas Minas Gerais (2,2%), Distrito Federal (11,6%), São Paulo (6,1%) e Rio Grande do Sul (17,6%). No Rio Grande do Sul, a área plantada cresceu 17,6% (932,4 mil hectares) e a produção avançou 38,9% (2,742 milhões de toneladas) (CONAB, 2012).

A importação de trigo brasileira é elevada, sendo a produção nacional muito inferior a demanda interna. Isto porque o trigo continua enfrentando problemas na produção, comercialização e em sua viabilidade econômica (CUNHA, 2009). A baixa produção se deve a vários fatores dentre eles estão os altos custos de produção e dificuldades de comercialização do trigo nacional decorrentes da facilidade de importação do trigo do exterior. Além disso, a desvinculação do mercado brasileiro em relação ao preço internacional, a renda bruta total variável, a falta de diferenciação de insumos e produtos, altas taxas de impostos que onera seu produto final bem como a falta de condições financeiras para adotar tecnologias, ocasionaram uma forte redução na oferta local pela redução na área plantada e diminuição dos investimentos em tecnologia por parte do pequeno produtor (BRUM & MÜLLER, 2008; CUNHA, 2009).

Com o aumento populacional, o trigo, o arroz e o milho são as culturas estratégicas para a segurança alimentar mundial. Dentre estas, o trigo é a de maior importância econômica em termos de volume de produção, conforme mostra a Tabela 1 (USDA, 2010).

Tabela 1 – Produção mundial de trigo, arroz e milho (volume em milhões de tons/ano)

Cultura	Ano	
	2008/2009	2009/2010
Trigo	682.654	678.007
Arroz	447.422	440.278
Milho	794.522	803.687

Fonte: USDA (2010).

O homem primitivo utilizava em torno de 3.000 espécies para a sua alimentação. Hoje, utiliza em torno de 300 espécies das quais a maioria representam o arroz, trigo, milho, sorgo, cevada, cana-de-açúcar, beterraba, batata, batata-doce, mandioca, feijão, soja, amendoim, coco e banana. O processo de domesticação das espécies pode ser considerado o princípio do melhoramento genético vegetal, pois o homem selecionava somente as plantas com características de interesse. Com este processo de seleção, o genoma das espécies cultivadas apresenta pouca variabilidade genética, e com a evolução das doenças e o aumento populacional, a busca por novos genes tornou-se fundamental (BARBIERI, 2008).

O *T. aestivum* L. em Thell é uma espécie hexaploide, genoma AABBDD, ($2n=6x=42$), contudo, há também trigos diplóides e tetraplóides como, por exemplo, *T. monococcum* L. ($2n=2x=14$, AA) e *T. turgidum* L. ($2n=4x=28$, AABB), respectivamente (CUNHA, 2009). A presença de três genomas completos de espécies diplóides distintas (AABBDD) torna o genoma de *T. aestivum* complexo. Desse

modo, muitos genes apresentam herança polissômica, tornando mais complexos os padrões de segregação mendeliana e dificultando as análises genéticas (MORAES-FERNANDES, 1982). Contudo, a poliploidia natural confere ao trigo características que facilitam a incorporação de genes de espécies próximas tais como *Triticum turgidum*, *T. monococcum*, *Thinopyrum ponticum*, *Agropyron elongatum*, *Secale cereale* e outros (GERECHTER-AMITAI et al., 1971; RAJARAM et al., 1988; THE et al., 1992; FRIEBE et al., 1994; FEDERIZZI et al., 1999; PRETORIUS et al., 2000).

O melhoramento genético foi e é decisivo na expansão da cultura do trigo. A utilização de variedades mais produtivas, mais tolerantes a estresses e adaptadas é uma estratégia efetiva e viável (BRAMMER, 2000). Este processo pode ser realizado de duas maneiras: a tradicional ou a aliada a biotecnologia. O melhoramento convencional ou tradicional utiliza-se das características observadas em campo, como rendimento e resistência, no momento de selecionar os genótipos a serem utilizados nos cruzamentos. Já com o advento da biotecnologia, a escolha dos parentais pode ser realizada com base no genótipo, encurtando o tempo de seleção e acelerando o processo de obtenção de novas cultivares (MILACH, 1998).

2.2 Ferrugens da folha e do colmo em trigo

A ferrugem da folha do trigo, causada pelo fungo *Puccinia triticina* Erikss & Henn, é uma das doenças que mais têm contribuído para a limitação da produtividade da cultura. Esta doença causa redução na área fotossintética da planta, causando perdas que podem superar 50% (BACALTCHUK et al., 2006). Os propágulos do

patógeno são disseminados pelo vento, sendo que a distribuição da doença ocorre de forma generalizada na lavoura (KOLMER, 2005).

O fungo *P. triticina* é um parasita obrigatório que apresenta alta especialização fisiológica (CHAVES & BARCELLOS, 2006). Ele coloniza a região intracelular dos tecidos vegetais, produzindo haustórios, que retiram nutrientes diretamente da célula viva. Essa retirada de nutrientes juntamente com a redução da área fotossintetizante foliar e aumento na taxa de respiração e transpiração são os principais processos responsáveis pelas perdas na produtividade (SIMONS, 1985; BRAMMER et al., 2010).

A ferrugem do colmo do trigo, por sua vez, tem como agente etiológico o fungo *P. graminis* f. sp. *tritici* Eriks & Henn. Essa doença deixou de ser epidêmica no Brasil, pois foi controlada por cultivares resistentes, não sendo mais detectada em níveis epidêmicos por mais de duas décadas (BARCELLOS, 2011).

Entretanto, o surgimento da raça Ug99 (TTKSK) de *P. graminis* descoberta na Uganda em 1999 deixou a comunidade científica internacional em alerta, pois esta raça apresenta virulência ao gene *Sr31* um gene presente em grande proporção do germoplasma mundial de trigo (PRETORIUS et al., 2000). A raça Ug99 é uma das mais virulentas já detectadas e o risco de sua disseminação para outras regiões tem sido motivo de grande preocupação. Devido a estes fatores, o programa “Borlaug Global Rust Initiative” está trabalhando em estratégias para tentar reduzir a possibilidade de epidemias. Dentre elas está o monitoramento da raça Ug99, a busca de variedades e germoplasmas resistentes, a distribuição de genótipos resistentes para uso direto, e desenvolvimento de linhagens melhoradas visando à

introdução de genes de resistência no germoplasma mundial. O atual cenário reforça a necessidade do desenvolvimento e identificação de linhagens e genes de resistência, visando à contenção desta doença a nível mundial.

A resistência às ferrugens da folha e do colmo do trigo é condicionada por genes de resistência conhecidos como *Lr* (do inglês *Leaf rust*), para ferrugem da folha e *Sr* (do inglês *Stem rust*) para ferrugem do colmo. Atualmente existe virulência conhecida para a maioria dos genes *Lr* conhecidos (SINGH et al., 2002) (Tabela 2), portanto a resistência parcial, que se expressa na fase de planta adulta – conhecida como resistência de planta adulta (RPA) – é a opção mais promissora para o controle da ferrugem da folha (CHAVES, 2005). Dos genes *Lr* que condicionam RPA à ferrugem da folha do trigo pode-se citar o *Lr12*, *Lr13* (DYCK et al., 1966), *Lr22a* (ROWLAND, 1974), *Lr22b* (DYCK, 1979), *Lr34* (DYCK, 1987), *Lr46* (SINGH et al., 1998), *Lr35* (KERBER & DYCK, 1990) e, em associação com *Lr34*, os genes *Lr48* e *Lr49* (SAINI et al., 2002). Outros genes com designação temporária também condicionam resistência de planta adulta à ferrugem da folha do trigo, como por exemplo, *I*, *J*, *K*, *L*, *M*, *N* e *O* (SHIWANI & SAINI, 1994), *LrAPR* (KLOPPERS & PRETORIUS, 1996) e *Trp-1* e *Trp-2* (BARCELLOS et al., 2000).

Tabela 2 – Genes *Lr* de resistência à ferrugem da folha e sua localização cromossômica

Gene	Localização	Gene	Localização	Gene	Localização	Gene	Localização
<i>Lr1</i>	5DL	<i>Lr16</i>	2BS	<i>Lr30</i>	4BL	<i>Lr45</i>	2AS
<i>Lr2a</i>	2DS	<i>Lr17</i>	2AS	<i>Lr31</i>	4BS	<i>Lr46</i>	1BL
<i>Lr2b</i>	2DS	<i>Lr18</i>	5BL	<i>Lr32</i>	3D	<i>Lr47</i>	7AS
<i>Lr2c</i>	2DS	<i>Lr19</i>	7DL	<i>Lr33</i>	1BL	<i>Lr48</i>	2BS
<i>Lr3a</i>	6BL	<i>Lr20</i>	7AL	<i>Lr34</i>	7D	<i>Lr49</i>	4BL
<i>Lr3bg</i>	6BL	<i>Lr21</i>	1DL	<i>Lr35</i>	2B	<i>Lr59</i>	1A
<i>Lr3ka</i>	6BL	<i>Lr22a</i>	2DS	<i>Lr36</i>	6BS	<i>Lr60</i>	1D
<i>Lr9</i>	6BL	<i>Lr22b</i>	2DS	<i>Lr37</i>	2AS	<i>Lr61</i>	6B
<i>Lr10</i>	1AS	<i>Lr23</i>	2BS	<i>Lr38</i>	2AL	<i>Lr62</i>	6A
<i>Lr11</i>	2A	<i>Lr24</i>	2DL	<i>Lr39</i>	2DS	<i>Lr63</i>	3AS
<i>Lr12</i>	4BS	<i>Lr25</i>	4BL	<i>Lr40</i>	1D	<i>Lr64</i>	6A
<i>Lr13</i>	2BS	<i>Lr26</i>	1BL	<i>Lr41</i>	1D	<i>Lr66</i>	3A
<i>Lr14a</i>	7BL	<i>Lr27</i>	3BS	<i>Lr42</i>	1D		
<i>Lr14b</i>	7BL	<i>Lr28</i>	4AL	<i>Lr43</i>	7D		
<i>Lr15</i>	2DS	<i>Lr29</i>	7DS	<i>Lr44</i>	1BL		

Fonte: McIntosh (2009).

Segundo o sistema norte americano de nomenclatura de raças de *P. graminis tritici* descrito por Roelfs & Martens (1988), as novas raças de ferrugem do colmo chamadas “linhagem Ug99” são designadas com código de letras TTKSF, TTKSK, TTKSP, TTKST e TTTSK. Estas raças já estão presentes no leste da África (Etiópia, Quênia, Sudão e Eritreia), Vale do Rio Nilo e Vermelho (Iêmen, Egito e Arábia Saudita), e já está ameaçando outras regiões como o norte da África, meio oeste e Ásia (Índia, Paquistão, Marrocos, Tunísia,

Algéria, Turquia, Síria, Kazaquistão, Uzbequistão, e Azerbaijão) (YAHYAOUI et al., 2008).

Em relação aos genes de resistência à ferrugem do colmo, a atual preocupação é com a virulência da raça Ug99 ao gene *Sr31*. Duas variantes da raça Ug99 foram detectadas no Quênia e apresentam virulência aos genes *Sr24* e *Sr36*, confirmando a alta taxa de evolução deste fungo (JIN & SZABO, 2008; JIN et al., 2008; JIN et al., 2009). Além desses genes, a raça Ug99 já apresenta virulência ao *Sr38*, o qual está presente em diversas cultivares de trigo cultivadas na Europa e Austrália (JIN et al., 2007).

Segundo a teoria gene-a-gene proposta por Flor (1956) a resistência é o resultado da interação entre os produtos gênicos da planta e do patógeno. Sendo assim, cultivares portadoras de genes vulneráveis *Sr24*, *Sr31*, *Sr36* e *Sr38* podem apresentar resistência à raça Ug99 de ferrugem do colmo se forem portadoras de genes ainda efetivos (Tabela 3). Além disso, a associação de genes e/ou a presença de genes menores podem influenciar na reação de resistência (JIN et al., 2008).

Tabela 3 – Genes *Sr* que conferem resistência em fase de plântula ou de planta adulta à raça Ug99 de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, origem e efetividade

Origem do Gene	Genes <i>Sr</i>	
	Inefetivos	Efetivos
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Sr5, Sr6, Sr7a, Sr7b, Sr8a, Sr8b, Sr9a, Sr9b, Sr9f, Sr10, Sr15, Sr16, Sr18, Sr19, Sr20, Sr23, Sr30, Sr41, Sr42, SrWld-1</i>	<i>Sr28¹, Sr29², SrTmp1</i>
<i>Triticum turgidum</i>	<i>Sr9d, Sr9e, Sr9g, Sr11, Sr12, Sr17</i>	<i>Sr2², Sr13^{1,2}, Sr14¹</i>
<i>Triticum monococcum</i>	<i>Sr21</i>	<i>Sr22, Sr35</i>
<i>Triticum timopheevi</i>		<i>Sr36¹, Sr37</i>
<i>Triticum speltoides</i>		<i>Sr32, Sr39</i>
<i>Triticum tauschii</i>		<i>Sr33², Sr45</i>
<i>Triticum comosum</i>	<i>Sr34</i>	
<i>Triticum ventricosum</i>	<i>Sr38</i>	
<i>Triticum araraticum</i>		<i>Sr40</i>
<i>Thinopyrum elongatum</i>		<i>Sr24¹, Sr25, Sr26, Sr43</i>
<i>Thinopyrum intermedium</i>		<i>Sr44</i>
<i>Secale cereale</i>	<i>Sr31</i>	<i>Sr27¹, Sr1A.1R¹, SrR</i>

¹ Virulência por outras raças conhecida; ² Nível de resistência conferida em campo não é suficiente.

Fonte: FAO (2008).

2.2.1 Translocação 1BL.1RS e incorporação de genes de resistência

Translocações são trocas de segmentos cromossômicos que podem ocorrer dentro de uma mesma espécie ou entre espécies diferentes que podem ser utilizadas para transferir genes de interesse de uma espécie à outra. Dentre as translocações em trigo, as que envolvem o centeio são muito importantes, pois vários genes do centeio foram introgrididos no trigo com sucesso (CASASSOLA & BRAMMER, 2011).

A translocação 1BL.1RS, que envolve o braço longo do cromossomo 1B do trigo e o braço curto do cromossomo 1R do centeio, carrega vários genes de resistência presentes nesta espécie, tais como o gene *SrR*, *Sr31*, *Lr26* e *Yr9*. Essa translocação foi utilizada em programas de melhoramento ao redor do mundo por conferir resistência à ferrugem do colmo e mais de 300 cultivares conhecidas carregam essa alteração (RABINOVICH, 1998; SCHLEGEL & KORZUN, 1997).

Apesar disso, esta translocação afeta a qualidade de panificação. As gliadinas e gluteninas são proteínas componentes do glúten e são as responsáveis pela solubilidade da farinha em soluções salinas e pela força e extensibilidade da massa. As gluteninas de alto e baixo peso molecular são codificadas por genes do loco *Glu-1* os quais estão localizados nos cromossomos 1A, 1B e 1D do trigo (PAYNE et al., 1984; BRAMMER, 2001). A qualidade tecnológica de panificação do trigo é determinada pela fração das proteínas do grão que formarão o glúten, a qual, por sua vez, é influenciada pelos alelos dos locos que codificam essas proteínas (PAYNE et al., 1984;

CALDEIRA et al., 2000). Sendo assim a translocação 1BL.1RS ocasiona a perda do gene *Glu-1B* localizado no braço longo do cromossomo 1B do trigo ao mesmo tempo que transfere genes que codificam as secalinas, diminuindo a qualidade da farinha e, conseqüentemente, de panificação (CARVER & RAYBURN, 1995; GRAYBOSCH, 2001).

O gene *Sr31* de resistência à ferrugem do colmo é um dos genes transferidos a partir da translocação 1BL.1RS. Esta translocação está presente em alta proporção do germoplasma regional e mundial e muitas cultivares possuem sua resistência baseada neste gene. Contudo, essa resistência já foi superada por diversas raças de *P. graminis*, inclusive a Ug99, constituindo-se numa ameaça a triticultura brasileira. Por este motivo, verifica-se a necessidade de se detectar previamente a presença deste segmento cromossômico (BARCELLOS & ARDUIM, 2009), pois nem sempre é possível testar genótipos brasileiros de trigo em regiões com alta pressão de inóculo, como os países africanos Quênia, Uganda e Etiópia.

A identificação desta translocação pode ser feita através de técnicas biotecnológicas como hibridização *in situ* bem como com o uso de marcadores moleculares (SCHUBERT et al., 2001; NASS, 2007; SEPSI et al., 2009; AYALA-NAVARRETE et al., 2007; ANGELOVA & GEORGIEV, 2006; SEPSI et al., 2008). A hibridização *in situ* permite a identificação via sonda fluorescente de segmentos cromossômicos e genes. Esta metodologia vem sendo utilizada na detecção de cromatina introgridida em diversas espécies animais e vegetais, e utiliza seqüências de DNA marcadas (sondas) que ao entrarem em contato com sua seqüência complementar,

hibridizam e emitem fluorescência, detectando o segmento de interesse (SPEICHER et al., 1990; PRIOLI et al., 2002; GUAN et al., 2008; QI et al., 2008; CHANDNA et al., 2010).

Existem dois tipos de HIS, a genômica (GISH – “Genomic *In Situ* Hybridization”) que utiliza como sonda o DNA inteiro de uma espécie, e a FISH (“Fluorescent *In Situ* Hybridization”) que utiliza como sonda sequências específicas de DNA tais como genes e braços cromossômicos (RAINA & RANI, 2001).

2.2.2 Marcadores Moleculares: variabilidade genética e identificação gênica

Marcadores moleculares são marcas utilizadas no estudo da evolução, genética, estabilidade cariotípica, detecção da variabilidade genética, identificação e localização de genes, mapeamento de locos de resistência, estudos de filogenia, transgenia e outros (MILACH, 1998; BRAMMER et al., 2007).

Existem diversos tipos de marcadores que podem ser fenotípicos, no qual características visuais de fácil identificação servem como marcas da presença ou ausência de um caractere de interesse (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996) como, por exemplo, a “pseudo-black chaff”, que constitui uma marca da presença do gene *Sr2* em trigo (WELLINGS et al., 2008), ou a necrose da ponta da folha, a qual marca a presença do gene *Lr34* (SOUSA & BARCELLOS, 1999); ou de DNA, onde uma sequência de DNA serve como marca de variabilidade, presença ou ausência de um gene ou característica de interesse (NASS, 2007).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, a utilização de marcadores de DNA vem aumentando consideravelmente, contribuindo para os estudos genéticos tradicionais (SERAFINI et al., 2002). Regitano (2001) relata que os marcadores genéticos apresentam herança mendeliana simples, possibilitando a inferência do fenótipo a partir do genótipo, determinando o potencial genético com mais rapidez. Contudo, a análise da segregação necessita da presença de pelo menos duas formas alélicas, ou seja, da existência de polimorfismo nos locos do marcador.

Vários são os tipos de marcadores moleculares de DNA que vem sendo empregados atualmente em programas de melhoramento genético. Os marcadores moleculares microsátélites ou SSR (“simple sequence repeat”) são marcas de DNA que consistem de sequências de três a quatro nucleotídeos (“sequence motif”), repetidas em tandem, que podem ser utilizados nos estudos de parentesco e construção de mapas genéticos de alta precisão (LIU et al., 2007; CHANDNA et al., 2010) e no mapeamento genético e físico de genomas, pois estes podem estar ligados a genes de interesse detectando sua presença ou ausência (MAGO et al, 2009, 2011). Estes podem ser utilizados, inclusive, na determinação da frequência de fenômenos migratórios, no fluxo de genes, no afinamento demográfico, na redução do tamanho efetivo de uma população, na diagnose de hibridismo e aplicações forenses (CAMINHAS et al., 1992).

Os marcadores SSR possuem expressão co-dominante, multialelismo, permitindo diferenciar homocigotos de heterocigotos,

elevado conteúdo de informação de polimorfismo – PIC (“Polymorphism Information Content”), são frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo uma “completa cobertura do genoma”. Este loco altamente polimórfico, amplificado via PCR (“Polymerase Chain Reaction”) foi também denominado de “STMS- Sequence Tagged Microsatellite Sites”, ou seja, sítios de microssatélites marcados por sequência, e constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis hoje (ZHANG & HOU, 2004; TORADA et al., 2006; HONG et al., 2010).

Para a determinação da variabilidade genética de uma população, os marcadores moleculares SSR devem apresentar, portanto, polimorfismo e abranger grande parte do genoma da espécie analisada. O número de marcadores a ser utilizado depende do tipo de marcador, das regiões do genoma amostradas pelo marcador, do tamanho do genoma, do grau de polimorfismo existente entre as amostras e do próprio grau de relacionamento genético intrínseco daquele conjunto de amostras. Cabe na etapa de avaliação unir a máxima variabilidade possível no menor número de acessos (NASS, 2007). Entretanto, para se determinar a presença ou ausência de um gene é possível se utilizar um único marcador por gene dependendo de sua acurácia e da proximidade do marcador com o gene de interesse. Avaliar as características do marcador a ser utilizado deve ser uma etapa prévia a sua utilização, para que se possa ter confiabilidade nos resultados obtidos (MAGO et al., 2011).

A seleção baseada no genótipo é conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares, a qual utiliza marcadores de DNA para a escolha dos parentais. Esta associação (SSR +

melhoramento) tem sido efetivamente aplicada em diversas espécies podendo ser utilizada com confiabilidade e precisão, desde que avaliada e desenvolvida adequadamente, bem como aplicada sob as limitações pertinentes (MONIS & ANDREWS, 1998; MONIS, 1999). Coutinho & Regitano (2001) afirmaram, inclusive, que o desenvolvimento destes marcadores é de fundamental importância, pois eles são ferramentas que potencializam o processo de seleção e o seu desenvolvimento e aplicação nos programas de melhoramento genético podem determinar o êxito de um projeto de pesquisa neste mercado altamente competitivo. Este tipo de seleção vem sendo aplicada em diversas culturas como arroz (NOBUYUKI et al., 2000), milho (MICHELMORE et al., 1991) e trigo, inclusive na seleção assistida para doenças como as ferrugens (ŠLIKOVÁ et al., 2003; GUPTA et al., 2005; BARIANA et al., 2007; VIDA et al., 2009).

Tendo em vista a necessidade de genótipos potencialmente úteis para serem utilizados no programa de melhoramento genético de trigo da Embrapa, bem como da diversidade de técnicas biotecnológicas disponíveis, o presente trabalho buscou avaliar fenotipicamente e genotipicamente, via marcadores citogenéticos e moleculares, diferentes genótipos de trigo, visando auxiliar no processo de seleção de parentais e, conseqüentemente, na obtenção de cultivares mais produtivas e com resistência durável às ferrugens da folha e do colmo.

CAPÍTULO I

SIMILARIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA DE GENÓTIPOS DE TRIGO PARCIALMENTE RESISTENTES À FERRUGEM DA FOLHA

Alice Casassola¹, Sandra Patussi Brammer², Márcia Soares Chaves³, Eduardo Caierão⁴, Paula Wiethölter⁵

RESUMO – O trigo é uma cultura de grande expressão mundial. O melhoramento genético tem sido essencial para incrementar a produtividade de grãos e aumentar a resistência a estresses bióticos e abióticos deste cereal. A variabilidade genética é um pré-requisito nos programas de melhoramento, pois permite explorar o potencial produtivo do trigo e aumentar as combinações gênicas, que, por sua vez, aumentam as possibilidades de acréscimo de rendimento de grãos e de obtenção de cultivares com resistência durável a doenças. Visando identificar linhagens e cultivares com potencial para serem utilizadas nos programas de melhoramento genético da Embrapa Trigo, o objetivo deste trabalho foi estimar a similaridade genética e

¹ Farmacêutica, 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).

² Orientadora, Bióloga, Professora do PPGAgro, Pesquisadora da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

³ Coorientadora, Engenheira Agrônoma, Pesquisadora da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

⁴ Colaborador, Engenheiro Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

⁵ Colaboradora, Bióloga, bolsista de pós-doutorado/CNPq da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

caracterizar agronomicamente genótipos de trigo com resistência parcial à ferrugem da folha. As análises foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia e nas casas de vegetação da Embrapa Trigo em Passo Fundo/RS. Os 30 genótipos utilizados foram selecionados por apresentarem, consistentemente, resistência parcial à ferrugem da folha durante oito anos de avaliações em campo. Para a extração do DNA utilizaram-se folhas de plântulas germinadas em papel Germitest e para a avaliação de estatura de planta, ciclo e características de grão: cor, dureza, peso e diâmetro, as plântulas foram transplantadas para baldes e mantidas em câmaras de crescimento até a fase de espigamento. A similaridade genética do material foi determinada utilizando 97 marcadores moleculares microsatélites, dos quais, após amplificação via PCR e migração em gel de agarose 2%, foram selecionados somente os que apresentaram polimorfismo. A similaridade genética entre os diferentes acessos foi estimada pelo coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento utilizado foi o UPGMA. A variabilidade genética do material analisado foi elevada com coeficiente médio de similaridade de 58,9%. Considerando os atributos agrônômicos e variabilidade, as linhagens PF 9027, PF 950351, PF 030132, PF 979002, PF 040488 e IWT 04019 foram as que mostraram melhor desempenho agrônômico, além de variabilidade genética, podendo ser utilizadas nos programas de melhoramento genético com ênfase à incorporação de genes de resistência durável. As demais linhagens/cultivares podem ser utilizadas como fonte para genes de resistência à ferrugem da folha, contudo por apresentarem atributos agrônômicos mais distantes do ideotipo de planta empregada nos dias atuais, para sua utilização como

parental, necessitam de melhoramento prévio (pré-melhoramento) ou de ciclos de retrocruzamento com o pai recorrente.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* L., *Puccinia triticina*, melhoramento genético, similaridade genética, microssatélites.

GENETIC SIMILARITY AND AGRONOMIC CHARACTERIZATION OF WHEAT GENOTYPES PARTIALLY RESISTANT TO LEAF RUST

Alice Casassola¹, Sandra Patussi Brammer², Márcia Soares Chaves³, Eduardo Caierão⁴, Paula Wietholer⁵

ABSTRACT - Wheat is a very expressive crop of the world. The genetic improvement of this crop has been essential to enhance productivity and to increase resistance to biotic and abiotic stress. Genetic variability is a prerequisite for breeding programs because it allows to exploit the yield potential of wheat and increase the genetic combinations, which, in turn, increase the possibilities of increased grain yield and obtaining cultivars with durable resistance to disease. The objective of this study was to determine the genetic similarity and to characterize agronomically genotypes, strains and cultivars, with partial resistance to leaf rust, to identify its potential for use in breeding programs at Embrapa Wheat. Analyses were conducted at the Laboratory of Biotechnology and the greenhouse at Embrapa Trigo in Passo Fundo/RS. The 30 genotypes used were selected because they demonstrated consistently partial resistance to leaf rust

¹ Pharmaceutical, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine (PPGAgro) – University of Passo Fundo.

² Advisor, Biologist, faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo. Researcher at Embrapa Wheat.

³ Co-advisor, Agronomist, researcher at Embrapa Wheat.

⁴ Collaborator, Agronomist, researcher at Embrapa Wheat.

⁵ Collaborator, Biologist, post doctoral student at Embrapa Wheat.

during eight years of field evaluations. Leaves of germinated seeds in Germitest paper were used for DNA extraction, and for analysis of plant height, cycle and grain characteristics: color, hardness, weight and diameter, seedlings were transplanted to buckets and kept in growth chambers until the silking stage. The genetic similarity of the material was determined using 97 microsatellite markers, which, after amplification by PCR and migration in agarose gel 2%, were selected only those that showed polymorphism. The genetic similarity between different accessions were estimated by the Jaccard coefficient and the clustering method used was UPGMA. The genetic variability of the material analyzed was high with coefficient of similarity of 58.9%. Considering the agronomic attributes and variability, lines PF 9027, PF 950351, PF 030132, PF 979002, PF 040488 e IWT 04019 were those that showed better agronomic performance as well genetic variability and it can be used in breeding programs with emphasis on incorporation of durable resistance genes to leaf rust. The other genotypes can be used as source for resistance genes to leaf rust, however they present agronomic traits further away from the plant ideotype used today and need a pre-breeding stage or cycles of backcrossing with the recurrent parent, in order to be used as a parental.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Puccinia triticina*, genetic breeding, genetic similarity, microsatellite.

1 INTRODUÇÃO

O melhoramento genético tem como objetivo aumentar o potencial produtivo e incorporar resistência às espécies cultivadas. O trigo é uma cultura de grande importância econômica, sendo considerada uma “commodity” agrícola. Com o aumento populacional e a alta taxa de especialização dos patógenos, em virtude da pressão de seleção, o melhoramento desta cultura tornou-se indispensável (CUNHA, 2009).

A estrutura genética das espécies é influenciada pelo ambiente em efeitos como deriva genética, seleção natural, mutação, recombinação ou migração (NASS, 2007). A domesticação do trigo e outras culturas foi exercida desde o início da agricultura e este processo de seleção constante fez com que os genótipos de espécies cultivadas de *Triticum aestivum* L. sejam muito parecidos em sua constituição (RAO & HODGKIN, 2002; BROWN, 1983; ZHANG et al., 2005a; BARBIERI, 2008). Essa similaridade, durante os cruzamentos induzidos, pode ser um fator de insucesso aos programas de melhoramento, pois destes cruzamentos se torna difícil aumentar o potencial das linhagens filhas em comparação aos parentais.

A variabilidade genética é a chave do melhoramento genético, pois fornece subsídios para as diversas etapas do programa, oferecendo informações sobre o conteúdo genético dos parentais, na chamada seleção assistida, e também no descarte de possíveis duplicatas. A caracterização desta variabilidade pode ser utilizada na construção de bancos de dados/recursos genéticos vegetais, identificando genes e/ou características interessantes que possam ser

agregadas em materiais de elite, simplificando trabalhos subsequentes e evitando desperdícios pelo uso de genótipos similares e/ou acessos em duplicata (CAO et al., 1998; FAHIMA et al., 1999; BERED et al., 2002).

O uso de marcadores moleculares é uma estratégia utilizada na caracterização de materiais, tanto na detecção da variabilidade genética quanto na identificação e manipulação de segmentos cromossômicos, tais como genes de resistência, visando controlar o caráter de interesse, e, conseqüentemente, aumentando a eficiência da seleção dos parentais (BERED et al., 2002; SERRANO et al., 2009).

Para analisar a variabilidade genética, o número de marcas moleculares a ser utilizada depende do tipo de marcador e das características intrínsecas da população avaliada (NASS, 2007). Existem diversos tipos de marcadores que podem ser utilizados com esta finalidade dentre eles se pode citar o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), o qual utiliza enzimas de restrição que clivam o DNA em fragmentos para posterior separação e análise da segregação (BOTSTEIN et al., 1980); RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), no qual marcadores moleculares distribuídos ao acaso são amplificados no genoma (WILLIAMS et al., 1990); microsátélites, no qual primers flanqueiam regiões repetitivas no genoma amplificando diferentes fragmentos (LITT & LUTY, 1989); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), no qual o DNA é clivado e os fragmentos são amplificados com primers específicos (amplificação seletiva) (VOS et al., 1995).

A ferrugem da folha do trigo é uma doença causada pelo fungo *Puccinia triticina* Erikss, e é um dos maiores motivos de perdas da triticultura no sul do Brasil, reduzindo, deste modo, a longevidade de uma determinada cultivar em nível de lavoura. Este fungo possui alta capacidade de especialização fisiológica e, por isso, o uso de cultivares com resistência de planta adulta (RPA) e/ou com piramidização de genes é a alternativa mais viável de controle deste patógeno, pois não exercem pressão de seleção (ROELFS et al., 1992; TODOROVSKA et al., 2009; WILLIAM et al., 2006). Dos genes de resistência descritos para esta doença se destacam o *Lr34* e *Lr46*, pois estes estão envolvidos com a RPA (DYCK et al., 1966; SCHNURBUSCH et al., 2004).

O presente trabalho teve como objetivo analisar a similaridade genética de 30 genótipos de trigo, parcialmente resistentes à ferrugem da folha, bem como avaliar este material quanto às suas características agronômicas, visando auxiliar o programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo na escolha dos parentais durante os cruzamentos. A identificação desta variabilidade genética entre materiais permitirá uma seleção mais rápida e precisa, auxiliando e acelerando o programa de melhoramento genético do trigo e, conseqüentemente a obtenção de cultivares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Os genótipos utilizados neste estudo (Tabela 1) fazem parte de ensaios da Embrapa Trigo de caracterização fenotípica para resistência de planta adulta à ferrugem da folha (RPA), os quais foram selecionados por apresentarem características de RPA consistentemente ao longo de oito anos de avaliações em campo (tipo de infecção suscetível e progresso lento da doença). Além destes, foram utilizadas nas avaliações agronômicas como testemunhas para estatura, ciclo e atributos do grão as cultivares BRS Umbú, BRS Guamirim e BRS 327.

Tabela 1 – Genótipos utilizados neste estudo com suas respectivas genealogias, Embrapa Trigo, 2010

Genótipo	Cruzamento	Genótipo	Cruzamento
BRS	Century/BR 35	PF 970345	PEL 73101/BRS5/PF 79777/OASIS
Tarumã		PF 940266	BR 23//CEP 19/PF 85490
Toropi	Frontana/Quadrma-A/Petitblanco	IPF 70872	C983/4/ACP//C762/FL302/3/C762 (881404-2-5)
PF 9027	BR 14/4/PF 839197//3/Londrina/COKER 76-35//F 20565/F	PF 001178	ORI/OASIS
PF 950351	BR 32/PF 869120	PF	
Frontana	Fronteira/Mentana	003295A/B	BR 23*2/PF 940382
BR 35	IAC 5*2/3/CNT 7*3/Londrina//IAC 5/Hadden	PF 010091	Hulha Negra/COKER 80.33//ORI
BR 23	CC/Alondra SIB/3//IAS 54-20/COP//CNT8	PF 030401	Century/PF 93188/PF 89156
PF 970313	Century/BR 35	PF 040488	PF 93232/LR37 (=COOK*4/VPM//)PF 940384
PF 010069	ORI/COKER 97.33//PF 92334/PF 87451	PF 970177	Embrapa 27*3/KLEIN H 3247 a 33400//Embrapa 15/TBI08
PF 030065	CEP 24/PF 64758	IWT 04019	TNNU/ATTILA
PF 030132	RUBI/COKER 80.33	PF 960258	Desconhecido
PF 979002	VEZC/762/VEZ/PF 8569/3/BR34/4/AMIGO/BR4//CTY/3/PF 869120	PF 93318	Desconhecido
PF 040453	PF 940041/BRS 179	BRS 327	CEP24Se1/BRS 194
PF 010089	ORI/OASIS	BRS Umbú	Century/BR 35
PF 010066	COKER 80.33/BRS 194	BRS	
IPF 74231	LA 8513	Guamirin	Embrapa 27/Buck Nandu/PF 93159
PF 970339	F/F//PF 87373//EMB16		
PF 980414	C 80.33//PF 869120//BR 18		

As sementes dos genótipos foram germinados em papel Germitest para, posterior, coleta de folhas das plântulas para extração de DNA. Para a caracterização agrônômica, os materiais foram germinados em papel Germitest e as plântulas foram posteriormente transferidas para baldes (cinco plantas/balde) e mantidas em câmaras de crescimento a 22°C, com 18hr de fotoperíodo (Figura 1). Após o espigamento dos genótipo, as plantas foram transferidas para casas de vegetação, visando à maturação completa dos grãos para posterior coleta e análises das características destes grãos.



Figura 1 – A e B) Câmara de crescimento com controles de fotoperíodo apropriado para o desenvolvimento das plantas até a fase de espigamento. C e D) Plantas com nove semanas de crescimento. Embrapa Trigo, 2010.

2.2 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi extraído das folhas oriundas de sementes germinadas em papel Germitest, coletadas com aproximadamente 10 cm de comprimento. O tecido foliar coletado foi pesado (300 mg) e macerado com nitrogênio líquido. A extração foi realizada utilizando tampão CTAB (700 μ L) pré-aquecido a 65 °C. As amostras foram mantidas em banho-maria por 60 min. A separação da fração contendo o DNA foi realizada com 700 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), 2 vezes, seguidas de centrifugação a 10.000 rpm. Para precipitar o DNA, utilizou-se isopropanol (500 μ L).

Após um período de incubação de, no mínimo, 30 min, o sobrenadante foi retirado e o pellet lavado com 600 μ L de etanol 70% e, em seguida, com 600 μ L de etanol 96%. Posteriormente o DNA foi ressuscitado em 100 μ L de Tris-HCl 10mM, contendo RNase (10mg/mL), incubado a 37 °C por uma hora. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso (BONATTO, 2008).

2.3 MARCADORES MOLECULARES E VARIABILIDADE GENÉTICA

Para determinação da variabilidade genética, foram selecionados 97 marcadores moleculares microssatélites (SSR), visando abranger todo o genoma do trigo (Tabela 2). As amplificações de PCR foram realizadas isoladamente para cada marcador em 15 μ l de solução contendo 0,2 μ M de cada primer (forward e reverse), 0,2mM de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 0,75U de Taq polimerase, tampão 1X e 100ng de DNA de cada genótipo em estudo.

Tabela 2 – Relação dos marcadores microsátélites utilizados neste estudo, previamente desenvolvidos para trigo, com sua localização cromossômica, Embrapa Trigo, 2010

Primer	Cromossomo	Primer	Cromossomo	Primer	Cromossomo
WMS114 ¹	3D	WMC25 ²	2BS/2DS	WMS320 ¹	2DL
WMS608 ¹	2DL	WMS106 ¹	1DS	WMS341 ¹	3DS
WMC215 ²	5D/5AL/3A	WMC331 ²	4DL	WMS183 ¹	3DS
WMS344 ¹	7A/7BL	WMC167 ²	2DL	WMS186 ¹	5A
WMS639 ¹	5AL/5BL/5D	WMC245 ²	2DL/2B	WMS126 ¹	5AL
WMS403 ¹	1BL/2B/3A	WMS295 ¹	7DS	WMS149 ¹	4BL
WMS617 ¹	5A/6A	WMS642 ¹	1DL	WMS160 ¹	4A
WMS46 ¹	7BS/7BL	WMS136 ¹	1AS	WMS654 ¹	5DL
WMS162 ¹	3A/4A	WMS247 ¹	3BL/3A	WMS205 ¹	5DS
WMS174 ¹	5D	WMS328 ¹	2AL	WMS232 ¹	1D/5DL
WMS181 ¹	3BL	WMS526 ¹	2B	WMS349 ¹	2DL
WMS191 ¹	2BL/5B/6B/3D	WMS294 ¹	2AL	WMS291 ¹	5AL
WMS264 ¹	1AL/1BS	WMS322 ⁴	7AL	WMS484 ¹	2D
WMS437 ¹	7D	WMS33 ¹	1D	WMS157 ¹	2DL
WMS554 ¹	5B/7A	WMS99 ¹	1AL	WMS52 ¹	3DL
WMS325 ¹	6B/6D	WMS400 ¹	7B	WMS293 ¹	5AS
WMS397 ¹	4AL/4AS	WMS427 ¹	6AL	WMS233 ¹	7AS
WMS604 ¹	1BS/5BL	WMS626 ¹	6B	WMS249 ¹	2AS
WMS610 ¹	4A	WMS533 ¹	3BS	WMS282 ¹	7A
WMS613 ¹	6BS/4AS	WMS550 ¹	1BS	WMS148 ¹	2BS
WMS637 ¹	4AL	WMS272 ¹	5DL	WMS335 ¹	5BL
WMS192 ¹	5D	WMS389 ¹	3BS	WMS334 ¹	6AS
WMS664 ¹	5DL/4B	WMS169 ¹	6AL	WMS375 ³	4BL
WMS508 ¹	6BS	WMS219 ¹	6B	WMS107 ¹	4BS
WMS361 ¹	6B	WMS644 ¹	1BL/3BL/3BS/6BS/7BL	WMC44 ²	1BL
WMS193 ¹	6BS	WMS369 ¹	3AS/4BS	WMS609 ¹	4DL
WMS499 ¹	5DL	WMS120 ¹	2BL	WMS111 ¹	7DS
WMS118 ³	4AL/5BL	WMS95 ¹	2AS	WMS210 ¹	2BS/2DS
WMS112 ¹	3B/4B/7B	WMS518 ¹	6BS	WMS234 ¹	5BS/5AS
WMS18 ¹	1BS/4BS	WMS539 ¹	2D	WMS43 ¹	7BS
WMS350 ¹	7AS/7B/7DS/4AL	WMS261 ¹	2D	WMS153 ¹	1BL
WMS383 ¹	3D	WMS471 ¹	7A/7B		
WMS408 ¹	5BL	WMS161 ¹	3D		

¹Röder et al. (1998); ²Somers & Isaac (2004); ³Korzun et al. (1997); ⁴Grain Genes (2010)

As reações foram conduzidas em termociclador GeneAmp Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems -ABI) utilizando-se a seguinte programação: um ciclo a 94°C por 3min; 5 ciclos de 94°C por 1min, 60°C por 1min (decrecendo 1°C por ciclo até 55°C), 72°C por 1min; 30 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min, 72°C por 1min; e um ciclo de 72°C por 10min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2% e visualizados em fotodocumentador digital GelDoc XR+ (Bio-Rad). O marcador ladder utilizado foi o de 50pb.

A similaridade genética entre os genótipos foi estimada pelo coeficiente de Jaccard (1901). Os acessos foram agrupados pelo método UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages), desenvolvido por Sokal & Michener (1958), sendo que os genótipos foram considerados como unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e como caracteres binários as bandas obtidas pelos marcadores. O sistema utilizado para a geração dos dados foi o NTSYS versão 2.1 “Numerical Taxonomy System of Multivariate Analysis System” (ROHLF, 1998).

O conteúdo de informação de polimorfismo foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$$

onde P_{ij}^2 é a frequência do alelo j th por locos i th, abrangendo todos os alelos por locos (NEI, 1973).

2.4 CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA

A caracterização agronômica foi realizada avaliando-se os seguintes parâmetros: estatura de planta, espigamento e maturação

(ciclo), cor, peso, dureza e diâmetro do grão, além de informações quanto à maturação das espigas e grãos e tipo agronômico (BTA – bom tipo agronômico).

2.4.1 Estatura de Planta

A determinação da estatura dos genótipos foi realizada a partir da base da planta até a ponta da espiga, 15 dias após o espigamento. Foram medidas todas as plantas de cada genótipo, calculando-se a média das avaliações. Como referências agronômicas, foram utilizadas as testemunhas BRS 327 (alta) e BRS Guamirim (baixa).

2.4.2 Ciclo

O ciclo dos genótipos foi calculado tendo como base a data de emergência, do espigamento e a de maturação, considerando-se, portanto, os subperíodos de emergência ao espigamento, espigamento à maturação e ciclo total (emergência à maturação). As leituras foram realizadas em dias, tendo como parâmetro a avaliação geral das plantas correspondentes em cada balde. Como referências foram utilizadas as testemunhas contrastantes para ciclo: BRS Umbu (ciclo médio-tardio) e BRS Guamirim (ciclo precoce).

2.4.3 Cor do Grão

A avaliação da cor do grão foi realizada visualmente considerando a coloração do grão das cultivares testemunhas BRS Umbú (grão branco) e BRS Guamirim (grão vermelho).

2.4.4 Dureza, peso e diâmetro do grão

Foram determinadas segundo o método 55-31, da AACC (2000) usando equipamento SKCS - Single Kernel Characterization System (sistema de caracterização individual da semente), modelo 4100, da Perten Instruments, com adaptação. Neste caso, foi empregada amostra de 50 grãos, no lugar de 300 grãos que é o padrão do aparelho, e sem repetições, devido à pequena disponibilidade de sementes, para estimar o índice de dureza do grão (ID), o peso do grão (PG) e o diâmetro externo do grão (DG). A dureza do grão foi determinada pela medida experimental da força necessária para triturar o grão de trigo, segundo o manual de operação do SKCS. A Tabela 3 apresenta a classificação do índice de dureza do grão de trigo (AACC, 2000).

Tabela 3 – Classificação de índice de dureza do grão de trigo

Categoria	Índice de Dureza
Extra duro	Acima de 90
Muito duro	81–90
Duro	65–80
Semi-duro	45–64
Semi-mole	35–44
Mole	25–34
Muito mole	10–24
Extra mole	Abaixo de 10

Fonte: Adaptado de AACC (2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação da similaridade dos genótipos, foram utilizados 97 marcadores moleculares do tipo microsátélites dos quais 42 (43,3%) apresentaram polimorfismo (Figura 2): WMS642, WMS136, WMS247, WMS99, WMS400, WMS427, WMS533, WMS160, WMS205, WMS349, WMS52, WMS148, WMS186, WMS335, WMS334, WMS294, WMS626, WMS291, WMS114, WMS344, WMS639, WMS617, WMS46, WMS181, WMS264, WMS437, WMS397, WMS604, WMS637, WMS508, WMS499, WMS261, WMS471, WMS234, WMS95, WMS518, WMS408, WMS272, WMS389, WMS219, WMC215 e WMS153.

Os dados obtidos a partir da análise dos marcadores moleculares foram compilados para obtenção da matriz de Jaccard (Figura 3) e do dendrograma (Figura 4), visando identificar a relação da similaridade genética entre os genótipos analisados e os potenciais materiais para uso posterior no programa de melhoramento genético de trigo com ênfase à resistência genética à ferrugem da folha.

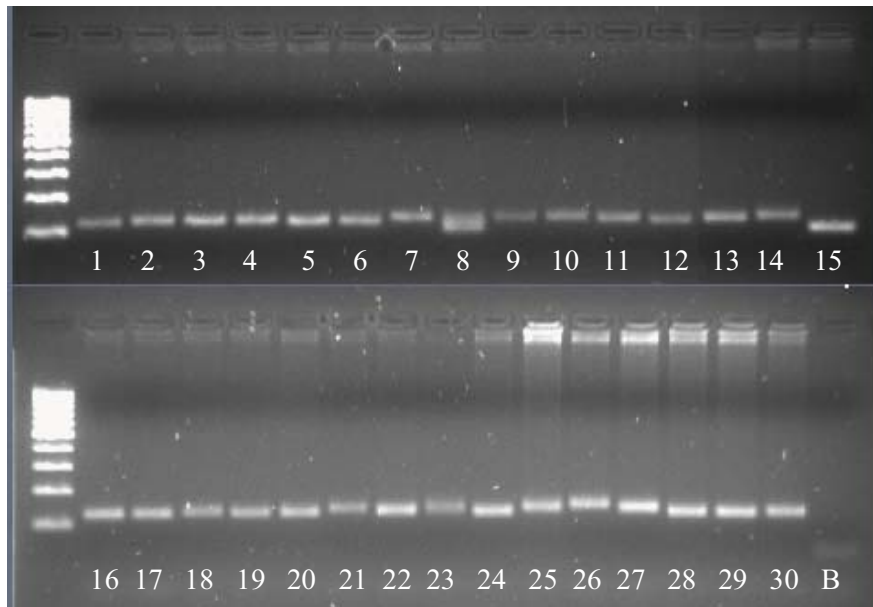


Figura 2 – Marcador molecular wms186. Gel de agarose 2%. Genótipos: 1. PF030132, 2. PF960258, 3. Frontana, 4. PF970313, 5. PF010089, 6. BR23, 7. BR35, 8. Toropi, 9. IWT04019, 10. Alondra I, 11. PF030065, 12. PF001178, 13. IPF74231, 14. PF040453, 15. PF970339, 16. PF9027, 17. PF010091, 18. PF010066P, 19. PF93318, 20. PF010069, 21. IPF70872P, 22. BRS Tarumã, 23. PF970345, 24. PF030401, 25. PF003295A/B, 26. PF980414, 27. PF040488, 28. PF950351, 29. PF979002, 30. PF940266.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	1																													
2	0,56	1																												
3	0,50	0,48	1																											
4	0,44	0,48	0,48	1																										
5	0,74	0,58	0,57	0,46	1																									
6	0,54	0,48	0,72	0,58	0,63	1																								
7	0,36	0,21	0,56	0,40	0,44	0,57	1																							
8	0,48	0,41	0,64	0,41	0,50	0,78	0,58	1																						
9	0,50	0,48	0,32	0,29	0,58	0,43	0,36	0,34	1																					
10	0,50	0,44	0,55	0,48	0,52	0,75	0,52	0,65	0,62	1																				
11	0,62	0,54	0,58	0,65	0,57	0,57	0,43	0,57	0,35	0,53	1																			
12	0,67	0,57	0,50	0,44	0,89	0,62	0,39	0,48	0,57	0,50	0,50	1																		
13	0,43	0,58	0,48	0,46	0,50	0,46	0,31	0,47	0,39	0,48	0,62	0,42	1																	
14	0,56	0,59	0,39	0,39	0,63	0,54	0,30	0,47	0,65	0,56	0,48	0,63	0,63	1																
15	0,38	0,37	0,39	0,37	0,45	0,58	0,39	0,57	0,48	0,54	0,42	0,42	0,57	0,63	1															
16	0,56	0,54	0,78	0,48	0,57	0,83	0,52	0,64	0,41	0,69	0,53	0,56	0,48	0,53	0,48	1														
17	0,77	0,54	0,45	0,43	0,86	0,54	0,37	0,43	0,56	0,45	0,59	0,80	0,54	0,59	0,43	0,45	1													
18	0,58	0,56	0,61	0,56	0,72	0,74	0,48	0,65	0,56	0,68	0,67	0,65	0,72	0,67	0,65	0,61	0,68	1												
19	0,75	0,54	0,66	0,65	0,69	0,72	0,48	0,59	0,50	0,73	0,75	0,63	0,73	0,73	0,65	0,61	0,59	0,67	0,75	0,91	0,88	1								
20	0,64	0,50	0,67	0,62	0,79	0,74	0,54	0,59	0,50	0,62	0,73	0,73	0,65	0,61	0,59	0,67	0,75	0,91	0,88	1										
21	0,50	0,39	0,55	0,59	0,63	0,54	0,63	0,48	0,50	0,61	0,63	0,56	0,53	0,48	0,48	0,50	0,61	0,73	0,71	0,80	1									
22	0,48	0,42	0,52	0,76	0,55	0,56	0,44	0,41	0,42	0,52	0,62	0,48	0,55	0,52	0,45	0,52	0,52	0,64	0,68	0,70	0,68	1								
23	0,48	0,38	0,52	0,62	0,55	0,57	0,56	0,41	0,47	0,59	0,56	0,48	0,50	0,52	0,45	0,52	0,57	0,63	0,67	0,69	0,79	0,82	1							
24	0,81	0,50	0,42	0,39	0,82	0,44	0,38	0,45	0,58	0,46	0,55	0,75	0,50	0,62	0,40	0,47	0,86	0,64	0,69	0,71	0,57	0,54	0,53	1						
25	0,41	0,35	0,52	0,35	0,54	0,68	0,60	0,67	0,52	0,76	0,41	0,52	0,45	0,55	0,61	0,62	0,42	0,69	0,57	0,63	0,57	0,48	0,58	0,48	1					
26	0,63	0,48	0,68	0,60	0,71	0,73	0,61	0,60	0,54	0,74	0,75	0,64	0,58	0,54	0,58	0,65	0,67	0,83	0,87	0,91	0,91	0,63	0,74	0,63	0,68	1				
27	0,37	0,35	0,52	0,45	0,54	0,68	0,67	0,61	0,47	0,69	0,41	0,52	0,45	0,50	0,61	0,57	0,42	0,69	0,52	0,63	0,68	0,53	0,63	0,39	0,84	0,68	1			
28	0,58	0,56	0,39	0,39	0,67	0,46	0,41	0,52	0,58	0,54	0,47	0,55	0,45	0,56	0,50	0,42	0,64	0,58	0,52	0,52	0,59	0,43	0,48	0,60	0,43	0,52	0,54	1		
29	0,46	0,50	0,62	0,45	0,59	0,64	0,48	0,55	0,47	0,54	0,50	0,58	0,55	0,55	0,67	0,74	0,52	0,69	0,62	0,76	0,62	0,53	0,58	0,48	0,59	0,75	0,59	0,48	1	
30	0,37	0,56	0,50	0,56	0,48	0,48	0,42	0,48	0,40	0,50	0,55	0,41	0,72	0,50	0,54	0,50	0,45	0,69	0,55	0,63	0,67	0,64	0,63	0,41	0,52	0,62	0,63	0,58	0,69	1

Figura 3 – Matriz de Jaccard evidenciando as similaridades entre os 30 genótipos analisados. Os números da primeira linha e primeira coluna correspondem aos genótipos. Genótipos: (1) PF 030132, (2) PF 960258, (3) Frontana, (4) PF 970313, (5) PF 010089, (6) BR 23, (7) BR 35, (8) Toropi, (9) IWT 04019, (10) Alondra I, (11) PF 030065, (12) PF 001178, (13) IPF 74231, (14) PF 040453, (15) PF 970339, (16) PF 9027, (17) PF 010091, (18) PF 010066P, (19) PF 93318, (20) PF 010069, (21) IPF 70872P, (22) BRS Tarumã, (23) PF 970345, (24) PF 030401, (25) PF 003295A/B, (26) PF 980414, (27) PF 040488, (28) PF 950351, (29) PF 979002 e (30) PF 940266.

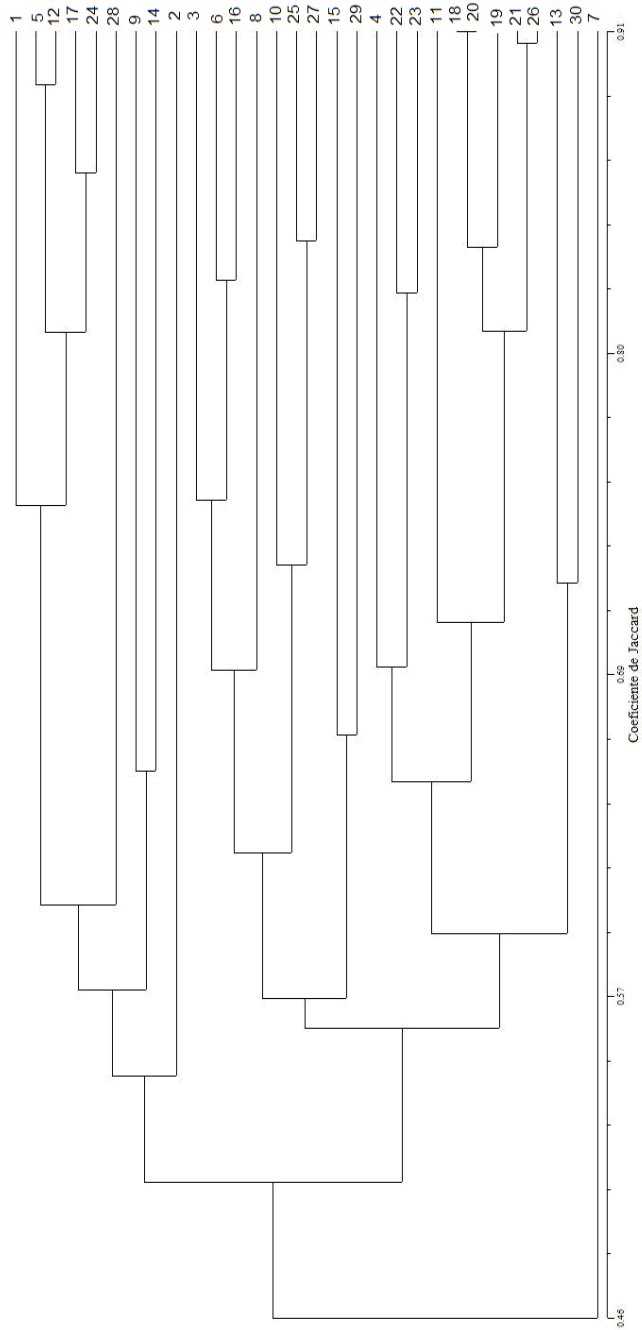


Figura 4 – Dendrograma de similaridade genética obtido a partir do Coeficiente de Jaccard, para os 30 genótipos avaliados. . Genótipos: (1) PF 030132, (2) PF 960258, (3) Frontana, (4) PF 970313, (5) PF 010089, (6) BR 35, (7) BR 35, (8) Toropi, (9) IWT 04019, (10) Alondra I, (11) PF 030065, (12) PF 001178, (13) IPF 74231, (14) PF 040453, (15) PF 970339, (16) PF 9027, (17) PF 010091, (18) PF 010066P, (19) PF 93318, (20) PF 010069, (21) IPF 70872P, (22) BRS Tarumã, (23) PF 970345, (24) PF 030401, (25) PF 003295A/B, (26) PF 980414, (27) PF 040488, (28) PF 950351, (29) PF 979002 e (30) PF 940266.

A matriz de Jaccard, bem como o dendrograma de similaridade genética evidenciam a diversidade do material analisado, em que se verifica o maior valor de similaridade entre PF 010066P e PF 010069 (91,3%) e o menor entre PF 960258 e BR 35 (20,7%). O coeficiente médio de similaridade obtido foi de 58,9%, confirmando a elevada diversidade entre os genótipos analisados a partir dos marcadores moleculares microssatélites empregados.

A Tabela 4, por sua vez, mostra que o número de alelos variou de um a cinco, sendo o número médio de alelos 2,86. O maior número de locos polimórficos foi encontrado nos genomas A (45,2%) e B (47,6%), seguidos do genoma D (26,1%) (somatório não é 100% pois existem marcadores moleculares que abrangem mais de um genoma). Nos cromossomos, a maior frequência foi encontrada no cromossomo 5 apresentando 26,1%, seguido pelos cromossomos 1, 3 e 6 com 14,2%, 2 e 7, com 11,9% e 4 com 7,1%. Estes resultados corroboram com estudos anteriores tais como Liu et al. (2007) e Achtar et al. (2010), que encontraram o maior número de alelos bem como a maior variabilidade genética no genoma B. Contudo o número de alelos é bastante variável dependendo da população avaliada (KHLESTKINA et al., 2004; ROUSSEL et al., 2005).

O valor do conteúdo de informações de polimorfismo (CIP ou PIC – polymorphism information content) variou de 0,06 a 0,73, sendo o valor médio 0,49. A faixa de valores obtida neste trabalho está de acordo com diversos estudos anteriores, contudo, o valor médio encontrado foi inferior aos obtidos nos referidos estudos, pois a quantidade de marcadores polimórficos utilizados neste foi maior em comparação aqueles, o que explica o valor médio de PIC pouco

inferior (LIU et al., 2007; CHANDNA et al., 2010; GANEVA et al., 2010). Todavia, o valor de 0,49 ainda é indicativo de elevada diversidade genética, corroborando com os resultados obtidos pelo coeficiente de similaridade de Jaccard.

Tabela 4 – Marcadores moleculares polimórficos utilizados neste estudo com sua referida localização no genoma, número de alelos, faixa de fragmentos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) obtidos, Embrapa Trigo, 2010

	Primer	Cromossomo	Número de Alelos	Fragmentos (min – max)	PIC
1	WMS99	1AL	2	100 – 150	0,43
2	WMS264	1AL/1BS	2	160 – 210	0,49
3	WMS136	1AS	5	200 – 500	0,52
4	WMS153	1BL	3	180 – 210	0,62
5	WMS604	1BS/5BL	3	110 – 130	0,64
6	WMS642	1DL	3	180 – 550	0,50
7	WMS294	2AL	4	50 – 120	0,68
8	WMS95	2AS	2	100 – 130	0,06
9	WMS148	2BS	3	100 – 170	0,52
10	WMS261	2D	3	170 – 200	0,50
11	WMS349	2DL	4	110 – 350	0,11
12	WMS181	3BL	2	140 – 160	0,32
13	WMS247	3BL/3A	2	150 – 200	0,37
14	WMS533	3BS	3	100 – 180	0,45
15	WMS389	3BS	3	130 – 180	0,61
16	WMS114	3D	4	120 – 200	0,55
17	WMS52	3DL	4	150 – 350	0,56
18	WMS160	4A	3	160 – 200	0,52
19	WMS637	4AL	2	150 – 170	0,48
20	WMS397	4AL/4AS	2	190 – 200	0,46
21	WMS186	5A	3	100 – 140	0,57
22	WMS617	5A/6A	4	100 – 190	0,73
23	WMS291	5AL	4	110 – 380	0,66
24	WMS639	5AL/5BL/5D	3	140 – 180	0,61
25	WMS335	5BL	4	180 – 260	0,63
26	WMS408	5BL	2	160 – 190	0,50
27	WMS234	5BS/5AS	3	110 – 160	0,59

Tabela 4 – (Continuação)

	Primer	Cromossomo	Número de Alelos	Fragmentos (min – max)	PIC
28	WMC215	5D/5AL/3A	2	210 – 250	0,49
29	WMS499	5DL	2	100 – 130	0,28
30	WMS272	5DL	2	140 – 160	0,18
31	WMS205	5DS	2	140 – 170	0,50
32	WMS427	6AL	2	220 – 250	0,35
33	WMS334	6AS	2	110 – 130	0,48
34	WMS626	6B	2	100 – 130	0,23
35	WMS219	6B	3	150 – 190	0,45
36	WMS508	6BS	2	140 – 170	0,31
37	WMS518	6BS	4	190 – 250	0,69
38	WMS471	7A/7B	3	110 – 170	0,56
39	WMS344	7A/7BL	3	120 – 160	0,64
40	WMS400	7B	3	150 – 380	0,60
41	WMS46	7BS/7BL	3	160 – 200	0,65
42	WMS437	7D	3	90 – 110	0,57
		Total de Alelos	120		
		Genoma A (exclusivamente)	35		
		Genoma B (exclusivamente)	40		
		Genoma D (exclusivamente)	27		

Comparando-se os valores discriminados na matriz de Jaccard, dos genótipos mais próximos geneticamente (acima de 0,8), e sua genealogia (Tabela 5), há confirmação da similaridade obtida nas análises para estes genótipos, sendo que os pais predominantes nestes cruzamentos foram o OR1 (PF 010089, PF 001178, PF 010091, PF 001178, PF 010091 e PF 010069), COKER 80.33 (PF 010066P, PF 030132, PF 980414 e PF 010091), COKER 97.33 (PF 010069) e OASIS (PF 010089, PF 970345 e PF 001178). Portanto, a similaridade destes materiais é consideravelmente explicada pela genealogia, pois todos estes possuem um parental comum, o qual

transmitiu maior parte de seu genoma mesmo em cruzamentos complexos.

Tabela 5 – Tabela comparativa entre os genótipos mais similares e suas respectivas genealogias, Embrapa Trigo, 2010

Genótipos	Valor de Similaridade	Genealogia
PF 010089 PF 001178	0,89	OR1/OASIS OR1/OASIS
BR 23 PF 9027	0,83	CC/Alondra SIB/3/IAS 54-20/COP//CNT8 BR14/4/PF 839197/3/Londrina/COKER 76-35//F 20565/F...
PF 010091 PF 010089	0,86	HLN/COKER 80.33//OR1 OR1/OASIS
PF 001178 PF 010091	0,80	OR1/OASIS HLN/COKER 80.33//OR1
PF 010066P PF 93318	0,80	COKER 80.33/BRS 194 Desconhecida
PF 010066P PF 010069	0,91	COKER 80.33/BRS 194 OR1/COKER 97.33//PF 92334/PF 87451
PF 93318 PF 010069	0,88	Desconhecida OR1/COKER 97.33//PF 92334/PF 87451
PF 010069 IPF 70872P	0,80	OR1/COKER 97.33//PF 92334/PF 87451 C983/4/ACP//C762/FL302/3/C762 (881404-2-5)
PF 970345 BRS Tarumã	0,82	PEL 73101/BR 5/PF 79777/OASIS Century/BR35
PF 030401 PF 030132	0,81	CTY/PF 93188/PF 89156 RUBI/COKER 80.33
PF 030401 PF 010089	0,82	CTY/PF 93188/PF 89156 OR1/OASIS
PF 030401 PF 010091	0,87	CTY/PF 93188/PF 89156 HLN/COKER 80.33//OR1
PF 980414 PF 010066P	0,83	COKER 80.33//PF 869120//BR 18 COKER 80.33/BRS 194
PF 980414 PF 93318	0,87	COKER 80.33//PF 869120//BR 18 Desconhecida
PF 980414 PF 010069	0,91	COKER 80.33//PF 869120//BR 18 OR1/COKER 97.33//PF 92334/PF 87451
PF 980414 IPF 70872P	0,91	COKER 80.33//PF 869120//BR 18 C983/4/ACP//C762/FL302/3/C762 (881404-2-5)
PF 040488 PF 003295 A/B	0,84	PF 93232/LR37 (=COOK*4/VPM)//PF 940384 BR23*2/PF 940382

Além da diversidade genética, é essencial que os parentais para cruzamento possuam características agronômicas adequadas para

uso imediato, pois cultivares com padrões abaixo do requerido não podem ser prontamente utilizadas para cruzamentos simples, sendo necessários ciclos de retrocruzamentos para incorporação da característica de resistência durável sem perda do tipo de planta desejada. Deste modo, todos os genótipos também foram avaliados quanto à estatura de planta, ciclo e características do grão, conforme mostra a Tabela 6. As linhagens/cultivares BRS Tarumã, PF 970313, PF 030065, PF 040453, PF 010066P, PF 980414 e IPF 70872, foram descartadas no início da avaliação, pois apresentaram ciclo muito tardio. As demais plantas, em relação ao ciclo, foram classificadas como precoce, abaixo de 120 dias (padrão Guamirim); médio, com ciclo de 120 a 139 dias e tardio (padrão BRS Umbú), com ciclo acima de 140 dias. O programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo tem buscado cultivares de ciclo precoce a médio, que se insiram no sistema de produção da região sul do Brasil, sem prejudicar a cultura da soja, considerada a principal cultura sucessora no sistema agrícola sul-brasileiro. Por esse pressuposto, todos os demais genótipos (não descartados) se enquadraram no padrão desejado (Tabela 6).

Tabela 6 – Genótipos de trigo e suas características agronômicas avaliadas, Embrapa Trigo, 2010

Genótipo	Estatura (cm)	Ciclo (dias)	Cor do Grão ¹	Dureza do Grão ²	Peso do Grão ³ (mg)	Diâmetro do Grão ³ (mm)	Considerações Agronômicas ⁴
Toropi	88,4	117	GVM	SD	34,07 ± 4,49	2,75 ± 0,23	N/A
PF 9027	76,7	127	GVV	D	34,42 ± 7,95	2,80 ± 0,27	MD
PF 950351	63,7	121	GVV	MD	33,57 ± 5,38	2,81 ± 0,32	N/A
Frontana	98,5	138	GB	M	43,99 ± 5,88	3,06 ± 0,21	MD
BR 35	74,4	131	GVM	SM	41,29 ± 7,93	2,22 ± 0,34	BTA
BR 23	84,2	121	GB	SM	39,70 ± 7,77	2,85 ± 0,25	N/A
PF 010069	69,1	131	GVM	SM	31,92 ± 7,48	2,56 ± 0,20	MD
PF 030132	57,3	138	GVV	ED	31,38 ± 4,71	2,70 ± 0,22	MD
PF 979002	61,3	134	GVV	D	36,20 ± 6,87	2,70 ± 0,23	MD
PF 010089	46,8	134	GVV	SM	31,80 ± 5,33	2,72 ± 0,27	MD
PF 970339	74,9	125	GVM	SD	34,32 ± 4,93	2,78 ± 0,21	N/A
PF 970345	69,5	138	GVV	M	39,81 ± 6,38	2,86 ± 0,20	MD
PF 940266	62,8	125	GVM	D	34,18 ± 4,13	2,78 ± 0,18	N/A
PF 001178	45,8	138	GVM	M	31,75 ± 5,30	2,73 ± 0,26	MD
PF 003295A/B	69,1	121	GVM	D	45,74 ± 7,15	2,94 ± 0,25	N/A
PF 010091	58,6	122	GVM	SD	34,87 ± 6,19	2,77 ± 0,32	MD
PF 030401	50,4	131	GVM	D	33,48 ± 4,00	2,81 ± 0,19	MD
PF 040488	64,1	125	GVV	ED	33,98 ± 7,01	2,75 ± 0,29	BTA
IWT 04019	76,5	127	GVV	D	42,64 ± 8,53	2,99 ± 0,32	MD
PF 960258	68,7	127	GVM	SM	34,99 ± 7,15	2,78 ± 0,22	MD
PF 93318	72,6	131	GVM	M	39,70 ± 5,41	2,95 ± 0,24	N/A
Alondra I	66,1	127	GVM	MD	42,31 ± 7,09	2,95 ± 0,28	N/A
BRS 327	56,7	121	GVM/GM	M	40,57 ± 6,17	2,97 ± 0,24	BTA
BRS Umhu	63,5	142	GB	M	34,15 ± 4,85	2,66 ± 0,17	MD
BRS Guamirin	50,5	111	GVM	D	32,58 ± 5,50	2,81 ± 0,21	N/A

¹ (GVV) Grão vermelho vítreo, (GVM) Grão vermelho médio, (GB) Grão branco, (GM) Grão marrom, ² (ED) Extra duro, (MD) Muito duro, (D) Duro, (SD) Semi-duro, (SM) Semi-mole, (M) Mole, (MM) Muito mole e (EM) Extra mole. ³ Valor ± desvio padrão. ⁴ (MD) Maturação desuniforme, (BTA) Bom tipo agronômico, (N/A) não avaliado.

Entretanto, o desenvolvimento das plantas sob condições semi-controladas não foi o ideal, sendo que os genótipos demonstraram estatura abaixo do esperado. Isto é um fator já determinado em outros estudos, que demonstraram que em ambientes controlados podem ocorrer alterações no crescimento e reprodução das plantas, tanto positivamente quanto negativamente (ARAÚJO, 1991; VIDA et al., 2004). Assim, tendo como parâmetro a testemunha BRS 327, considerando-a como de porte limítrofe, foram consideradas altas as cultivares Frontana, Toropi e BR 23. Todos os demais genótipos, para esse parâmetro, desde que com a característica de RPA, têm maior possibilidade de sucesso em curto prazo no programa de melhoramento, pois o porte baixo é mais apropriado ao sistema de produção, possui mais resistência ao acamamento e suporta maior aporte de insumos.

O grão do trigo, por sua vez, pode ser classificado por sua coloração de vermelho a branco. O grão vermelho vítreo é considerado duro, pois a dureza está associada ao conceito de vitrosidade do grão (GUARIENTI, 1996). A dureza do grão é controlada geneticamente, mas fatores ambientais podem alterar o conteúdo protéico (TROCOLI et al., 2000). A indústria de panificação prefere os grãos vítreos porque este aspecto está correlacionado com a porcentagem de proteína, o rendimento de sêmola no moinho e a qualidade de cocção.

Dos genótipos analisados, os que apresentaram grão vermelho vítreo foram: PF 9027, PF 950351, PF 030132, PF 979002, PF 010089, PF 970345, PF 040488 e IWT 04019. Em relação à dureza, considerando o padrão BRS Guamirim, os genótipos que

apresentaram dureza maior ou equivalente foram: PF 9027, PF 950351, PF 030132, PF 979002, PF 040488, IWT 04019, PF 940266, PF 003295A/B, PF 030401 e Alondra I. Os resultados foram condizentes com estudos anteriores que relatam que a dureza está relacionada com a vitreosidade (SISSONS et al., 2000), pois quase todos os genótipos que apresentaram grão vermelho vítreo também apresentaram grão duro.

Considerando a estatura de planta, o ciclo e a cor do grão (atributos agronômicos adequados) associados à variabilidade genética (Figura 5), as linhagens indicadas para utilização imediata nos programas de melhoramento de trigo são: PF 9027, PF 950351, PF 030132, PF 979002, PF 040488 e IWT 04019. Considerando o peso de mil grãos (peso do grão multiplicado por mil) e o diâmetro do grão se destacou a linhagem IWT04019, com valores de, respectivamente, $42,64g \pm 8,53g$ e $2,99mm \pm 0,32mm$. Os demais genótipos podem ser utilizados como parentais, porém necessitam de ciclos de retrocruzamentos para recuperação dos caracteres agronômicos do pai recorrente.

Apesar de alguns dos genótipos analisados terem apresentado maturação desuniforme neste trabalho, tal como a IWT04019, isso não implica, necessariamente, em falta de homogeneidade da linhagem, pois o experimento foi conduzido em ambiente semi-controlado e as sementes apresentaram diferente potencial de germinação. Portanto, reflexos destes fatores no fenótipo são esperados.

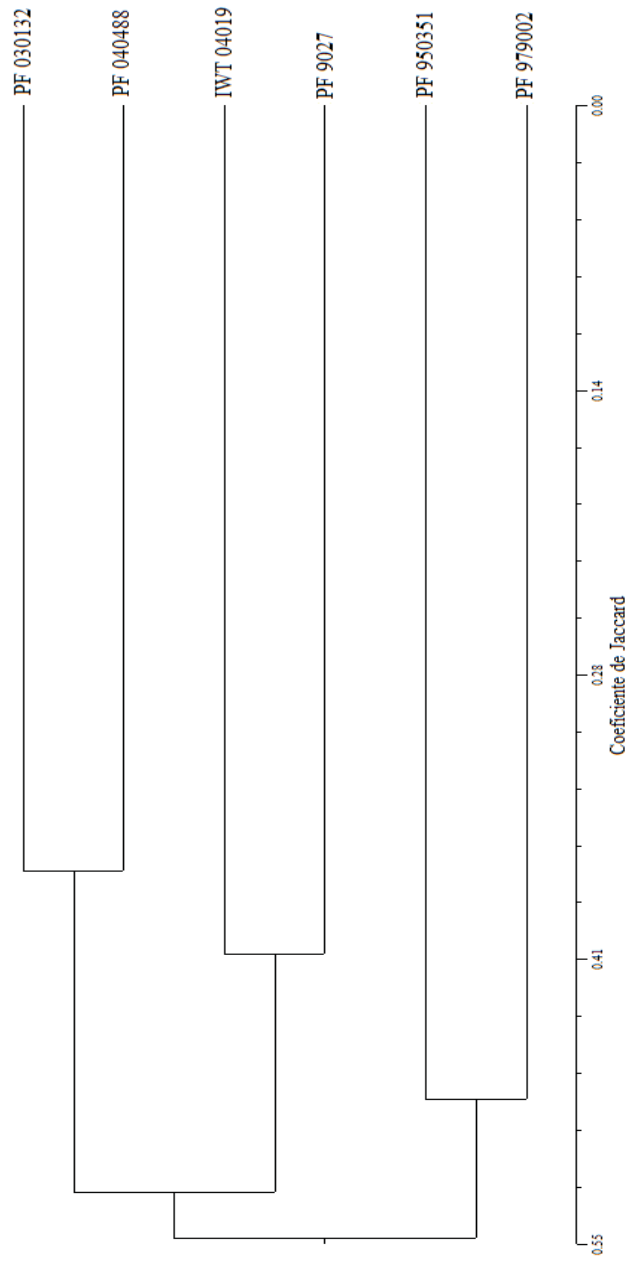


Figura 5 – Dendrograma de similaridade genética obtido a partir do Coeficiente de Jaccard, para os seis genótipos indicados.

4 CONCLUSÕES

- Os genótipos analisados neste estudo apresentaram elevada variabilidade genética e coeficiente médio de similaridade de 58,9%, sendo que é essencial aos programas de melhoramento genético de trigo;
- A maior variabilidade genética encontrada foi no genoma B e cromossomo 5 destes genótipos. A utilização de marcadores moleculares microsátélites de regiões não expressas permitiu estimar a variabilidade genética mesmo entre genótipos similares fenotipicamente;
- As linhagens PF 9027, PF 950351, PF 030132, PF 979002, PF 040488 e IWT 04019 podem ser utilizadas de imediato no melhoramento do trigo, pela associação da variabilidade à características agronômicas adequadas (determinadas neste estudo);
- As demais linhagens/cultivares podem ser utilizadas como fonte para genes de resistência à ferrugem da folha ou em retrocruzamentos ou como parentais, porém no melhoramento de germoplasma básico.

5 PERSPECTIVAS

As análises destes genótipos, quanto à caracterização agronômica, serão realizadas futuramente em campo, visando agregar e confirmar os resultados obtidos neste estudo.

CAPÍTULO II

HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA *IN SITU* E MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES NA IDENTIFICAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO COLMO *Sr31* EM GENÓTIPOS DE TRIGO

Alice Casassola¹, Sandra Patussi Brammer², Márcia Soares Chaves³

RESUMO – O gene de resistência à ferrugem do colmo *Sr31* foi transferido para o trigo cultivado a partir da translocação entre o braço curto do cromossomo 1R do centeio e o braço longo do cromossomo 1B do trigo. Esta translocação é conhecida como 1BL.1RS e está presente em grande proporção no germoplasma mundial desta espécie. A superação da resistência proporcionada por este gene pela raça Ug99 de ferrugem do colmo tem sido motivo de grande preocupação, pois este gene, estando presente em diversos genótipos brasileiros de trigo, pode facilitar a introdução desta raça no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar as metodologias de hibridização genômica *in situ* (GISH) e marcadores moleculares microssatélites na detecção da presença do gene *Sr31* em linhagens de trigo desenvolvidas pelo

¹ Farmacêutica, 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).

² Orientadora, Bióloga, Professora do PPGAgro, Pesquisadora da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

³ Coorientadora, Engenheira Agrônoma, Pesquisadora da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

Programa de Melhoramento Genético de Trigo da Embrapa Trigo, visando determinar a presença deste gene bem como verificar qual a metodologia mais viável e precisa a ser utilizada na identificação gênica. As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo em Passo Fundo/RS. Foram utilizados 27 genótipos de trigo dos quais, para a análise citogenética via GISH, os meristemas radiculares de sementes germinadas em papel Germitest foram coletados, fixados e preparados em lâminas citológicas, sendo hibridizadas com sonda de centeio marcada com fluoresceína. Para a análise via marcadores, as folhas oriundas das mesmas sementes foram coletadas com aproximadamente 10cm de comprimento e o DNA foi extraído pelo método CTAB, seguido de análise via PCR (Polimerase Chain Reaction) por marcadores moleculares específicos. Os resultados obtidos confirmaram a presença do gene *Sr31* em 37% do germoplasma avaliado, e através destes foi possível concluir que a análise conjunta via marcadores e GISH proporcionou resultados precisos na identificação tanto da translocação 1BL.1RS como da presença deste gene.

Palavras chaves: *Triticum aestivum*, GISH, SSR, ferrugem do colmo.

**GENOMIC *IN SITU* HIBRIDIZATION AND
MICROSATELITE MOLECULAR MARKERS TO IDENTIFY
THE RESISTANCE GENE TO STEM RUST *Sr31* IN WHEAT
GENOTYPES**

**Alice Casassola¹, Sandra Patussi Brammer², Márcia Soares
Chaves³**

ABSTRACT - The gene for resistance to stem rust *Sr31* was transferred to wheat from the translocation between the short arm of chromosome 1R of rye and the long arm of chromosome 1B of wheat. This translocation is known as 1BL.1RS and is present in large proportion in the world germplasm of this specie. The resistance provided by this gene was overcoming by race Ug99 of stem rust, and it has been of great concern, because this gene is present in several Brazilian wheat genotypes may facilitate the introduction of this race in Brazil. The objective of this study was to evaluate the methodologies of genomic in situ hybridization (GISH) and microsatellite molecular markers to detect the presence of the gene *Sr31* in wheat genotypes bred in Wheat Breeding Program of Embrapa Trigo, to determine the presence of this gene and to verify which more feasible and accurate method to be used in gene identification. Analyses were carried out in the Biotechnology Laboratory of

¹ Pharmaceutical, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine (PPGAgro) – University of Passo Fundo.

² Advisor, Biologist, faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo. Researcher at Embrapa Wheat.

³ Co-advisor, Agronomist, researcher at Embrapa Wheat.

Embrapa Trigo in Passo Fundo/RS. Twenty seven genotypes of wheat were used in this study. For GISH, the root meristems of germinating seeds in paper Germitest were collected, fixed and prepared in cytological slides, and hybridized with rye probe labeled with fluorescein. For the analysis via molecular markers, the leaves coming from the same seeds were collected with approximately 10cm in length and DNA was extracted by CTAB method, followed by analysis via PCR (Polymerase Chain Reaction) with specific markers. The results confirmed the presence of the gene *Sr31* in 37% of the germplasm evaluated, and through these it was concluded that the joint analysis, GISH plus molecular markers, provided accurate results in identifying both the translocation 1BL.1RS as the presence of this gene.

Key words: *Triticum aestivum*, GISH, SSR, stem rust.

1 INTRODUÇÃO

O patógeno *Puccinia graminis* Pers.:Pers. f. sp. *tritici* Eriks. E. Henn é o agente causal da ferrugem do colmo em trigo. Esta doença possui elevado potencial destrutivo nas lavouras de trigo e o uso de cultivares suscetíveis pode ocasionar perdas expressivas que podem chegar a 70% (BARCELLOS, 2011; USDA, 2011).

A ferrugem do colmo do trigo foi mantida sob controle durante muito tempo pelo uso de cultivares resistentes. Porém, a nova raça deste fungo conhecida como Ug99 (TTKSK) superou a resistência existente em diversas cultivares, existindo o risco de disseminação além do seu ponto de origem, a região do leste africano. Esta raça foi inicialmente detectada na Uganda, porém já se tem relatos de sua presença em diversos países da África e Ásia (SANSFORD, 2008).

Seis variantes constituem o complexo Ug99, os quais possuem o mesmo “fingerprint”, porém expressam padrões de virulência diferentes. Esta alta capacidade de especialização fisiológica coloca em risco o cultivo de trigo no mundo (BARCELLOS, 2011).

O gene *Sr31* foi um dos primeiros genes de resistência superados por estas raças. Este gene está presente em alta proporção no germoplasma brasileiro e a possibilidade de introdução da raça Ug99 no Brasil, em virtude desta superação, é motivo de grande preocupação. O gene *Sr31* foi introgridido no trigo a partir da translocação 1BL.1RS, a qual envolve o braço curto do cromossomo 1R do centeio e o braço longo do cromossomo 1B do trigo.

Juntamente com este, são transferidos os genes de resistência *Lr26* (*Puccinia triticina* Eriks), *Yr9* (*Puccinia striiformis* Westend) e o *Pm8* (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*) (KIM et al., 2004). Este gene foi responsável pela resistência das cultivares no Brasil durante muito tempo (GERMÁN et al., 2007). Contudo, com o surgimento da raça Ug99 e a superação desta resistência, a identificação da presença deste gene e, em consequência, da translocação 1BL.1RS em genótipos brasileiros de trigo, tem se tornado de grande importância (CASASSOLA & BRAMMER, 2011).

Sua detecção pode ser realizada de diversas formas. A técnica de hibridização genômica *in situ* (GISH) é uma tecnologia moderna de citogenética amplamente utilizada na detecção de cromatina introgridida em diversas espécies, inclusive aquelas envolvendo o trigo e o centeio (ANGELOVA & GEORGIEV, 2006; GUAN et al., 2008; QI et al., 2008). Esta técnica é baseada na utilização do DNA genômico da espécie doadora como sonda, do DNA genômico da espécie em estudo como alvo e bloqueio e a visualização é realizada através da emissão de fluorescência (ANGELOVA & GEORGIEV, 2006).

Têm-se relatos de muitas translocações envolvendo o trigo e o centeio, contudo a 1BL.1RS é a mais comum (YANG & REN, 1997; ZHOU et al., 2004; CASASSOLA & BRAMMER, 2011). Esta translocação pode ser visualizada a partir de GISH, mas, também pode ser identificada a partir da utilização de outras técnicas. O uso de marcadores moleculares ainda é o mais comum por ser uma técnica relativamente barata, de fácil aplicação e eficiente.

A identificação gênica por meio de marcadores é bastante utilizada na seleção assistida, num procedimento conhecido como seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM ou MAS – molecular assisted selection). Esta metodologia vem sendo aplicada nos programas de melhoramento, pois fornece informações relevantes sobre os genótipos em estudo, bem como auxilia e acelera consideravelmente o processo de obtenção de cultivares (PELEMAN & VAN DER VOORT, 2003).

São relatados, na literatura, diversos marcadores moleculares para identificação da translocação 1BL.1RS, principalmente os ligados ao gene *Sr31*. O marcador molecular microssatélite SCM9, é um marcador desenvolvido por Saal & Wricke (1999), que amplifica um fragmento de 220 pares de bases em genótipos portadores do gene *Sr31*. Este marcador é bastante utilizado nos estudos de prospecção deste gene e, conseqüentemente, da translocação 1BL.1RS, pois apresenta elevada eficiência e especificidade (WENG et al.; 2007; SCHNEIDER & MOLNÁR-LANG, 2009; YEDIAY et al., 2010).

O marcador molecular J071, por sua vez, foi desenvolvido por Iqbal & Rayburn (1995) e amplifica um fragmento de 1000 pares de bases. Este marcador também pode ser utilizado na inferência da presença ou ausência do gene *Sr31*, sendo que o mesmo foi utilizado em outros estudos com esta finalidade tal como o de TANG et al. (2009a).

A existência de diversas técnicas que podem ser aplicadas na identificação de genes importantes como é o caso do *Sr31*, faz com que os laboratórios padronizem as mais adequadas a partir das

tecnologias disponíveis, e com maior eficiência. Neste sentido, o presente trabalho foi desenvolvido objetivando avaliar a técnica de hibridização genômica *in situ* e a de marcadores moleculares quanto a eficiência de ambas na detecção da presença do gene *Sr31* em genótipos de trigo, gerando informações ao programa de melhoramento genético da Embrapa quanto à presença deste gene, além de estabelecer uma técnica padrão na detecção de translocações cromossômicas e de identificação gênica para utilização de rotina no Laboratório de Biotecnologia desta instituição.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Trigo, em Passo Fundo – RS, no período de março de 2010 a dezembro de 2010.

2.2 MATERIAL VEGETAL

Para avaliar a presença ou ausência do gene *Sr31*, foram utilizados 27 genótipos de trigo, previamente selecionados por fazerem parte de estudos de resistência às ferrugens da folha e do colmo do trigo. Todos os genótipos são parcialmente resistentes à ferrugem da folha entretanto, formam grupos contrastantes quanto à reação à ferrugem do colmo. Os genótipos utilizados foram PF 030132, PF 9027, PF 960258, PF 010091, Frontana, PF 010066P, PF 970313, PF 93318, BR 23, PF 010069, BR 35, IPF 70872P, Toropi, BRS Tarumã, IWT 04019, PF 970345, Alondra I, PF 030401, PF

030065, PF 003295A/B, PF 001178, PF 040488, IPF 74231, PF 979002, PF 040453, PF 940266 e PF 970339. Destes, a cultivar Alondra I foi empregada como controle positivo para a presença da translocação 1BL.1RS.

2.3 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA *IN SITU* - GISH

2.3.1 Obtenção de raízes

Primeiramente, as sementes foram germinadas, objetivando a sincronização da divisão celular e, conseqüentemente, maior número de células em divisão, da seguinte maneira: 23 °C por 24h, 4 °C por 48h e 23 °C, até a obtenção das raízes com tamanho desejado (uma a duas vezes o tamanho da semente). Após, as pontas de raízes de sementes recém germinadas, em placas de Petri, foram coletadas e pré-tratadas com água ultra pura (4°C) por 26 horas. Em seguida, o material foi fixado em Carnoy (3 partes de álcool etílico:1 parte de ácido acético glacial) por um período de 24 horas em temperatura ambiente e estocado a – 20°C, até o momento do uso.

2.3.2 Preparo das lâminas e pré-hibridização

Para a confecção das lâminas, o material fixado foi lavado com água destilada e posteriormente tratado com solução de celulase 2% (p/v - Sigma) e pectinase 20% (v/v - Sigma) a 37 °C por vinte minutos. Após a digestão enzimática, as raízes foram maceradas com uma gota de ácido acético 45%, visualizadas em microscópio óptico e prensadas lâmina/lamínula. As preparações foram congeladas em nitrogênio líquido por, aproximadamente, três minutos, para a retirada da lamínula. Em seguida, as lâminas foram secas em temperatura

ambiente e analisadas. Aquelas que apresentaram cromossomos espalhados, com pouca ou sem sobreposição cromossômica e citoplasma pouco denso foram selecionadas para a etapa posterior e estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3 Hibridização genômica *in situ* (GISH)

Para GISH foi utilizado DNA genômico de centeio, cultivar Centeio BR 1, como sonda, e o DNA de trigo BR 35, como bloqueio. Inicialmente, realizou-se a extração de DNA genômico da sonda e do bloqueio, utilizando 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 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ por, aproximadamente, 1h e 30min, de modo direto, utilizando os fluorocromos fluoresceína 12-dUTP (Roche). Após a marcação, a sonda foi estocada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a qual foi utilizada posteriormente na mistura de hibridização na proporção de 1:10, em relação ao DNA bloqueador de trigo.

As lâminas, previamente selecionadas, foram pré-tratadas com a solução de hibridização. A desnaturação dos cromossomos e das sondas, os banhos pós-hibridização e a detecção foram efetuados de acordo com Heslop-Harrison et al. (1991), com estringência de

77%. As misturas de hibridização consistiram de: formamida 100% (v/v), dextran sulfato 50% (p/v), 20x SSC, 0,5ng/μL de sonda e 0,5ng/μL de bloqueio. As lâminas foram desnaturadas por 7 min a 73 °C, colocadas em câmara úmida e hibridizadas por 18 horas a 37 °C.

2.3.4 Montagem das lâminas e análise cromossômica

Após os banhos pós-hibridização para GISH, as lâminas foram montadas com 2 ug/mL de 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em Vectashield (Vector), na proporção de 1:1. A vedação da lâmina-lamínula foi feita com o uso de esmalte incolor.

Para a análise da presença ou ausência da translocação 1BL.1RS foram avaliadas 10 células de cada genótipo, com bom espalhamento dos cromossomos. As imagens foram capturadas no microscópio de epifluorescência modelo AxioScop 40 Zeiss mediante uma câmera AxioCam MRm Zeiss, utilizando-se o programa AxioVision Release 4.6.3.

2.4 MARCADORES MOLECULARES

2.4.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído das folhas oriundas de sementes germinadas em papel Germitest, coletadas com aproximadamente 10 cm de comprimento. O tecido foliar coletado foi pesado (300 mg) e macerado com nitrogênio líquido. A extração foi realizada utilizando tampão CTAB (700 μL) pré-aquecido a 65 °C. As amostras foram mantidas em banho-maria por 60 min. A separação da fração contendo o DNA foi realizada com 700 μL de clorofórmio:álcool isoamílico

(24:1), 2 vezes, seguidas de centrifugação a 10.000 rpm. Para precipitar o DNA, utilizou-se isopropanol (500 µL).

Após um período de incubação de, no mínimo, 30 min, o sobrenadante foi retirado e o pellet lavado com 600 µL de etanol 70% e, em seguida, com 600 µL de etanol 96%. Posteriormente o DNA foi ressuscitado em 100 µL de Tris-HCl 10mM, contendo RNase (10mg/mL), incubado a 37 °C por uma hora. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso (BONATO, 2008).

2.4.2 Primers e reações de PCR

Os marcadores moleculares microssatélites selecionados foram o J071 e o SCM9. As características destes marcadores estão descritas na Tabela 1.

As amplificações de PCR para o SCM9 foram realizadas em 20µl de solução contendo 0,2mM de cada primer, 0,2mM de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 0,75U de Taq polimerase, tampão 1X e 100ng de DNA de cada genótipo em estudo. As reações foram conduzidas em termociclador GeneAmp Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems -ABI) utilizando-se a programação touchdown 60-55°C que segue: um ciclo a 94°C/3min; cinco ciclos de 94°C/1min, 60°C/1min (decrecendo 1°C por ciclo), 72°C/1min; 30 ciclos de 94°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min; um ciclo de 72°C/10min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2% e visualizados em fotodocumentador digital GelDoc XR+ (Bio-Rad).

As amplificações de PCR para o J071 foram realizadas em 50µl de solução contendo 0,2mM de cada primer, 0,2mM de cada dNTP, 3mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerase, tampão 1X e 100ng de

DNA de cada genótipo em estudo. As reações de amplificação do DNA, a migração e a revelação foram as mesmas empregadas para o marcador SCM9.

Ambas as reações foram realizadas em duplicata para todos os genótipos.

Tabela 1 – Marcadores moleculares utilizados no estudo, sua respectiva sequência, fragmento esperado e temperatura de anelamento, Embrapa Trigo, 2010

Marcador	Sequência de nucleotídeos	Banda (pb)	T (°C) de anelamento	Referência
J071	TAAGCCGTAAAGCATGGTGCAC CTTCAACGAAATGTTTTCTCTTC	1000	61	Iqbal & Rayburn (1995)
SCM9	TGACAACCCCTTTCCCTCGT TCATCGACGCTAAGGAGGACCC	220	56	Saal & Wricke (1999)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *Sr31* foi extensivamente estudado e empregado em programas de melhoramento genético de trigo, pois condicionava resistência durável à ferrugem do colmo. Porém, em 1999, novas raças deste patógeno foram descritas, as quais conseguiram superar essa resistência. Uma destas novas raças, conhecida como Ug99, é altamente destrutiva e a presença do gene *Sr31* pode ser um indicativo de suscetibilidade destes genótipos a esta raça (PRETORIUS et al., 2000). A identificação da presença deste gene pode ser realizada utilizando-se diversas técnicas de biologia molecular e citogenética.

Os genótipos foram primeiramente avaliados via GISH, visando identificar a presença de translocações com o centeio (LIU et al., 2007; QI et al., 2008). Os resultados desta análise estão destacados na Tabela 2 e exemplificados na Figura 1.

Tabela 2 – Resultados para a presença (+) ou ausência (-) de translocações entre trigo e centeio via GISH, Embrapa Trigo, 2010

Genótipo	GISH	Genótipo	GISH
PF030132	-	PF9027	+
PF960258	+	PF010091	-
Frontana	-	PF010066P	+
PF970313	-	PF93318	-
BR23	+	PF010069	-
BR35	+	IPF70872P	-
Toropi	-	BRS Tarumã	-
IWT04019	+	PF970345	-
Alondra I	+	PF030401	+
PF030065	-	PF003295 A/B	+
PF001178	-	PF040488	+
IPF74231	-	PF979002	+
PF040453	-	PF940266	+
PF970339	+		

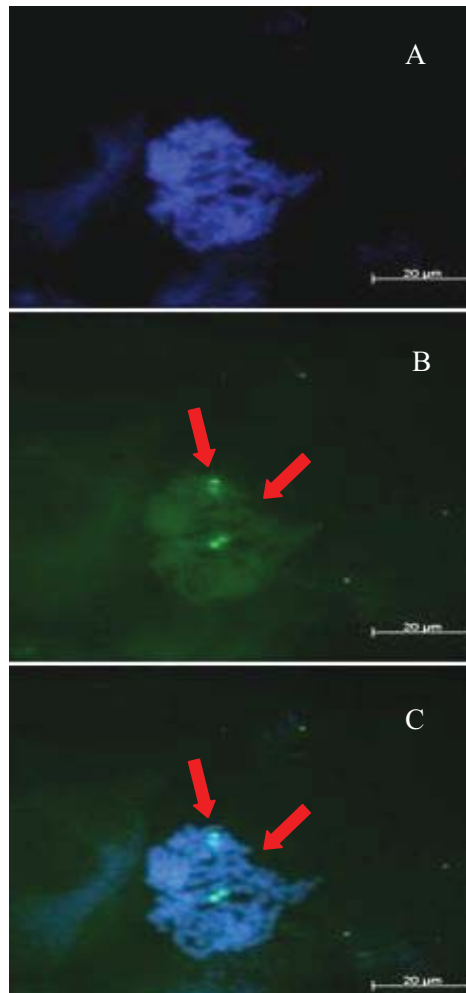


Figura 1 – Hibridização genômica *in situ* (GISH) em células de trigo ($2n = 6x = 42$), genótipo BR35, usando DNA de centeio como sonda (verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos em A foram contra-corados com DAPI (azul). Em seguida os mesmos foram corados com FITC (B) e, após, foi realizada a sobreposição de A e B (C).

A análise da tabela 2 mostra que para GISH os genótipos que apresentam translocações entre trigo e centeio são Alondra I, PF 960258, BR 23, BR 35, IWT 04019, PF 970339, PF 9027, PF 010066P, PF 030401, PF 003295 A/B, PF 040488, PF 979002 e PF 940266. A hibridização *in situ* tem sido utilizada com eficiência na detecção de segmentos cromossômicos introgrididos em trigo, inclusive, na localização de genes. Angelova & Georgiev (2006) utilizaram esta metodologia para detectar translocações envolvendo trigo e centeio, Tang et al. (2009b) associaram FISH e GISH na detecção da translocação 1BL.1RS, Qi et al. (2008) e Oliver et al. (2006) utilizaram esta metodologia na inferência e localização de características de interesse em trigo derivadas de *Thynopyrum ponticum*, a qual nestes casos, foi a resistência a *Fusarium graminearum* Schwabe. Angelova & Georgiev, relatam inclusive que GISH pode ser utilizada na avaliação de mutações no segmento introgridido (tamanho do segmento).

A identificação gênica a partir do uso dos marcadores moleculares específicos SCM9 e J071 é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Genótipos de trigo e resultados quanto a postulação de presença (+) ou ausência (-) do gene *Sr31* com a utilização dos marcadores moleculares SCM9 e J071, Embrapa Trigo, 2010

Genótipo	SCM9	J071	Genótipo	SCM9	J071
PF030132	-	-	PF9027	+	+
PF960258	+	-	PF010091	-	-
Frontana	-	-	PF010066P	+	+
PF970313	-	-	PF93318	-	-
BR23	+	-	PF010069	-	-
BR35	+	+	IPF70872P	-	-
Toropi	-	-	BRS Tarumã	-	-
IWT04019	+	+	PF970345	-	-
Alondra I	+	+	PF030401	-	-
PF030065	-	-	PF003295 A/B	-	-
PF001178	-	-	PF040488	-	-
IPF74231	-	-	PF979002	+	+
PF040453	-	-	PF940266	+	+
PF970339	+	-			

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que os genótipos positivos, de acordo com o marcador SCM9, para o gene *Sr31* foram: Alondra I, PF 960258, BR 23, BR 35, IWT 04019, PF 970339, PF 9027, PF 010066P, PF 979002 e PF 940266. Contudo, para o J071, somente foram positivos os genótipos Alondra I, BR 35, IWT 04019, PF 9027, PF 010066P, PF 979002 e PF 940266. Assim, percebe-se que alguns genótipos foram positivos somente para o marcador SCM9, e não para o J071, indicando que para os genótipos em estudo o SCM9 apresentou maior eficácia na detecção do gene *Sr31* que o J071.

Sendo assim, verifica-se que todos os genótipos positivos para o SCM9 também foram positivos via GISH, confirmando que

estes são portadores do gene *Sr31*, proveniente da translocação 1BL.1RS.

Já as linhagens PF 030401, PF 003295 A/B e PF 040488, as quais foram positivas via GISH, apresentam outras translocações envolvendo trigo e centeio, que não a 1BL.1RS, pois nesta está presente o gene *Sr31*, o qual não foi identificado nestas linhagens por nenhum dos marcadores específicos utilizados neste estudo. A presença de outras translocações envolvendo estas espécies é comum, conforme descreve o estudo de Casassola & Brammer (2011).

A não identificação do gene *Sr31* através do marcador molecular J071, mostra que a eficiência deste marcador nos genótipos analisados não foi ideal, mas o marcador SCM9, apresentou elevada eficiência na identificação do referido gene (Tabela 4), sendo um marcador recomendável para esta finalidade (SCHNEIDER & MOLNÁR-LANG, 2009; YEDIAY et al., 2010).

A associação dos marcadores moleculares com a técnica de GISH aumentou consideravelmente o poder de detecção e a confiabilidade dos resultados (Tabela 4), sendo que esta estratégia metodológica deve ser a mais recomendada. Os resultados obtidos neste estudo confirmam, inclusive, a elevada dispersão do gene *Sr31* nos genótipos brasileiros de trigo, o qual está presente em 37% do germoplasma avaliado.

Tabela 4 – Genótipos de trigo e resultados quanto à postulação de presença (+) ou ausência (-) do gene *Sr31* com a utilização das técnicas de GISH e marcadores SSR, SCM9 e J071

Genótipo	GISH	SCM9	J071	Genótipo	GISH	SCM9	J071
PF030132	-	-	-	PF9027	+	+	+
PF960258	+	+	-	PF010091	-	-	-
Frontana	-	-	-	PF010066P	+	+	+
PF970313	-	-	-	PF93318	-	-	-
BR23	+	+	-	PF010069	-	-	-
BR35	+	+	+	IPF70872P	-	-	-
Toropi	-	-	-	BRS Tarumã	-	-	-
IWT04019	+	+	+	PF970345	-	-	-
Alondra I	+	+	+	PF030401	+	-	-
PF030065	-	-	-	PF003295 A/B	+	-	-
PF001178	-	-	-	PF040488	+	-	-
IPF74231	-	-	-	PF979002	+	+	+
PF040453	-	-	-	PF940266	+	+	+
PF970339	+	+	-				

4 CONCLUSÕES

- O marcador molecular SCM9 foi efetivo na detecção da presença do gene *Sr31* nos genótipos analisados;
- A técnica de GISH para a detecção do gene *Sr31* deve ser acompanhada por marcadores moleculares devido à presença de outras translocações envolvendo trigo e centeio;
- A utilização dos genótipos parcialmente resistentes à ferrugem da folha nos programas de melhoramento genético de trigo deve também levar em consideração a presença ou ausência do gene *Sr31* (resistência superada pela raça Ug99 de ferrugem do colmo);

- As técnicas de marcadores moleculares e de GISH podem ser utilizadas na detecção de fragmentos e genes introgridos com eficiência.

CAPÍTULO III

REAÇÃO EM CAMPO E POSTULAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO COLMO EM LINHAGENS DE TRIGO PARCIALMENTE RESISTENTES À FERRUGEM DA FOLHA

Alice Casassola¹, Sandra Patussi Brammer², Márcia Soares Chaves³, José Antônio Martinelli⁴, Sridhar Bhavani⁵

RESUMO – A busca pela resistência a doenças em genótipos cultivados tem sido o foco dos programas de melhoramento ao redor do mundo. A piramidização de genes, por sua vez, se constitui em uma das estratégias destes programas. O acúmulo de genes de resistência em uma cultivar aumenta seu potencial de defesa e o conhecimento de sua constituição genômica auxilia o melhorista na escolha dos parentais portadores de genes de interesse e facilita o entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência genética. Este trabalho objetivou avaliar em campo a resistência à ferrugem do colmo de 37 genótipos de trigo pertencentes a Embrapa Trigo e

¹ Farmacêutica, 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).

² Orientadora, Bióloga, Professora do PPGAgro, Pesquisadora da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

³ Coorientadora, Engenheira Agrônoma, Pesquisadora da Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

⁴ Colaborador, Engenheiro Agrônomo, Professor Associado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

⁵ Colaborador, Fitopatologista, pesquisador CYMMIT, Quênia/África Oriental.

postular via marcadores moleculares SSR a presença de cinco genes de resistência *Sr* (stem rust) à *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, para a caracterização gênica a partir de marcadores moleculares, e nos campos experimentais do Kenya Agricultural Research Institute (KARI) no Quênia/África, em colaboração com CYMMIT, para a avaliação em campo da reação à ferrugem do colmo. A postulação dos genes de resistência foi realizada por PCR com DNA extraído das folhas, pelo método CTAB, empregando seis marcadores moleculares microssatélites *Sr* específicos descritos na literatura. A resistência foi avaliada considerando a severidade e o tipo de infecção, sendo classificadas como resistentes, moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível. A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar que o acúmulo de genes é essencial para a expressão da resistência à ferrugem do colmo, porém nenhum dos genes estudados explica consideravelmente a resistência expressa nas linhagens avaliadas, indicando que outros genes estão envolvidos no mecanismo de defesa destes genótipos.

Palavras-chaves: *Puccinia graminis*, genes *Sr*, resistência genética, microssatélites, Ug99.

EVALUATION OF RESISTANCE AND POSTULATION OF RESISTANCE GENES TO STEM RUST IN WHEAT GENOTYPES BELONGING AT EMBRAPA WHEAT

Alice Casassola¹, Sandra Patussi Brammer², Márcia Soares Chaves³, José Antônio Martinelli⁴, Sridhar Bhavani⁵

ABSTRACT – The search for disease resistance in cultivated genotypes has been the focus of breeding programs around the world. The genes pyramiding, in turn, constitutes one of the strategies of these programs. The accumulation of resistance genes in a cultivar increases its defense capability and the knowledge of their genomic constitution helps the breeder in the choice of parental carrying genes of interest and facilitates the understanding of the mechanisms involved in the genetic defense. This study aimed to evaluate the resistance in field to stem rust of 37 wheat genotypes belonging to Embrapa Wheat and to postulate the presence of five resistance genes *Sr* (stem rust) to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* using microsatellite molecular markers. The genetic characterization experiments were carried out in the Biotechnology Laboratory of Embrapa Wheat using six molecular markers. The field trials were conducted at experimental fields of

¹ Pharmaceutical, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine (PPGAgro) – University of Passo Fundo.

² Advisor, Biologist, faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo. Researcher at Embrapa Wheat.

³ Co-advisor, Agronomist, researcher at Embrapa Wheat.

⁴ Collaborator, Agronomist, Faculty member of Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS.

⁵ Collaborator, Phytopathologist, researcher at CYMMIT, Kenya/Oriental Africa.

Kenya Agricultural Research Institute (KARI), Africa in collaboration with CIMMYT, to evaluate the reaction to wheat stem rust. The postulation of resistance genes was performed using PCR reactions with DNA extracted from the leaves, as CTAB protocol, using specific microsatellite molecular markers for stem rust described in the literature. Considering the severity and the infection type, genotypes were classified as resistant, moderately resistant, moderately susceptible and susceptible. The results obtained showed that the accumulation of genes is essential for the expression of resistance to stem rust, but none of the genes studied explains considerably the resistance expressed in the genotypes, indicating that other genes are involved in the resistant mechanism of these genotypes.

Key words: *Puccinia graminis*, *Sr* genes, genetic resistance, microsatellite, Ug99.

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem do colmo do trigo é causada pelo fungo *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* e é uma das grandes preocupações mundiais pelo potencial de danos, dispersão e especialização deste fungo. Muitas raças de ferrugem do colmo apareceram desde 1983, sendo que 23 são relatadas no leste da África (PRETORIUS, 2000).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência e a descoberta de novos genes tem sido de extrema importância na contenção desta doença. Em torno de 50 genes *Sr* já foram descritos e mapeados (MCINTOSH et al., 2008), contudo os relacionados com a resistência de planta adulta (RPA) são os de maior interesse. Os genes de RPA parecem estar presentes no pool gênico secundário do trigo, em espécies silvestres e/ou relacionadas. Estas espécies são um reservatório de genes de resistência, que podem ser transferidos a partir de translocações para o trigo cultivado (CASASSOLA & BRAMMER, 2011).

A raça Ug99 deste fungo é uma das mais virulentas. Segundo o sistema norte Americano de nomenclatura (ROELFS & MARTENS, 1988), cinco patótipos são descritos TTKSF, TTKSK, TTKSP, TTKST e TTTSK (JIN et al., 2008). Genes tais como o *Sr2*, *Sr22*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr27*, *Sr29*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr34*, *Sr35*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr42*, *Sr43*, *Agi*, e *Em* ainda possuem efetividade. Contudo a especialização deste patógeno está tornando-o cada vez mais virulento, suplantando a resistência conferida anteriormente por vários outros genes como o *Sr5*, *Sr6*, *Sr7b*, *Sr8a*, *Sr8b*, *Sr9b*, *Sr9e*, *Sr9g*, *Sr11*, *Sr15*, *Sr17*, *Sr30*, *Sr31* e *Sr38* (PRETORIUS et al., 2000).

Recentemente, outros genes, tiveram sua resistência superada tal como o *Sr21* (JIN et al., 2007), *Sr24* (JIN et al., 2008a) e *Sr36* (JIN et al., 2008b).

Os genes *Sr2*, *Sr22*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr39* e *Sr45* ainda possuem efetividade contra a raça Ug99. Destes, o gene *Sr2*, se destaca, pois confere uma resistência conhecida como “slow-rusting”, em virtude do longo período de latência da infecção até o completo desenvolvimento da epidemia ou esporulação. Este, combinado com outros genes ainda desconhecidos, formam o conhecido complexo-*Sr2*, o qual confere resistência durável contra a ferrugem do colmo (MCINTOSH, 1988; RAJARAM et al., 1988). O gene *Sr2* é o único dos 50 genes *Sr* descritos que possui a particularidade de conferir resistência de planta adulta. Algumas cultivares que possuem este complexo são Thatcher, Chris, Pavon 76, Parula, Kritati, Kingbird e Hofed (SINGH et al., 2008).

Knott (1988) relata que neste complexo estão envolvidos aproximadamente cinco genes menores. Este acúmulo de quatro a cinco genes retardam o progresso da doença a taxas insignificantes durante a maturação, o que foi chamado de “reação de quase imunidade” por Singh et al. (2000). A resistência de planta adulta conferida por múltiplos genes menores é considerada a melhor estratégia para prevenir e retardar a evolução/disseminação deste fungo.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar 37 genótipos de trigo quanto à resistência a ferrugem do colmo e caracterizá-los geneticamente quanto à presença de genes de resistência a esta doença, visando auxiliar os programas de

melhoramento, fornecendo uma caracterização detalhada dos genótipos e, conseqüentemente, facilitando a obtenção de cultivares com resistência durável a ferrugem do colmo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 MATERIAL VEGETAL

As plantas utilizadas foram selecionadas após oito anos de avaliação em campo para resistência à ferrugem da folha. Estas plantas foram avaliadas quanto à resistência à ferrugem do colmo e foram caracterizadas quanto à presença de genes *Sr* a partir do uso de marcadores moleculares.

Ao total foram selecionadas 37 linhagens para este estudo: PF 979002, PF 010255, PF 022203, PF 93158, PF 9127, IWT 04019, PF 91620, PI 181337, PF 9199, PF 973443, PF 9099, PF 010161, PF 89326, PF 940110, PF 940305, PF 970346, PF 962001, PF 980416, PF 020458, PF 940290, PF 020450, PF 010069, PF 950419, PF 960258, PF 980414, PF 010089, PF 8776, PF 922, PF 909, PF 92393, PF 990522, PF 001162, PF 030065, PF 030132, PF 970339, PF 970345 e PF 970354.

2.1.2 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares utilizados foram selecionados a partir de revisão de literatura, procurando agrupar o maior número de marcadores para genes *Sr* disponíveis. Desta revisão foram selecionados 6 marcadores, um ou dois para cada gene dependendo da

eficácia e acurácia na detecção do gene *Sr* para o qual fora desenhado. As informações relativas a cada marcador selecionado estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Marcadores moleculares para genes os *Sr* e sua respectiva sequência, Embrapa Trigo, 2011

Marcador/Primer	Gene	Sequência de Nucleotídeos	Referência
Sr2 csSr2-F	<i>Sr2</i>	CAAGGGTTGCTAGGATTGGAAAAC	Mago et al. (2011)
Sr2 csSr2-R		AGATAACTCTTATGATCTTACATTTTCTG	
Sr24#12-F	<i>Sr24</i>	CACCCGTGACATGCTCGTA	Mago et al. (2005)
Sr24#12-R		AACAGGAAATGAGCAACGATGT	
Sr25 PSY1_DF2	<i>Sr25</i>	TTGCAGTGCAATGGTTTCCA	Zhang & Dubcovsky (2008)
Sr25 PSY1_R3		GACTCCTTGACGATGTCTTC	
SECA2	<i>Sr31/Lr26</i>	GTTTGCTGGGGAATTATTG	De Froidmont (1998)
SECA3		TCCTCATCTTTGTCCTCGCC	
O11B3	<i>Sr31/Lr26</i>	GTTGCTGCTGAGGTTGGTTC	De Froidmont (1998)
O11B5		GGTACCAACAACAACAACCC	
URIC	<i>Sr38/Lr37</i>	GGTCGCCCTGGCTTGCACCT	Helguera et al. (2003)
LN2		TGCAGCTACAGCAGTATGTACACAAAA	

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Avaliação da resistência

Os testes de reação em condições de campo foram conduzidos no Kenya Agricultural Research Institute (KARI), no Quênia, África, com a colaboração do Centro Intenacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT). Nesta região as raças da linhagem Ug99 ocorrem em alta frequência, conforme mostra a Figura 1 (FAO, 2010). As parcelas de cada genótipo constituíram-se de 2 linhas de 1 m, sendo que parcelas disseminadoras de inóculo (genótipos suscetíveis) foram intercaladas com os genótipos cuja

reação seria testada. As avaliações foram realizadas no dia 18 de abril de 2011, quando as plantas estavam no estágio de grão leitoso, no momento em que as parcelas disseminadoras atingiram 80-90% de severidade, garantindo a alta pressão de inóculo. Foram avaliados a severidade (percentual de área foliar afetada) e tipo de infecção, conforme Roelfs et. al (1992).

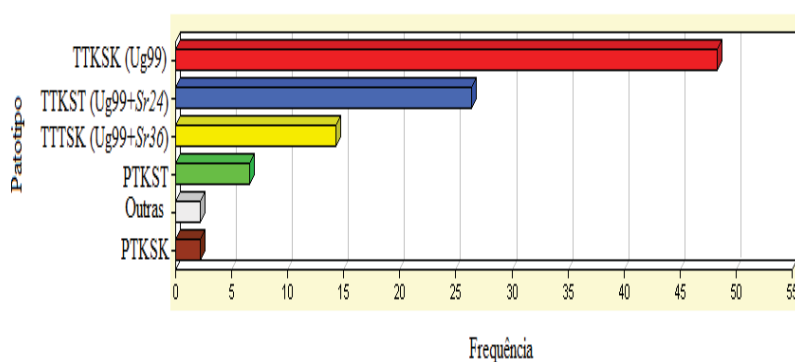


Figura 1 – Frequência de patótipos amostrados no Quênia nos anos de 2007, 2008 e 2009. Total de isolados: 91. Adaptado de FAO (2010).

2.2.2 Postulação dos genes *Sr* via marcadores moleculares

2.2.2.1 Extração do DNA

As sementes foram germinadas em papel Gemitest, e o tecido foliar jovem foi coletado e o DNA extraído segundo método CTAB, adaptado por Bonatto (2008). Das sementes que não germinaram, o DNA foi extraído diretamente das sementes seguindo o protocolo CTAB para extração de grãos, com modificações.

2.2.2.2 Reações de PCR e migração das amostras

Para todos os primers testados foi utilizada a mesma reação de PCR as quais foram realizadas em termociclador GeneAmp Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems - ABI) utilizando a programação touchdown 60-55°C que segue: 1 ciclo a 94°C/3min; 5 ciclos a 94°C/1min, 60°C/1min (neste passo a cada ciclo se diminui 1°C até 55°C), 72°C/1min; 30 ciclos a 94°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min e 1 ciclo a 72°C/10min.

As reações para cada amostra utilizaram 1,5µl de tampão 10X, 0,75µl de MgCl₂ a 50mM, 1,2µl de DNTP a 10mM, 0,3µl do MIX (forward e reverse) do primer a 10mM, 4µl de DNA a 25mM, 0,15µl de taq polimerase e completou-se o volume com água deionizada para 15µl de reação.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo, a 130V por 1h30m. A visualização dos géis foi realizada em fotodocumentador digital GelDoc XR+ (Bio-Rad) e as fotografias armazenadas em formato .pdf.

2.2.2.3 Determinação dos controles positivos

Para a determinação dos controles positivos para os genes *Sr*, foi realizada uma revisão de literatura para busca dos mesmos. Todos os genótipos descritos como controles positivos com sementes disponíveis na Embrapa Trigo, foram testados com o marcador molecular respectivo ao gene para o qual este foi recomendado como controle. Foram selecionados como controles positivos os genótipos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Padrões para os genes *Sr* em estudo, Embrapa Trigo, 2011

Genótipo	Gene <i>Sr</i>	Genótipo	Gene <i>Sr</i>
Gatcher	<i>Sr2</i>	TC-Lr26	<i>Sr31</i>
FB 7260 (Chinese Spring /Hope 3B)	<i>Sr2</i>	FB7259 (RL6078=Federation*4/Kavkaz)	<i>Sr31</i>
Sr24	<i>Sr24</i>	RL 6078 (Fed*4/KVZ)	<i>Sr31</i>
PF 869003 (IAC5*6/Agent)	<i>Sr24</i>	Sr31	<i>Sr31</i>
Agent	<i>Sr24</i>	Alondra 1	<i>Sr31</i>
Baart	<i>Sr24</i>	Kavkaz	<i>Sr31</i>
RL 6064	<i>Sr24</i>	FB 4201 (Aroona*6/VPM1)	<i>Sr38</i>
PF 86555 (Agatha)	<i>Sr25</i>	FB 4204 (VPM1*4/Spear)	<i>Sr38</i>
RL 6040	<i>Sr25</i>	T. 66961 (Bindawarra*4/VPM1)	<i>Sr38</i>
PF 85743	<i>Sr25</i>	T.50130 (Cook*4/VPM1)	<i>Sr38</i>
PF 86863	<i>Sr25</i>	RL 6081 (TC*6/VPM1)	<i>Sr38</i>
PF 86864	<i>Sr25</i>	Sr38	<i>Sr38</i>
CI 13384	<i>Sr25</i>		
CI 14048	<i>Sr25</i>		

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da Resistência

Os genótipos testados apresentaram grande amplitude de resposta à ferrugem do colmo variando de total imunidade a completa suscetibilidade. A Tabela 3 apresenta a reação para cada genótipo avaliado. Estes foram classificados conforme a reação nos seguintes grupos: resistentes (completa imunidade, nota zero), moderadamente resistentes (RMR), moderadamente suscetíveis (MSS) e suscetíveis (S).

Tabela 3 – Genótipos de trigo, sua classificação quanto à reação de resistência à ferrugem do colmo e quanto à postulação de presença (+) ou ausência (-) dos genes *Sr*

Reação	Genótipo	<i>Sr2</i>	<i>Sr24</i>	<i>Sr25</i>	<i>Sr31</i> (SECA2/3)	<i>Sr31</i> (O11B3/5)	<i>Lr37/Sr38</i>
Resistentes/ Imunes	PF 950419	+	-	-	+	-	+
	PF 010069	+	+	+	+	-	+
	PF 020450	-	+	+	-	+	+
	PF 940290	+	-	-	+	+	+
	PF 960258	+	-	+	+	+	+
	PF 020458	-	+	+	+	+	+
Resistentes/ Moderadamente resistentes	PF 980414	+	+	+	+	+	+
	PF 010089	+	-	-	+	-	+
	PF 8776	+	-	-	+	+	+
Moderadamente suscetíveis	PF 001162	+	-	+	+	-	+
	PF 970354	+	-	-	+	+	+
	PF 030065	+	-	+	+	-	+
	PF 922	+	-	+	+	+	+
	PF 970339	+	+	+	+	+	+
	PF 030132	+	-	-	+	-	+
	PF 970345	+	-	-	+	+	+
	PF 92393	+	-	+	-	-	+
	PF 990522	+	-	+	+	+	+
	PF 980416	+	+	+	+	-	+
	PF 962001	-	-	-	+	-	+
	PF 940110	+	-	-	+	-	+
	PF 970346	+	-	-	+	-	+
	PF 89326	+	-	-	+	-	+
PF 940305	+	-	-	+	+	+	
Suscetíveis	PF 909	+	-	+	+	+	+
	PF 9099	+	-	-	+	+	+
	PF 010161	-	-	-	-	+	+
	PF 9199	+	-	-	+	+	+
	PF 973443	+	-	-	-	+	+
	IWT 04019	+	-	-	+	+	+
	PF 9127	-	-	+	-	+	+
	PF 91620	+	-	-	+	+	+
	PF 93158	+	-	-	+	+	+
	PI 181337	+	-	+	+	-	+
	PF 010255	+	-	+	-	+	+
	PF 979002	+	-	-	+	+	+
PF 022203	+	-	-	+	-	+	

3.2 Avaliação da presença ou ausência dos genes *Sr*

Os resultados de postulação da presença (+) ou ausência (-) dos genes *Sr* estão ilustrados na Tabela 3. Cada gene avaliado será discutido isoladamente a seguir.

Sr2

O gene *Sr2* foi introgridido no trigo a partir de *Triticum turgidum* em 1920, e está localizado no braço curto do cromossomo 3B de *T. aestivum* L. Este gene é extensivamente estudado pelos programas de melhoramento por conferir resistência parcial contra todos os patotipos de ferrugem do colmo, porém somente no estado homozigoto e recessivo (MCINTOSH, 1988; RAJARAM et al., 1988). Em virtude desta importância a identificação da presença deste gene se constitui numa estratégia bastante utilizada nos programas de melhoramento genético de trigo.

A identificação deste gene pode ser realizada pela associação com a ocorrência de “pseudo black chaff”, um marcador fenotípico, no qual há um acúmulo de pigmentação nos colmos e glumas, geralmente expresso em determinadas condições ambientais. Porém, um processo mais rápido e preciso de seleção é a utilização de marcadores moleculares associados ou ligados a genes de interesse (PRETORIUS et al., 2000; KOTA et al., 2006).

Diversos marcadores moleculares SSR já foram desenvolvidos, porém o *csSr2*, desenvolvido por MAGO et al. (2011), mostrou 95% de eficiência, demonstrando-se superior na detecção que os demais. Este marcador amplifica um fragmento de 337pb, e segundo os autores, diferentes alelos podem ser diferenciados se este

segmento de DNA for clivado com a enzima de restrição BspHI, gerando três fragmentos (172, 112 e 53pb) em alelos derivados de Chinese Spring e dois fragmentos (225 e 112pb) em alelos derivados de Yaroslav Emmer. Os resultados obtidos pelo uso do marcador csSr2 neste estudo estão ilustrados na Figura 2 e descritos na Tabela 1.

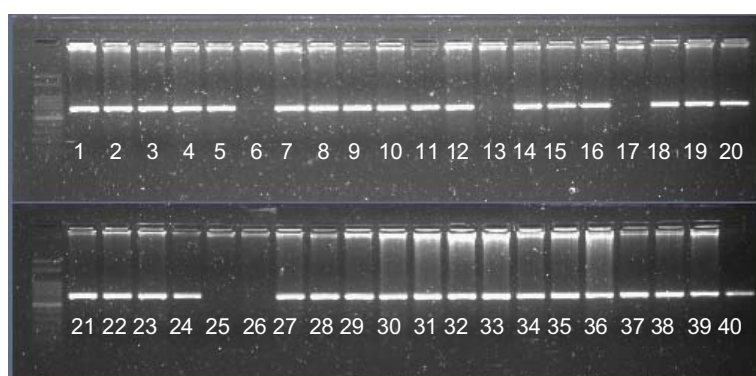


Figura 2 – Marcador molecular csSr2, gel de agarose 2%. Banda de presença de 337pb. Ladder 50pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição).

Diversas linhagens utilizadas neste trabalho se mostraram resistentes à ferrugem do colmo, contudo, algumas não apresentaram o gene *Sr2*, tais como a PF020450 e PF020458, e algumas altamente suscetíveis possuem o gene *Sr2*, tais como PF979002, PF022203 e PF010255, indicando que a presença deste gene não é determinante na predição da resistência ou suscetibilidade (MAGO et al., 2011).

Pretorius et al. (2000) relatam, inclusive, que a resistência conferida pelo gene *Sr2* é influenciada pela pressão de inóculo.

Sr24

O gene *Sr24* foi introgridido no trigo cultivado a partir de translocações envolvendo o cromossomo 3Ag, de *Agropyron elongatum*, e o braço longo do cromossomo 3D de *T. aestivum*, na cultivar Agent, e o braço curto do cromossomo 1B, na cultivar Amigo (THE et al., 1992). Nestas translocações encontra-se ligado ao gene *Sr24*, o gene *Lr24*, que confere resistência à ferrugem da folha e propicia a formação de grãos vermelhos. Linhagens recombinantes desenvolvidas por SEARS (1973) quebraram a ligação existente entre o *Sr24* e o gene que codifica a coloração dos grãos, assim é possível encontrar linhagens positivas para este gene com colorações de grãos diversas.

Virulência a este gene já foi descrita na África e na Índia, pela raça TTKST (LE ROUX, 1985; BHARDWAJ et al., 1990; PARK et al., 2002), sendo essencial sua identificação no germoplasma. Não existem marcadores fenotípicos para o gene *Sr24*, e, por isso, a detecção deste gene precisa ser feita via marcadores moleculares. Existem diversos marcadores moleculares descritos, dentre eles podemos citar o Sr24#12, o qual está associado ao gene *Sr24* proveniente da translocação *3Ag/1BS* (MAGO et al., 2005). O marcador molecular Sr24#12 amplifica um fragmento de 500pb, conforme mostra a Figura 3.

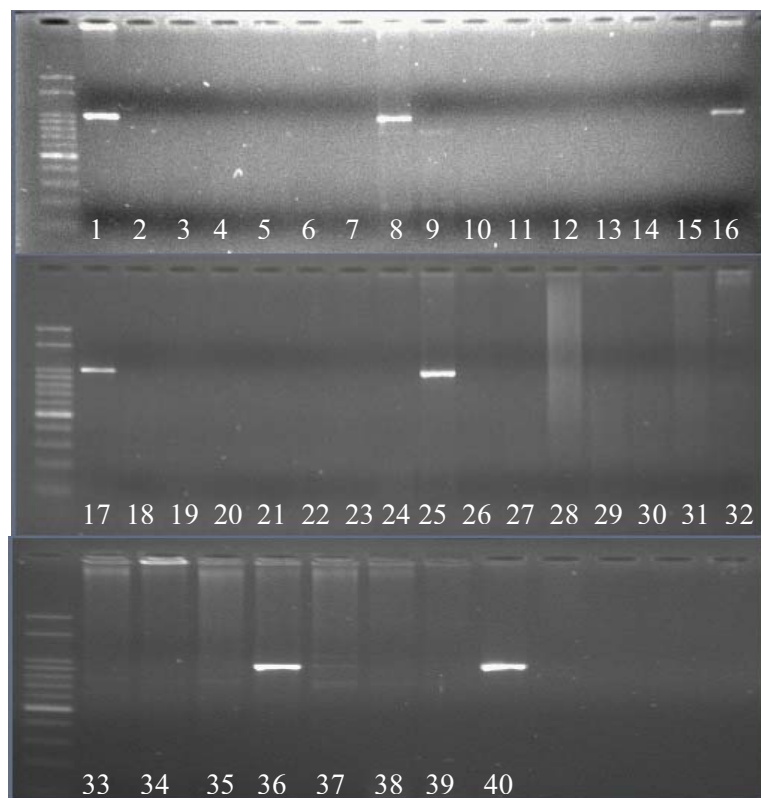


Figura 3 – Amplificação via PCR do marcador molecular Sr24#12. Os produtos foram separados em gel de agarose 2%. Ladder 50pb. A banda de 500pb é característica da presença do gene *Sr24*. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição).

Sr25

O gene *Sr25* foi transferido para o trigo a partir de *Thinopyrum ponticum* Barkworth & Dewey e apresenta efetividade

contra diversas raças de ferrugem do colmo, inclusive contra Ug99. Este gene é ligado ao *Lr19*, e estão localizados no cromossomo 7D (FRIEBE et al.,1994) e 7A de *T. aestivum* (ZHANG et al., 2005b). A transferência deste gene se constitui numa estratégia importante aos programas de melhoramento, porém este cluster carrega outros genes que ocasionam um decréscimo na qualidade da farinha.

O marcador utilizado neste estudo para identificação do gene *Sr25* foi PSY-D1 (PSY1_DF2/PSY1_R3), o qual é ligado ao gene de síntese do fitoeno, *PSY-E1* (phytoene synthase I) (ZHANG & DUBCOVSKY, 2008). Este marcador amplifica um fragmento de 175pb nos genótipos positivos, conforme evidenciado na Figura 4.

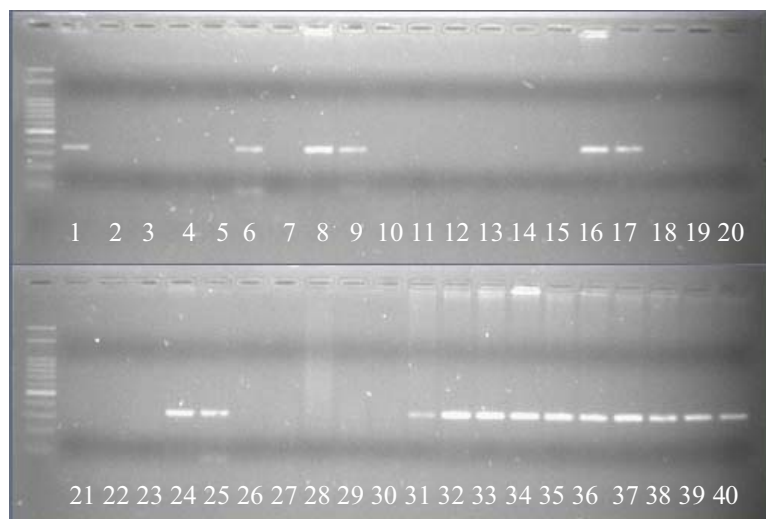


Figura 4 – Gel de agarose 2%. Primer PSY-D1 (PSY1_DF2/R3 - P4). Bandas de presença 175pb. Ladder 50pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição).

Sr31

Diversos isolados de *P. graminis* apresentam virulência ao gene *Sr31*, em especial a raça Ug99 (PRETORIUS et al., 2000). Este gene está presente no trigo em virtude da ocorrência de translocação envolvendo o braço longo do cromossomo 1B de *T. aestivum* e o braço curto do cromossomo 1R do centeio, conhecida como 1BL.1RS (CASASSOLA & BRAMMER, 2011).

Esta virulência torna necessária sua detecção em genótipos brasileiros, para que se possa evitar a disseminação desta doença para

dentro do país, evitando-se o uso de genótipos portadores. A identificação deste gene pode ser realizada utilizando-se marcadores moleculares específicos para a translocação 1BL.1RS, dos quais se destacam o SECA2/SECA3, ligado ao gene da secalinas, que amplifica um fragmento de 412pb, e o O11B3/B5, que amplifica um fragmento de 636pb, conforme mostra as Figura 5 e 6 respectivamente (DE FROIDMONT, 1998).

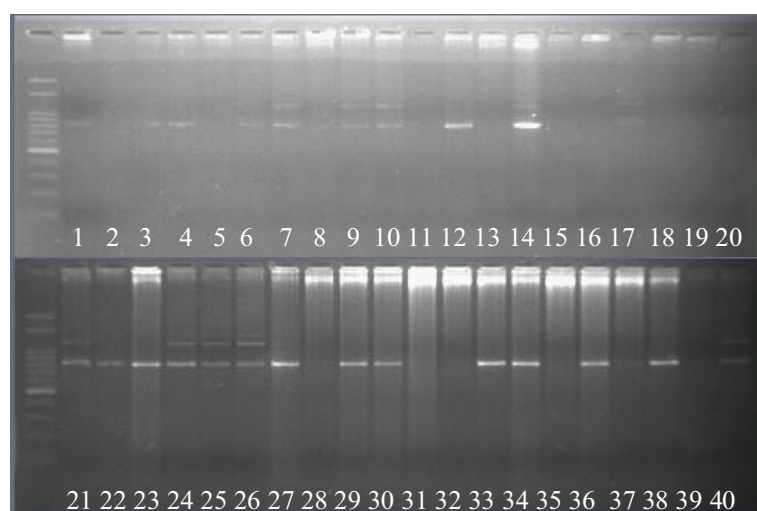


Figura 5 – Marcador molecular SECA2/SECA3. Gel de agarose 2%, banda de presença de 412pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição).

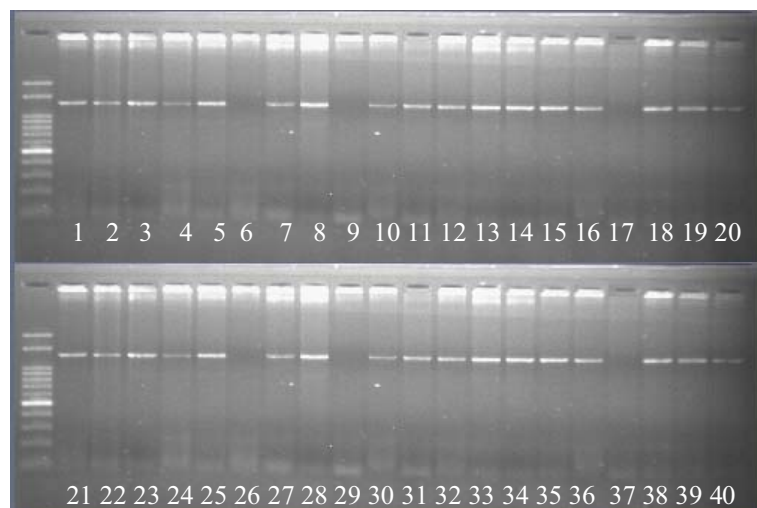


Figura 6 – Marcador molecular O11B3/O11B5. Gel de agarose 2%, banda de presença de 636pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição).

As Figuras 5 e 6 evidenciam que alguns genótipos positivos para o marcador SECA2/3 não foram positivos para o marcador O11B3/5 e vice-versa. A explicação desta divergência entre os marcadores pode ser explicada pela quebra da ligação na translocação entre o gene *Sr31* e os genes que codificam as secalinas (para os quais o marcador SECA2/3 fora desenvolvido), conforme descreve Yan et al. (2005), os quais identificaram uma translocação 1BL.1RS com o gene *Sec-1* deletado, favorecendo essa translocação.

Sr38

O gene de resistência à ferrugem do colmo *Sr38* faz parte de um cluster gênico composto por mais dois genes de importância agrônômica, o *Yr17* e *Lr37*, efetivos contra ferrugem amarela e ferrugem da folha, respectivamente (ROBERT et al., 1999; SEAH et al., 2001). Este gene foi transferido para *T. aestivum* a partir da translocação 2NS.2AS, envolvendo a espécie *T. ventricosum* (BARIANA & MCINTOSH, 1993; MCINTOSH et al., 1995).

O marcador molecular URIC/LN2 foi desenhado para amplificar dois alelos diferentes da translocação 2NS.2AS, o N, que gera um fragmento de 285pb e o A, de 275pb, podendo ser utilizado na seleção assistida de materiais (HELGUERA et al., 2003). Sendo assim, a utilização deste marcador nas linhagens em estudo está ilustrada na Figura 7.

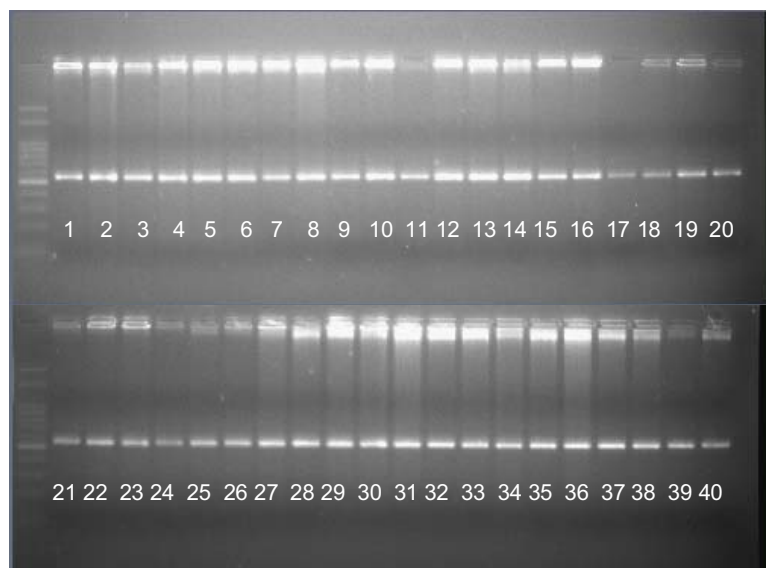


Figura 7 – Marcador molecular URIC/LN2 para identificação do cluster gênico *Sr38/Yr17/Lr37*. Gel de agarose 2%, ladder 50pb. Genótipos: 1. PF 980414, 2. PF 950419, 3. PF 8776, 4. IWT 04019, 5. PF 940110, 6. PF 9127, 7. PF 91620, 8. PF 980416, 9. PF 010255, 10. PF 9199, 11. PF 010089, 12. PF 9099, 13. PF 962001, 14. PF 979002, 15. PF 970346, 16. PF 010069, 17. PF 020450, 18. PF 022203, 19. PF 89326, 20. PF 940290, 21. PF 973443, 22. PF 93158, 23. PF 940305, 24. PF 960258, 25. PF 020458, 26. PF 010161, 27. IWT 04019 (repetição), 28. PF 030132, 29. PF 970354, 30. PF 970345, 31. PF 92393, 32. PF 030065, 33. PF 922, 34. PF 990522, 35. PF 001162, 36. PF 970339, 37. PF 030065 (repetição), 38. PF 909, 39. PI 181337, 40. PF 970339 (repetição).

4 CONCLUSÕES

- Genes de resistência efetivos foram postulados em genótipos suscetíveis e genes superados pela raça Ug99 foram postulados em genótipos resistentes indicando interações gênicas na expressão do fenótipo bem como o envolvimento de outros genes de resistência não determinados;
- A suscetibilidade das linhagens com presença de genes efetivos pode ser explicada pela alta pressão de inóculo associada com ambiente favorável ao desenvolvimento da doença e/ou pela presença de outras raças ainda não descritas;
- A presença do gene *Sr31* não foi determinante na inferência de resistência ou suscetibilidade à ferrugem do colmo, pois genótipos resistentes postularam positivamente para este gene bem como os suscetíveis.

5 PERSPECTIVAS

A validação destes marcadores moleculares para utilização na seleção assistida no programa de melhoramento genético de trigo da Embrapa será realizada futuramente utilizando-se como controles positivos os genótipos nos quais os marcadores moleculares foram desenvolvidos.

Outros marcadores moleculares específicos para genes *Sr* serão testados nestas linhagens visando explorar e elucidar os mecanismos de resistência envolvidos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho buscou identificar genótipos promissores de trigo, visando a sua utilização no programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo, além de gerar informações relevantes aos melhoristas na seleção de parentais, facilitando o processo de obtenção de novas cultivares, com maior produtividade e resistência durável. Foram gerados resultados importantes neste estudo, contudo as análises irão continuar, pois todo o potencial presente nestes genótipos ainda não foi explorado. Novas avaliações em campo, bem como a identificação de novos e/ou a confirmação de genes de resistência já identificados, ainda serão realizadas nestes genótipos, buscando explorar o maior conteúdo de informações possível sobre eles.

Apesar disto, verificou-se que vários genótipos avaliados neste estudo apresentam características agronômicas de interesse, podendo ser utilizados de imediato nos programas de melhoramento. Cabe ao melhorista avaliar e escolher adequadamente a caracterização fornecida e o caractere desejado.

Neste sentido, o conhecimento dos genes de resistência e uma caracterização agronômica bem realizada, otimizam um programa de melhoramento genético, diminuindo o período de tempo necessário na escolha dos parentais, uma vez que estes são selecionados com mais eficiência e com base no genótipo.

Portanto, a continuação da caracterização fenotípica e genotípica destes materiais será realizada nas dependências da Embrapa Trigo, em Passo Fundo/RS, em parceria com a Universidade

Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre/RS, possibilitando uma maior compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos, quanto à resistência às ferrugens da folha e do colmo em trigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITRIGO – Associação Brasileira de Indústria do Trigo. Disponível em:

<<http://www.abitrigo.com.br/download.asp?cdnivel=157&nivel=2.1.1>

>. Acesso em: 08 abr. 2010.

ACHTAR, S.; MOUALLA, M.Y.; KALHOUT, A.; RODER, M.S.; MIRALI, N. Assessment of genetic diversity among Syrian durum (*Triticum ssp. durum*) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR Markers. *Russian Journal of Genetics*, Moscou, v. 46, n. 11, p. 1320-1326, 2010.

ALMEIDA, A.B.; CHAVES, M.S.; BRAMMER, S.P.; BAGGIO, M.I. Identificação de fontes de resistência à ferrugem da folha do trigo em acessos de *Aegilops tauschii*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 32, n. 4, p. 349-352, 2007.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. *Approved Methods of the AACC*, 10^a ed. Métodos 39-70A. St. Paul, Minn.: The Association. 2000.

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

ARAÚJO, J.A.C.; CASTELLANE, P.D. Recentes avanços da pesquisa agrônômica na plasticultura brasileira. In: ARAÚJO, J.A.C.; CASTELLANE, P.D. *Plasticultura*. Jaboticabal: FUNEP, p. 41-52, 1991.

AYALA-NAVARRETE, L.; BARIANA, H.S.; SINGH, R.P.; GIBSON, J.M.; MECHANICOS, A.A.; LARKIN, P.J. Trigenomic chromosomes by recombination of *Thinopyrum intermedium* and *Th. Ponticum* translocations in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 116, n. 1, p. 63-75, 2007.

BACALTCHUK, B.; CHAVES, M.S.; LIMA, M.I.P.M.; COSTAMILAN, J.L.N.M.; SALVADORI, J.R.; GAMBATTO, A. *Características e cuidados com algumas doenças do trigo*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 11p. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do64.htm>. Acesso em: 10 abr. 2010.

BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. *Science Magazine*, Washington, v. 276, n. 5313, p. 726-733, 1997.

BARBIERI, ROSA L.; STUMPF, ELISABETH R.T. *Origem e Evolução de Plantas Cultivadas*. Brasília, Editora Embrapa, 2008. 909p.

BARCELLOS, A.L.; ROELFS, A.P.; MORAES-FERNANDES, M.I.B. Inheritance of adult plant leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar Toropi. *Plant Disease*, [S.l.], v. 84, n. 1, p. 90-93, 2000.

BARCELLOS, A.L.; ARDUIM, G.S. Desafiadoras. Cultivar Grandes Culturas. *Cultivar*, Pelotas, v. 11, n. 116, p. 9-11, 2009. Disponível em: <<http://www.orsementes.com.br/upload/artigo/53.pdf>>. Acesso em: 25 mai. 2010.

BARCELLOS, A. Raça do agente causal de ferrugem-do-colmo assusta países produtores de trigo. *Revista Plantio Direto*, Passo Fundo, v. 122, 2011. Documento on-line. Disponível em: <www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=1036>. Acesso em: 06 jan. 2011.

BARIANA, H.S.; MCINTOSH, R.A. Cytogenetic studies in wheat. XV. Location of rust resistance genes in VPM1 and their genetic linkage with other disease resistance genes in chromosome 2A. *Genome*, Toronto, v. 36, n. 3, p. 476-482, 1993.

BARIANA, H.S.; BROWN, G.N.; BANSAL, U.K.; MIAH, H.; STANDEN, G.E.; LU, M. Breeding triple rust resistant wheat cultivars for Australia using conventional and marker-assisted selection technologies. *Australian Journal of Agricultural Research*, [S.l.], v. 58, n. 6, p. 576-587, 2007.

BERED, F.; BARBOSA-NETO, J.F.; CARVALHO, F.I.F. Genetic variability in common wheat germplasm based on coefficients of parentage. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 211-215, 2002.

BHARDWAJ, S.C.; NYAR, S.K.; PRASHAR, M.; KUMAR, J.; MENON, M.K.; SINGH, S.B. A pathotype of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on *Sr24* in India. *Cereal Rusts Powdery Mildew Bull*, [S.l], v. 18, n. 1, p. 35-38, 1990.

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

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, [S.l], v. 32, p. 314-331, 1980.

BRAMMER, S.P. *Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7p. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm>. Acesso em: 8 mar. 2010.

BRAMMER, S.P.; BARCELLOS, A.L.; MORAES-FERNANDES, M.I.B.; MILACH, S.K. Bases genéticas da resistência durável à ferrugem da folha do trigo e estratégias biotecnológicas para o melhoramento no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, p. 5-20, 2000.

BRAMMER, S.P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 13 p. Documentos On-line. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm>. Acesso em: 24 jul. 2010.

BRAMMER, S.P.; MARTINELLI, P.; MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; PRESTES, A.M.; ANGRA, D.C. A potencialidade de *Agropyron*, espécie afim ao trigo cultivado, como fonte de

introgressão de genes agronomicamente importantes. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 8 p. html. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do08.htm>. Acesso em: 14 jul. 2011.

BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; ANDRÉIA CAVERZAN, A. *Citogenética vegetal: da era clássica à molecular*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 9p. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm>. Acesso em 25 mai. 2010b.

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 Trigo, 2009. 15p. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co270.htm>. Acesso em: 20 mar. 2010.

BRAMMER, S.P.; WIETHOLTER, P.; CHAVES, M.S.; VOOSS, A.T. Otimização do método de extração de DNA genômico de *Puccinia triticina*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. 8 p. html. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co287.htm>. Acesso em: 20 mai. 2011.

BROWN, W. Genetic diversity and genetic vulnerability - an appraisal. *Economic Botany*, Frostburg, v. 37, n. 1, p .4-12, 1983.

BRUM, A.L.; MÜLLER, P.K. A realidade da cadeia do trigo no Brasil: o elo produtores/cooperativas. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Brasília, v. 46, n. 1, p. 145-169, 2008.

CALDEIRA, M.T.M; LIMA, V.L.A.; SEKI, H.A.; RUMJANEK, F.D. Trigo. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, [S.l.], v. 16, p. 44-48, 2000.

CAMINHAS, M.M.T.; BERTOLOZZI, J.; CHAMMA, O.S.; CURI, P.R. Grupos sanguíneos de bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 27, n. 8, p. 1195-1200, 1992.

CAO, W.; HUCL, P.; SCOLES, G.; CHIBBAR, R.N. Genetic diversity within spelta and macha wheats based on RAPD analysis. *Euphytica*, Wageningen, v. 104, n. 3, p. 181-189, 1998.

CASASSOLA, A.; BRAMMER, S.P. Chromosomes translocations between wheat and rye: an alternative to plant breeding. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1307-1314, 2011.

CARVER, B.F.; RAYBURN, A.L. Comparison of related wheat stocks possessing 1B or T1BL-1RS chromosomes – grain and flour quality. *Crop Science*, Madison, v. 35, n. 5, p. 1316-1321, 1995.

CHANDNA, R.; GUPTA, S.; AHMAD, A.; IQBAL, M.; PRASAD, M. Variability in Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties differing in nitrogen efficiency as assessed by microsatellite markers. *Protoplasma*, [S.l.], v. 242, n. 1-4, p. 55-67, 2010.

CHAVES, M.S. *Ferrugem da Folha do Trigo: Vencer ou Conviver?*. 2005. Disponível em: <<http://www.zoonews.com.br/noticias2/noticia.php?idnoticia=59316>>. Acesso em: 21 dez. 2011.

CHAVES, M.S.; BARCELLOS, A.L. Especialização fisiológica de *Puccinia triticina* no Brasil em 2002. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 31, n. 1, p. 57-62, 2006.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da safra brasileira: Grãos, quarto levantamento*. Brasília: CONAB, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_boletim_graos_4o_levantamento.pdf>. Acesso em 14 fev. 2012.

COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. Uso de Marcadores Moleculares na Indústria Animal. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. Brasília: EMBRAPA, 2001, p. 11-24.

CUNHA, G.R. (Org.) *Oficina sobre Trigo no Brasil: bases para a construção de uma nova triticultura brasileira*. Passo Fundo, Editora Embrapa, 2009. 192p.

DE FROIDMONT. A co-dominant marker for 1BL/1RS wheat-rye translocation via multiplex PCR. *Journal of Cereal Science*, [S.l.], v. 27, n. 3, p. 229-232, 1998.

DYCK, P.L.; SAMBORSKI, R.; ANDERSON, R.G. Inheritance of adult plant leaf rust resistance derived from the common wheat varieties Exchange and Frontana. *Canadian Journal Genetics and Cytology*, Ontario, v. 8, n. 4, p. 665-671, 1966.

DYCK, P.L. Identification of the gene for adult-plant leaf rust resistance in Thatcher. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 59, n. 2, p. 499-501, 1979.

DYCK, P.L. The association of a gene for leaf rust resistance with chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Genome*, Toronto, v. 29, n. 3, p. 467-469, 1987.

FAHIMA, T.; SUN, G.L.; BEHARAV, A.; KRUGMAN, T.; BEILES, A.; NEVO, E. RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 98, n. 3-4, p. 434-447, 1999.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Effective/Ineffective stem rust resistance genes*, 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/crops/rust/stem/stem-pathotypetracker/stem-effectivesrgenes/en/>. Acesso em: 18 jan. 2012.

FAO – Food and Agriculture Organization. *Rust Spore – Pathotype Sample Frequency Tool*, 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/crops/rust/stem/stem-pathotypetracker/pathotype-frequency-graph/en/>. Acesso em : 12 de fev. 2012.

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. Viçosa: UFV, p. 535-587, 1999.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2 ed. Brasília, Embrapa Cenargen, 1996. 220p.

FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics*, [S.l.], v. 8, p. 29-54, 1956.

FRIEBE, B.; JIANG, J.; KNOTT, D.R.; GILL, B.S. Compensation indexes of radiation-induced wheat *Agropyron elongatum* translocations conferring resistance to leaf rust and stem rust. *Crop Science*, Madison, v. 34, n. 2, p. 400-404, 1994.

GANEVA, G.; KORZUN, V.; LANDJEVA, S.; POPOVA, Z.; CHRISTOV, N.K. Genetic diversity assesment of Bulgarian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) landraces and modern cultivars using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Dordrecht, v. 57, n. 2, p. 273-285, 2010.

GERECHTER-AMITAI, Z.K.; WAHL, I.; VARDI, A.; ZOHARY, D. Transfer of stem rust seedling resistance from wild diploid einkorn to tetraploid durum wheat by means of a triploid hybrid bridge. *Euphytica*, Wageningen, v. 20, n. 2, p. 281-285, 1971.

GERMÁN, S.; BARCELLOS, A.; CHAVES, M.; KOHLI, M.; CAMPOS, P.; VIEDMA, L. de. The situation of common wheat rusts in the Southern Cone of America and perspectives for control. *Australian Journal of Agricultural Research*, Collingwood, v. 58, n. 6, p. 620-630, 2007.

GRAIN GENES. WMS322. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=probe;name=WMS322>>. Acesso em: 14 abr. 2010.

GRAYBOSCH, R.A. Uneasy unions: Quality effects of rye chromatin transfers to wheat. *Journal of Cereal Science*, [S.l.], v. 33, n. 3, p. 3-16, 2001.

GUAN, B.; WANG, K.; ZHOU, B.L.; GUO, W.Z.; ZHANG, T.Z. Establishment of a multi-color genomic *in situ* hybridization technique to simultaneously discriminate the three interspecific hybrid genomes in *Gossypium*. *Journal of Integrative Plant Biology*, [S.l.], v. 50, n. 3, p. 345-351, 2008.

GUARIENTI, E. *Qualidade industrial do trigo*. 2.ed. Passo Fundo, Embrapa Trigo, 1996. 36p.

GUPTA, S.; CHARPE, A.; KOUL, S.; PRABHU, V.; MOHD, Q.; HAQ, R. Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf rust resistance gene, Lr9, for marker-assisted selection in bread wheat. *Genome*, Toronto, v. 48, p. 823-830, 2005.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant cell*, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1773-1791, 1996.

HELGUERA, M.; KHAN, I.A.; KOLMER, J.; LIJAVETZKY, D.; ZHONG-QI, L.; DUBCOVSKY, J. PCR Assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* Cluster of Rust Resistance Genes and Their Use to Develop Isogenic Hard Red Spring Wheat Lines. *Crop Science*, Madison, v. 43, n. 5, p. 1839-1847, 2003.

HESLOP-HARRISON, J. S. et al. *In situ* hybridization with automated chromosome desnaturation. *Technique*, [S.l.], v. 3, p. 109-115, 1991.

IQBAL, M.J.; RAYBURN, A.L. Identification of the 1RS rye of Bread wheat chromosomal segment in wheat by RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 91, n. 6-7, p. 1048-1053, 1995.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences Naturelles*, [S.l.], v. 37, p. 547-579, 1901.

JIN, Y.; SINGH, R.P.; WARD, R.W.; WANYERA, R.; KINYUA, M.; NJAU, P.; FETCH, T. PRETORIUS, Z.A.; YAHYAOU, A.

Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* genes lines to TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant disease*, [S.l.], v. 91, n. 9, p. 1096-1099, 2007.

JIN, Y.; SZABO, L. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease*, [S.l.], v. 92, n. 6, p. 923-926, 2008.

JIN, Y.; SZABO, L.; PRETORIUS, Z.A. Virulence variation within the Ug99 lineage. In: APPELS, R.; EASTWOOD, R.; LAGUDAH, E.; LANGRIDGE, P.; MACKAY, M.; MCINTYRE, L.; SHARP, P. *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium*, Australia, p. 4-6, 2008.

JIN, Y.; SZABO, L.J.; ROUSE, M.N.; FETCH, J.T.; PRETORIUS, Z.A.; WANYERA, R.; NJAU, P. Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within the TTKS race lineage of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease*, [S.l.], v. 93, n. 4, p. 367-370, 2009.

KERBER, E.R.; DYCK, P.L. Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult-plant leaf rust and seedling stem rust resistance from an amphiploid of *Aegilops speltoides* x *Triticum monococcum*. *Genome*, Toronto, v. 33, n. 4, p. 530-537, 1990.

KHLESTKINA, E.K.; RODER, M.S.; EFREMOVA, T.T.; BORNER, A.; SHUMNY, V.K. The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers. *Plant Breeding*, Berlin, v. 123, n. 2, p. 122-127, 2004.

KIM, W.; JOHNSON, J.W.; BAENAIGER, P.S.; GAINES, C.S.; BARNETT, R. Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources. *Crop Science*, Madison, v. 44, p. 1254-1258, 2004.

KLOPPERS, F.J.; PRETORIUS, Z.A. 9th European Mediterranean Cereal Rusts Powdery Mildew Conference. LrB. 5D. T. tauschii. Innes, R.L. 1994. *Genome*, Toronto, v. 37, p. 813-822, 1996.

KNOTT, D.R. Using polygenic resistance to breed for stem rust resistance in wheat. In: SIMMONDS, N.W.; RAJARAM, S. *Breeding Strategies for Resistance to the Rusts of Wheat*, México: CIMMYT, p. 39-47, 1988.

KOLMER, J.A. Tracking wheat rust on a continental scale. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 8, p. 441-449, 2005.

KORZUN, V.; BÖRNER, A.; WORLAND, A.J.; LAW, C.N.; RÖDER, M.S. Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, Wageningen, v. 95, n. 2, p. 149-155, 1997.

KOTA, R.; SPIELMEYER, W.; MCINTOSH, R.A.; LAGUDAH, E.S. Fine genetic mapping fails to dissociate durable stem rust resistance gene *Sr2* from pseudo-black chaff in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 112, n. 3, p. 492-499, 2006.

LE ROUX, J. First report of a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* race with virulence for *Sr24* in South Africa. *Plant Disease*, [S.l.], v. 69, p. 1007, 1985.

LITT, M.; LUTY, J.A. A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. *American Journal of Human Genetics*, [S.l.], v. 44, p. 397-401, 1989.

LIU, J.; LIU, L.; HOU, N.; ZHANG, A.; LIU, C. Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. *Euphytica*, Wageningen, v. 155, n. 1-2, p. 249-258, 2007.

LONG, D.L.; KOLMER, J.A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondite* f. sp. *Tritici*. *Phytopathology*, [S.l.], v. 79, p. 525-529, 1989.

MAGO, R.; BARIANA, H.S.; DUNDAS, I.S.; SPIELMEYER, W.; LAWRENCE, G.J.; PRYOR, A.J.; ELLIS, J.G. Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and

Sr26 in diverse wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 111, n. 3, p. 496–504, 2005.

MAGO, R.; ZHANG, P.; BARIANA, H.S.; VERLIN, D.C.; BANSAL, U.K.; ELLIS, J.G.; DUNDAS, I.S. Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 119, n. 8, p. 1441-1450, 2009.

MAGO, R.; BROWN-GUEDIRA, G.; DREISIGACKER, S.; BREEN, J.; JIN, Y.; SINGH, R.; APPELS, R.; LAGUDAH, E.S.; ELLIS, J.; SPIELMEYER, W. An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene *Sr2* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 122, n. 4, p. 735-744, 2011.

MCINTOSH, R.A. The role of specific genes in breeding for durable stem rust resistance in wheat and triticale. In: SIMMONDS, N.W.; RAJARAM, S. *Breeding Strategies for Resistance to the Rust of Wheat*. México: CIMMYT, p. 1-9, 1988.

MCINTOSH, R.A.; WELLINGS, C.R.; PARK, R.F. *Wheat Rusts - An Atlas of Resistance Genes*. Sydney, CSIRO, 1995. 213p.

MCINTOSH, R.A.; YAMAZAKI, Y.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, W.J.; MORRIS, C.F.; SOMERS, D.; APPELS, R.; DEVOS, K.M. Catalogue of genes symbols for wheat. IN: MCINTOSH, R.A. *Gene Symbols*, 2008, 166p. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov/gg2/triticum/wgc/2008/genesymbol.pdf>>. Acesso em: 26 out.2011.

MCINTOSH, R.A.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, W.J.; MORRIS, C.F.; APPELS, R.; XIA, X.C. *Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement*. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/wgc/2009upd.pdf>>. Acesso em 25 mai. 2010.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions

by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, 1991.

MILACH, S.C.K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre, UFRGS, 1998. 140p.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. *International Journal for Parasitology*, [S.l.], v. 28, n. 6, p. 981-987, 1998.

MONIS, P.T. The importance of systematics in parasitological research. *International Journal for Parasitology*, [S.l.], v. 29, n. 3, p. 381-388, 1999.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. de. Citogenética. In: OSÓRIO, E. A. *Trigo no Brasil*. Campinas: Fundação Cargill, p. 95-144, 1982.

NASS, L.L. *Recursos Genéticos Vegetais*. Brasília, Editora Embrapa, 2007. 858p.

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

NOBUYUKI, I.; BAUTISTA, N.S.; YAMADA, T.; KAMIJIMA, O.; ISHI, T. Ultra simple DNA extraction method for marker-assisted selection using microsatellite markers in rice. *Plant Molecular Biology*, [S.l.], v. 18, p. 1-6, 2000.

PARK, R.F.; BARIANA, H.S.; WELLING, C.R.; WALLWORK, H. Detection and occurrence of a new pathotype of *Puccinia triticina* with virulence for *Lr24* in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, Collingwood, v. 53, n. 9, p. 1069-1076, 2002.

PARLEVLIET, J.E.; VALE, F.X.R. do; ZAMBOLIN, L. Concepts in plants disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 3, p. 577-589, 2001.

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

PELEMAN, J.D.; VAN DER HOORT, J.R. Breeding by desing. *TRENDS in Plant Science*, [S.l.], v. 8, n. 7, p. 330-334, 2003.

PRETORIUS, Z.A.; SINGH, R.P.; WAGOIRE, W.W.; PAYNE, T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Disease*, [S.l.], v. 84, n. 2, p. 203, 2000.

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J; JÚLIO, H.F. Jr.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V. de; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleoste, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.

QI, L.; PUMPHREY, M.O.; FRIEBE, B.; CHEN, P.D.; GILL, B.S. Molecular cytogenetic characterization of alien introgressions with gene *Fhb3* for resistance to Fusarium heah blight disease of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 117, n. 7, p. 1155-1166, 2008.

RABINOVICH, S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. *Euphytica*, Wageningen, v. 100, n. 1-3, p. 323-340, 1998.

RAINA, S.N.; RANI, V. GISH technology in plant genome research. *Methods in Cell Science*, [S.l.], v. 23, n. 1-3, p. 83-104, 2001.

RAJARAM, S.; SINGH, R.P.; TORRES, E. In: SIMMONDS, N.W.; RAJARAM, S. *Current CIMMYT approaches in breeding wheat for rust resistance. Breeding Strategies for resistance to the Rust of Wheat*. México: CIMMYT, p. 101-118, 1988.

RAO, R.V.; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell: Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 68, p. 1-19, 2002.

REGITANO, L.C.A. Introdução à Análise dos Marcadores Moleculares. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. Brasília: EMBRAPA, 2001, p. 25-39.

ROBERT, O.; ABELARD, C.; DEDRYVER, F. Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene *Yr17* in wheat. *Molecular Breeding*, Netherlands, v. 5, n. 2, p. 167-175, 1999.

RODER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M-H.L.; LEROY, P.; GANAL, M.W. A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics*, [S.l.], v. 149, p. 2007–2023, 1998.

ROELFS, A.P.; MARTENS, J.W. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, [S.l.], v. 78, p. 526-533, 1988.

ROELFS, A.P.; SINGH, R.P.; SAARI, E. *Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. Mexico, CIMMYT, 1992. 81p.

ROHLF, J.F. NTSYS – pc. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Versão 2.0*. New York: Applied Biostatistics Inc, 1998.

ROUSSEL, V.; LEISOVA, L.; EXBRAYAT, F.; STEHNO, Z.; BALFOURIER, F. SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 111, n. 1, p. 162-170, 2005.

ROWLAND, G.G.; KERBER, E.R. Telocentric mapping in hexaploid wheat of genes for rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ontario, v. 16, n. 1, p. 137- 144, 1974.

SAAL, B.; WRICKE, G. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.). *Genome*, [S.l.], v. 42, n. 5, p. 964-972, 1999.

SAINI, R.G.; KAUR, M.; SINGH, B.; SHIWANI, S.; NANDA, G.S.; NAYAR, S.K.; GUPTA, A.K.; NAGARAJAN, S. Genes *Lr48* and *Lr49* for hypersensitive adult plant leaf rust resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, Wageningen, v. 124, n. 3, p. 365-370, 2002.

SANSFORD, C. *CSL information note: for stem rust/blackrust of wheat: Ug99 – a new virulent strain*. Copyright CSL, 2008. 3p. Disponível on-line: <<http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/ug99.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2012.

SANTANA, F.M.; CHAVES, M.S. Cultivo de Trigo - Doenças e métodos de controle. Versão Eletrônica. 2009. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Trigo/CultivodeTrigo/doencas.htm>>. Acesso em: 01 dez. 2011.

SCHLEGEL, R.; KORZUN, V. About the origin of 1RS.1BL wheat-rye chromosome translocations from Germany. *Plant Breeding*, Berlin, v. 116, n. 6, p. 537-540, 1997.

SCHNEIDER, A.; MOLNÁR-LANG, M. Detection of the 1RS chromosome arm in Martonvásár wheat genotypes containing 1BL.1RS or 1AL.1RS translocations using SSR and STS markers. *Acta Agronomica Hungarica*, [S.l.], v. 57, n. 4, p. 409-416, 2009.

SCHNURBUSCH, T.; PAILLARD, S.; SCHORI, A.; MESSMER, M.; SCHACHERMAYR, G.; WINZELER, M.; KELLER, B. Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the *Lr34* chromosomal region. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 108, n. 3, p. 477-484, 2004.

SCHUBERT, I.; FRANSZ, P.F.; FUCHS, J.; JONG, J.H. Chromosome painting in plants. *Methods in Cell Science*, Burlington, v. 23, n. 1-3, p. 57-69, 2001.

SEAH, S.; BARIANA, M.; JAHIER, J.; SIVASITHAMPARAM, K.; LAGUDAH, E.S. The introgressed segment carrying rust resistance genes *Yr17*, *Lr37* and *Sr38* in wheat can be assayed by a cloned disease resistance gene-like sequence. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 102, n. 4, p. 600-605, 2001.

SEARS, E.R. Agropyron-wheat transfers obtained by homoeologous pairing. In: SEARS, E.R.; SEARS, L.M.S. *Proceedings 4th International Wheat Genetics Symposium*, Columbia, Missouri, p. 191-199, 1973.

SEPSI, A.; MOLNAR, I.; MOLNAR-LANG, M.; SZALAY, D. Characterization of leaf rust-resistance wheat-*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1, using sequential multicolor GISH and FISH. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 116, n. 6, p. 825-834, 2008.

SEPSI, A.; MOLNAR, I.; MOLNAR-LANG, M. Physical mapping of a 7A.7D translocation in the wheat - *Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1 using multicolor genomic *in situ* hybridization and microsatellite marker analysis. *Genome*, [S.l.], v. 52, n. 9, p. 748-754, 2009.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de; AZEVEDO, J.L. *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. 1^a ed. Caxias do Sul, EDUCS, 2002. 433p.

SERRANO, M.; CALVO, J.H.; MARTINEZ, M.; MARCOS-CARCAVILLA, A.; CUEVAS, J.; GONZÁLEZ, C.; JURADO, J.J.; de TEJADA, P.D. Microsatellite based genetic diversity and population structure of the endangered Spanish Guadarrama goat breed. *BMC Genetics*, Washington, v. 10, n. 61, p. 61-69, 2009.

SIMONS, M.D. Crow rust. In: ROELFS, A. P.; BUSHNELL, W. R. (Ed.). *The cereal rusts*. Orlando: Academic Press, 1985. p. 132-172.

SHIWANI, S.; SAINI, R.G. Genetics of adult plant leaf rust resistance in four Indian and two Australian bread wheat cultivars. *Genome*, [S.l.], v. 37, n. 3, p. 436-439, 1994.

SINGH, R.P.; MUJEEB-KAZI, A.; HUERTA-ESPINO, J. Gene *Lr46* for slow rusting resistance to leaf rust in wheat cultivar Pavon 76. *Phytopathology*, [S.l.], v. 88, n. 9, p. 890-894, 1998.

SINGH, R.P.; HUERTA-ESPINO, J.; RAJARAM, S. Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathologica Hungarica*, [S.l.], v. 35, n. 1-4, p. 133-139, 2000.

SINGH, R.P.; HUERTA-ESPINO, J.; ROELFS, A.P. The wheat rusts. In: *Bread wheat: Improvement and production*. CURTIS, B.C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, G.H. (Eds.). FAO Plant Production and Protection Series, n° 30. Roma: FAO, 2002. Disponível em: <www.fao.org/DOCREP/006/Y4011E/y4011e0g.htm>. Acesso em: 10 jul. 2011.

ŠLIKOVÁ, S.; GREGOVÁ, E.; BARTOŠ, P.; KRAIC, J. Marker-assisted selection for leaf rust resistance in wheat by transfer of gene *Lr19*. *Plant Protection Science*, [S.l.], v. 39, p. 13–17, 2003.

SINGH, R.P.; HUERTA-ESPINO, J.; JIN, Y.; NJAU, P.; WANYERA, R.; HERRERA-FOESSEL, S.A.; BHAVANI, S.; SINGH, D.; SINGH, P.K. Adult Plant Resistance in wheat to Ug99 Race of Stem Rust and its Utilization. In: SINGH, G.P.; PRABHU, K.V.; SINGH, A.M. *Proceeding of International Conference on Wheat Stem Rust Ug99- A Threat to Food Security*. Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, p. 25-31, 2008.

SISSONS, M.J.; OSBORNE, B.G.; HARE, R.A.; SISSONS, S.A.; JACKSON, R. Application of the single-kernel characterization system to durum wheat testing and quality prediction. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 77, n. 1, p. 4-10, 2000.

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *The University of Kansas Scientific Bulletin*, Kansas, v. 38, p. 1409-1438, 1958.

SOMERS, D.J.; ISAAC, P. SSRs from the Wheat Microsatellite Consortium. 2004. Disponível em: <wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSR/WMC>. Acesso em: 10 mar. 2010.

SOUSA, C.N.A.; BARCELLOS, A.L. Avaliação da necrose da ponta da folha associada ao gene *Lr34*, em cultivares de trigo. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA EM TRIGO, 18, 1999, Passo Fundo-RS. *Resumos...* Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999, v.2, p.210-213.

SOUZA, C.N.A. de; ROSA, O. de S. Multiplicar o grão. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, v. 3, n. 17, p. 46-52, 1985.

SPEICHER, M.R.; BALLARD, S.G.; WARD, D.C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics*, [S.l.], v. 12, p. 368–375, 1996.

TANG, H-J.; YIN, G-H.; XIA, X-C.; FENG, J-J.; QU, Y-Y.; HE, Z-H. Evaluation of molecular markers specific for 1BL.1RS translocation and characterization of 1RS chromosome in wheat varieties from different origins. *Acta Agronomica Sinica*, [S.l.], v. 35, n. 11, p. 2107-2115, 2009a.

TANG, Z.X.; FU, S.L.; REN, Z.L.; ZHANG, H.Q.; YANG, Z.J.; YAN, B.J. Characterization of three wheat cultivars possessing new 1BL.1RS wheat-rye translocations. *Plant Breeding*, v. 128, p. 524-527, 2009b.

THE, T.T.; GUPTA, R.B.; DYCK, P.L.; APPLELS, R.; HOHMANN, U.; MCINTOSH, R.A. Characterization of stem rust resistance derivatives of wheat variety Amigo. *Euphytica*, Wageningen, v. 58, n. 3, p. 245–252, 1992.

TORADA, A.; KOIKE, M.; MOCHIDA, K.; OGIHARA, Y. SSR-based linkage map with new markers using an intraspecific population of common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 112, n. 6, p. 1042-1051, 2006.

USDA – United States Department of Agriculture. *Grain: World Markets and Trade*, 2010. Disponível em:

<<http://www.fas.usda.gov/grain/circular/2010/03-10/grainfull03-10.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2010.

USDA – United States Department of Agriculture. *Wheat Stem Rust*, 2011. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/main/docs.htm?docid=9910>>. Acesso em: 01 fev. 2012.

USDA - United States Department of Agriculture. *World Agricultural Supply and Demand Estimates*, 2012. Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2012.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, [S.l.], v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

TODOROVSKA, E.; CHRISTOV, N.; SLAVOV, S.; CHRISTOVA, P.; ASSILEV, D. Biotic Stress Resistance in Wheat - Breeding and Genomic Selection Implications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Bulgaria, v. 23, n. 4, p. 1417-1426, 2009.

TROCOLLI, A.; BORRELLI, G.M.; DE VITA, P.; FARES, C.; DI FONZO, N. Durum wheat quality: o multidisciplinary concept. *Journal of Cereal Science*, [S.l.], v. 32, n. 2, p. 99-113, 2000.

VERONOSE, P.; RUIZ, M.T.; COCA, M.A.; HERNANDEZ-LOPEZ, A.; LEE, H.; IBEAS, J.I.; DAMSZ, B.; PARDO, J.M.; HASEGAWA, M.; BRESSAN, R.A.; NARASIMHAN, M.L. Defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 131, n. 4, p. 1580-1590, 2003.

VIDA, J.B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMANN, D.; FILHO, J.U.T.B.; VERZIGNASSI, J.R.; CAIXETA, M.P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 4, p. 355-372, 2004.

VIDA, G.; GÁL, M.; UHRIN, A.; VEISZ, O.; SYED, N.H.; FLAVELL, A.J.; WANG, Z.; BEDŐ, Z. Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica*, Wageningen, v. 170, n. 1-2, p. 67-76, 2009.

YAHYAOU, A.; NAZARI, K.; HODSON, D.; CRESSMAN, K.; KHOURY, W.; ADBALLA, O. Disease surveillance concepts, practices including GIS imagery and tracking. In: SINGH, G.P.; PRABHU, K.V.; SINGH, A.M. *Proceeding of International Conference on Wheat Stem Rust Ug99- A Threat to Food Security*, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India, p. 15-22, 2008.

YAN, B.J.; ZHANG, H.Q.; REN, Z.L. Molecular cytogenetic identification of a new 1RS/1BL translocation line with secalin absence. *Hereditas*, Beijing, v. 27, p. 513-517, 2005.

YANG, Z.J.; REN, Z.L. Expression of gene *Pm8* for resistance to powdery mildew in wheat from Sichuan. *Journal of Sichuan Agriculture University*, Sichuan, v. 15, p. 452-456, 1997.

YEDIAY, F.E.; BALOCH, F.S.; KILIAN, B.; ÖZKAN, H. Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL.1RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces. *Genetics and Resources of Crop Evolution*, [S.l.], v. 57, n. 1, p. 119-129, 2010.

WELLINGS, C.; BANSAL, U.; BARIANA, H. False black chaff in wheats carrying the stem rust resistance gene *Sr2*. *Cereal Rust Report*, Sydney, v. 6, n. 7, p. 1-2, 2008.

WENG, Y.; AZHAGUVEL, P.; DEVKOTA, R.N.; RUDD, J.C. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background. *Plant Breeding*, Berlin, v. 126, n. 5, p. 482-486, 2007.

WILLIAM, H.M.; SINGH, R.P.; HUERTA-ESPINO, J.; PALACIOS, G.; SUENAGA, K. Characterization of genetic loci conferring adult

plant resistance to leaf rust and stripe rust in spring wheat. *Genome*, [S.l.], v. 49, n. 8, p. 977-990, 2006.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, [S.l.], v. 18, p. 6531-6535, 1990.

ZHANG, Z.C.; HOU, X.L.. Strategies for development of SSR molecular markers. *Yi Chuan*, [S.l.], v. 26, n. 5, p. 763-768, 2004.

ZHANG, P.; DREISIGACKER, S.; MELCHINGER, A.E.; REIF, J.C.; MUJEEB-KAZI, A.; VAN-GINKEL, M.; HOISINGTON, D.; WARBURTON, M.L. Quantifying novel sequence variation and selective advantage in synthetic hexaploid wheats and their backcross-derived lines using SSR markers. *Molecular Breeding*, Netherlands, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2005a.

ZHANG, W.; LUKASZEWSKI, A.J.; KOLMER, J.; SORIA, M.A.; GOYAL, S.; DUBCOVSKY, J. Molecular characterization of durum and common wheat recombinant lines carrying leaf rust resistance (*Lr19*) and yellow pigment (*Y*) genes from *Lophopyrum ponticum*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 111, n. 3, p. 573-582, 2005b.

ZHANG, W.; DUBCOVSKY, J. Association between allelic variation at the *Phytoene synthase 1* gene and yellow pigment content in the wheat grain. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 116, n. 5, p. 635-645, 2008.

ZHOU, Y.; HE, Z.H.; ZHANG, G.S.; XIA, L.Q.; CHEN, X.M.; GAO, Y.C.; JING, Z.B.; YU, G.J. Utilization of 1BL/1RS translocation in wheat breeding in china. *Acta Agronomica Sinica*, [S.l.], v. 30, p. 531-535, 2004.