

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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
FONTES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA
FOLHA EM *Triticum tauschii* COSS. SCHMAL.**

ÂNGELA BOMFOCO DE ALMEIDA

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

Passo Fundo, abril de 2006.

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

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
FONTES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA
FOLHA EM *Triticum tauschii* COSS. SCHMAL.

BIÓLOGA ÂNGELA BOMFOCO DE ALMEIDA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Irene Baggio
Co-orientadora: Dr^a. Sandra Patussi Brammer

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

Passo Fundo, abril de 2006.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Passo Fundo, pela realização do curso;

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo), pela disponibilização do material vegetal e infra-estrutura para a realização deste trabalho;

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos;

À Dra. Maria Irene Baggio, pela orientação, ensinamentos e apoio;

À Dra. Sandra Patussi Brammer, pela colaboração, orientações e companheirismo;

À Dra. Márcia Soares Chaves, pelas contribuições valiosas, auxílio e colaboração;

À Dra. Ana Lídia Variani Bonato, pela colaboração e principalmente pelo auxílio na análise e interpretação estatística;

Às Dras. Maria Jane Sereno e Magali Grando pelas valiosas contribuições;

Aos professores do curso, pela contribuição na construção do conhecimento;

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Trigo, pela disponibilidade, paciência, colaboração, amizade e empenho para a realização deste trabalho;

Aos colegas de curso, pela demonstração de amizade e agradável convivência;

Aos meus familiares, com muito amor;

Ao Marcos, meu maior incentivador, sem o qual essa conquista jamais seria possível;

A Deus, por ter me acompanhado nessa caminhada.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Trigo no Brasil	6
2.2 Importância social e econômica	8
2.3 Melhoramento genético vegetal.....	9
2.4 Trigo: origem e evolução	11
2.5 Melhoramento vegetal através de hibridação interespecífica: importância das espécies afins do trigo na busca de genes de resistência a doenças e estratégias de transferência	13
2.5.1 Obtenção de linhagens sintéticas	16
2.5.2 Obtenção de fontes de resistência através de cruzamentos diretos.....	18
2.6 Ferrugem da folha do trigo	23
2.7 Marcadores moleculares – microssatélites	26
 CAPÍTULO I	 30
 IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA À RAÇA SPJ-RS DE <i>Puccinia triticina</i> EM <i>Triticum tauschii</i>	 30
RESUMO	30
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4 CONCLUSÕES	44
 CAPÍTULO II	 45

AVALIAÇÃO DA SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE <i>Triticum tauschii</i> POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	47
1 INTRODUÇÃO.....	48
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 Material vegetal e extração de DNA.....	51
2.2 Quantificação do DNA.....	53
2.3 Marcadores microssatélites e reação em cadeia da polimerase (PCR).....	54
2.4 Análise eletroforética dos fragmentos amplificados por PCR.....	57
2.5 Análise estatística.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4 CONCLUSÕES.....	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura

Página

- 1 Ferrugem da folha do trigo (Embrapa Trigo, 2002). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006. 24

CAPÍTULO I

- 1 Sintomas e tipos de infecção de *Puccinia triticina* em plântulas de trigo. Tipos de infecção de 0 a 2: avirulência (resistência), 3 e 4: virulência (suscetibilidade). Foto: Dr. James Kolmer, USDA-ARS, Dept. Plant Pathology, St. Paul, MN, USA. 40

CAPÍTULO II

- 1 Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Primer WMC 245 e marcador molecular de 100 pb (Numeração de acordo com a Tabela 1). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006. 60
- 2 Dendrograma baseado nos índices de similaridade (coeficiente de similaridade de Jaccard) entre 40 acessos de *T. tauschii*, construído por análise de agrupamento (UPGMA) com base nos dados de microssatélite. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006. 64

3	Correlação cofenética obtida através dos dados gerados entre a similaridade genética e os valores estimados pelo UPGMA. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.	65
---	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Série poliplóide que constitui as espécies silvestres e cultivadas de <i>Triticum</i> ; nível de ploidia, genoma e número de cromossomos	12

(modificado de Feldman, 1977) Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

- 2 Localização genômica e cromossômica dos genes 25
Lr mapeados em trigo. Modificado de Cereal Disease Laboratory (2006). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

CAPÍTULO I

- 1 Acessos de *Triticum tauschii* utilizados no 37
trabalho. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.
- 2 Reação, tipos de infecção e sintomas de *Puccinia* 39
tritricina em primeira folha de plântulas de trigo (Roelfs et al., 1992). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.
- 3 Acessos de *Triticum tauschii* e tipo de infecção 42
em primeira folha de plântulas inoculadas com a raça SPJ-RS de *Puccinia triticina*, sob condições controladas. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

CAPÍTULO II

1	Acessos de <i>Triticum tauschii</i> utilizados. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.	52
2	Primers específicos para o genoma D empregados nas análises moleculares por microssatélites. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.	55
3	Valor aproximado de pares de base obtidos por banda. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.	60
4	Matriz de distâncias de Jaccard entre 40 acessos de <i>T. tauschii</i> , obtidas a partir da análise de 20 primers SSR. (Numeração dos acessos baseada na Tabela 1). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.	63

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FONTES DE
RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA FOLHA EM**

Triticum tauschii COSS. SCHMAL.

ÂNGELA BOMFOCO DE ALMEIDA¹, MARIA IRENE

BAGGIO², SANDRA PATUSSI BRAMMER³

RESUMO - As espécies afins ao trigo constituem uma importante fonte de genes agronomicamente úteis, principalmente para resistência a patógenos. Vários genes de resistência à ferrugem da folha, hoje disponíveis no trigo cultivado foram transferidos de *Triticum tauschii* ($2n = 14$), doador do genoma D do trigo hexaplóide ($2n = AABBDD$). Foram testados, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Trigo, 40 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG), com o objetivo de identificar genes de resistência à raça SPJ-RS de *Puccinia triticina*, entre os quais 25% foram resistentes. A análise molecular através de marcadores microssatélites evidenciou grau de similaridade entre os acessos de 0.48, indicando elevado nível de diversidade genética.

Palavras-chave: *Puccinia triticina*, microssatélites, diversidade genética, cruzamentos interespecíficos.

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Produção Vegetal.

² Orientadora, Bióloga, Dra. em Ciências: Genética, Professora do PPGAgro.

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra em Genética e Biologia Molecular, Professora do PPGAgro e Pesquisadora da Embrapa Trigo.

**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
RESISTANCE SOURCES TO WHEAT LEAF RUST ON
Triticum tauschii COSS. SCHMAL.**

ABSTRACT – Related species are important sources of useful genes mainly to disease resistance. Many leaf rust genes transferred from wild species to hexaploid wheat ($2n = 42$; AABBDD) are today available to breeding programs and several came from *Triticum tauschii* ($2n = 14$), the wheat D genome donor. Forty accesses from Germoplasm Bank (BAG) of Embrapa Trigo were evaluated for reaction to race SPJ-RS of *Puccinia triticina*, 25% being resistant. The molecular analysis by microsatellites showed similarity degree between accesses of 0,48 indicating high level of genetic diversity.

Key words: *Puccinia triticina*, microsatellites, genetic diversity, interspecific crosses.

1 INTRODUÇÃO

A variabilidade genética é essencial para o sucesso de qualquer programa de melhoramento. A continuidade desses programas depende, em grande parte da utilização dos recursos genéticos das espécies de interesse agrícola armazenados em bancos de germoplasma. Tais bancos são coleções de amostras de diferentes espécies e variedades de plantas, mantidas para garantir a conservação de sua diversidade genética.

A diversidade genética contida nesses bancos, que geralmente incluem espécies silvestres ancestrais das espécies cultivadas, representa um imenso potencial para uso na agricultura, podendo contribuir para a diminuição do ataque de pragas e doenças na lavoura a partir da seleção de materiais resistentes, além de possíveis aumentos da produtividade. Embora diversos estudos sejam realizados visando o melhoramento das espécies cultivadas, apenas uma pequena parcela da variabilidade genética existente nas espécies selvagens tem sido explorada.

O esclarecimento dos mecanismos de origem do trigo cultivado e os conhecimentos de biologia celular e molecular, bem como a utilização de cruzamentos interespecíficos, podem contribuir de forma expressiva para o incremento de novas fontes de resistência a estresses bióticos e abióticos, para uso no melhoramento varietal.

O trigo cultivado (*Triticum aestivum* L. em Thell), por ser uma espécie alohexaplóide, formada por três diferentes genomas, pode se beneficiar das espécies diplóides e tetraplóides ancestrais como fonte de novos genes agronomicamente úteis. *Triticum tauschii* (syn. *Aegilops squarrosa*, *Aegilops tauschii*, $2n = 2x = 14$, DD), destaca-se como fonte de um grande número de genes de resistência para a maior parte das doenças que atacam o trigo entre os quais diversos novos genes de resistência à ferrugem da folha. A pesquisa sobre diferentes estratégias para a transferência da resistência à ferrugem encontrada em *T. tauschii*

para *T. aestivum* é extremamente útil para fornecer novas fontes para os programas de melhoramento genético de trigo que visam a resistência a essa moléstia.

A ferrugem da folha causada pelo fungo *Puccinia triticina* Ericks. [syn. *P. recondita* Roberge ex Desmaz F. sp. *tritici* (ERICKS & E. HENN)] é uma das mais importantes doenças que afetam a produção tritícola no mundo. As perdas podem chegar a 40% em cultivares suscetíveis. A utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente e econômico de controle.

Grandes progressos no melhoramento para resistência à ferrugem no trigo foram alcançados há muitas décadas, no entanto, o estreitamento da base genética e o surgimento de novas raças patogênicas provocam a necessidade contínua da identificação de novos genes de resistência. Sendo *T. tauschii* o doador do genoma D do trigo cultivado, a transferência de genes pode ser efetuada de forma mais rápida e eficiente do que comparado com outras espécies com genomas mais distantes.

Com a finalidade de utilizar futuramente a estratégia dos cruzamentos diretos entre acessos de *Triticum tauschii*, (2n=14, DD) com resistência à ferrugem da folha do trigo, e cultivares suscetíveis hexaplóides (2n=42, AABBDD), adaptadas aos agroecossistemas sul brasileiros, este trabalho teve os seguintes objetivos; 1) identificar fontes de resistência à raça SPJ-RS de *Puccinia triticina* em *Triticum tauschii* e 2) caracterizar a similaridade genética existente entre esses acessos, por meio de marcadores moleculares microssatélites.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Trigo no Brasil

O trigo está presente na história do Brasil desde a sua colonização no século XVI. Martim Afonso de Souza, em 1534 introduziu este cereal no país na Capitania de São Vicente, estado de São Paulo. Os primeiros imigrantes que lá se radicaram, levaram as sementes deste cereal para tentar seu cultivo em novas terras (LAGOS, 1983).

As primeiras plantações de trigo no país localizavam-se nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. A documentação histórica afirma também que houve plantações em Minas Gerais, Bahia e Rio Grande do Sul, onde a cultura foi introduzida posteriormente (SCHEEREN, 1986; FEDERIZZI et al., 1999).

Em 1795, iniciaram-se exportações do cereal, que crescia em importância ano após ano (SCHEEREN, 1986). Com o surgimento da ferrugem da folha (1811 - 1814) as colheitas começaram a cair drasticamente, provocando assim uma rápida queda da produção. Em 1823, devido à grande destruição dos trigais e as perdas da produção provocadas pela ferrugem, o trigo não foi mais produzido no sul do país (LAGOS, 1983).

Somente por volta do século XIX, o trigo voltou a ser produzido, sendo reintroduzido pelos colonos alemães e italianos que se estabeleceram no sul. O crescimento foi lento, pois novamente

ocorreram problemas com a ferrugem, além de dificuldades especiais de adaptação: solos ácidos, inúmeras pragas e moléstias, além de problemas climáticos que limitavam o rendimento e a qualidade do grão (SCHEEREN, 1986).

Os altos preços no mercado mundial, no período entre as duas Grandes Guerras Mundiais, obrigaram o governo federal a tomar medidas para aumentar a produção de trigo no país. Dessa forma, foram criadas em 1919 as primeiras estações experimentais de pesquisa de trigo. Desde 1919, até hoje, muito foi feito em relação à pesquisa deste cereal no Brasil. Porém, o desenvolvimento do cultivo de trigo, nos outros estados se processou bem mais tarde do que no Rio Grande do Sul (SCHEEREN, 1986).

Ao longo desses anos, a produção de trigo tem sofrido muitos problemas e alcançado muitos avanços tecnológicos e científicos. A pesquisa vem desempenhando um papel de destaque para o desenvolvimento da cultura no país, uma vez que os desafios têm se mostrado muito grandes, ainda mais considerando que o trigo não é uma espécie nativa do Brasil (LAGOS, 1983). Gradualmente, a pesquisa vem superando essa limitação através da seleção de cultivares geneticamente superiores e uso de práticas culturais mais adequadas que modificam o ambiente para que a planta possa atingir maior produtividade.

2.2 Importância social e econômica

O trigo é sem dúvida um dos alimentos mais importantes da dieta humana. Ele é usado por cerca de 35% da população mundial, e é cultivado em todo o mundo (LEÃO et al.,1972).

Segundo dados da CONAB da safra 2005/06, no Brasil a área cultivada está em 2.361,8 ha⁻¹ com produtividade média de 4.873,1 kg/ha. A demanda nacional de trigo representa 10.250.000 toneladas, sendo o Brasil um dos maiores importadores, mesmo tendo condições tecnológicas de auto-suficiência de produção.

O motivo do seu prestígio entre os cereais destinados à alimentação humana é o seu extraordinário poder de panificação. Esse poder advém, essencialmente, da presença, na composição do grão, de certas proteínas que formam o glúten, substância que confere ao pão uma estrutura leve e estável. Em algumas regiões do mundo, o centeio também é usado para a fabricação de pão. No entanto o glúten do centeio não tem tanta elasticidade e, por isso, quando se emprega centeio puro na fabricação de pão, este torna-se pesado e pouco esponjoso (LEÃO et al., 1972).

Sua importância está relacionada ao desenvolvimento da civilização e da agricultura moderna, sendo considerado um alimento sagrado para muitos povos.

2.3 Melhoramento genético vegetal

O melhoramento de plantas é uma importante estratégia para o aumento da produção de maneira sustentável. Dessa forma, os trabalhos de melhoramento visam ao aumento dos rendimentos, a expansão do potencial agrícola, a estabilidade da produção e o aumento da resistência a fatores bióticos ou abióticos. Acredita-se que o aumento da produtividade das principais espécies agronômicas nos últimos cinquenta anos seja decorrente do melhoramento genético (ALVES DE SOUZA & ROSA, 1985).

Desde o surgimento do trigo, há mais de 10 mil anos, o agricultor primitivo vem escolhendo as melhores sementes para o plantio da próxima safra, ao invés de consumi-las, selecionando assim as principais características agronômicas desejadas (ALVES DE SOUZA & ROSA, 1985).

As atividades relacionadas ao melhoramento genético de trigo no Brasil iniciaram com a implantação de estações experimentais do Ministério da Agricultura em Ponta Grossa no estado do Paraná e em Alfredo Chaves, município do Rio Grande do Sul. Essas atividades consolidaram-se em 1974 com a criação do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT), da Embrapa, em Passo Fundo. Os trabalhos iniciais do CNPT envolveram a coleta de amostras utilizadas no país, a seleção de linhas, e a partir das mesmas, a introdução de algumas cultivares e a realização de cruzamentos, gerando as primeiras cultivares melhoradas (ALVES DE SOUZA & ROSA, 1985).

A expansão da triticultura brasileira para outros estados, como Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso, permitiu que o melhoramento por introdução obtivesse grande sucesso, sendo

recomendadas 16 cultivares para estes estados oriundas do Paraguai, México e Argentina. Apesar deste sucesso, a maior parte das cultivares recomendadas hoje surgiram de processos de melhoramento por cruzamentos, o qual permite reunir em uma só variedade diversas características presentes em outras variedades ou corrigir alguns defeitos (ALVES DE SOUZA & ROSA, 1985).

As novas cultivares de trigo são produzidas a partir da introdução de materiais, seleção e hibridização, métodos convencionais utilizados para o melhoramento de plantas autógamas. Através do surgimento de uma série de metodologias de biologia celular e molecular o trabalho de melhoramento de trigo tem passado por grandes mudanças. Nos anos 80, a hibridação seguida da cultura de embriões híbridos imaturos, resultou na transferência de novos genes de espécies silvestres para o trigo cultivado. Em 1992, foi lançada a primeira cultivar de trigo no Brasil obtida por métodos biotecnológicos, através da haplodiploidização via cultura de anteras *in vitro* (MORAES-FERNANDES, 2000). Da mesma forma, a aplicação de marcadores moleculares de DNA, vem auxiliando no processo de melhoramento genético de trigo (MILACH, 1998a).

2.4 Trigo: origem e evolução

O trigo é um poliplóide anual, pertencente à família *Poaceae*, que se reproduz por autogamia, sendo que sua poliploidia natural facilita a incorporação de

genes de espécies afins tendo em vista que mutantes cromossômicos são menos letais do que os de espécies diplóides.

Os estudos sobre a origem e a evolução dos genomas do trigo hexaplóide cultivado desenvolveram-se desde o início do século 20. Em diversos laboratórios de vários países foram realizados estudos detalhados e de longo prazo sobre a citotaxonomia, evolução e distribuição geográfica de suas espécies afins, silvestres ou cultivadas (PETERSON, 1965; MCKEY, 1975; FELDMANN, 1977; BELL, 1987; MORAES-FERNANDES et al., 2000).

As espécies do gênero *Triticum*, com número cromossômico básico de sete, apresentam diferentes níveis de ploidia, incluindo espécies diplóides ($2n=14$), tetraplóides ($2n=28$) e hexaplóides ($2n=42$) (Tabela 1). O trigo cultivado (*Triticum aestivum* L. em Thell) é um hexaplóide ($2n=6x=42$), formado por três genomas distintos AA, BB e DD. O conjunto cromossômico A teve origem a partir de *T. monococcum*, o D de *T. tauschii* (MORRIS & SEARS, 1967). Tem havido dúvidas quanto a espécie diplóide que contribuiu com o genoma B das espécies tetraplóides e hexaplóides, sendo que atualmente evidências moleculares confirmam ser *Aegilops speltoides* (BADAEVA et al., 1998) o mais provável doador. Também são inúmeras as revisões sobre estes estudos.

Tabela 1 - Série poliplóide que constitui as espécies silvestres e cultivadas de *Triticum*: níveis de ploidia, genomas e números de cromossomos (modificado de FELDMAN, 1977). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Espécie	Genoma	Número de cromossomos	Tipo silvestre	Cultivado	
				c/ casca	s/ casca

1. Diplóides						
<i>T. monococcum</i>	AA	14	*	-		
<i>T. speltoides</i>	SS	14	*	-		-
<i>T. tauschii</i>	DD	14	*	-		
2. Tetraplóides						
<i>T. durum</i>	AABB	28	-	-		*
<i>T. dicoccum</i>	AABB	28	*	-		*
<i>T. turgidum</i>	AABB	28	*	-		*
<i>T. timophevii</i>	AAGG	28	*	*		*
3. Hexaplóides						
<i>T. aestivum</i>	AABBDD	42	-	-		*
<i>T. spelta</i>	AABBDD	42	*	-		-
<i>T. compactum</i>	AABBDD	42	-	-		*
<i>T. sphaerococum</i>	AABBDD	42	-	-		*

*presente; - ausente.

As espécies diplóides estão isoladas reprodutivamente, gerando híbridos estéreis, o que demonstra que possuem conjuntos cromossômicos não homólogos. As espécies tetraplóides, por sua vez, possuem dois conjuntos cromossômicos derivados de ancestrais diplóides diferentes e as espécies hexaplóides possuem três conjuntos, um derivado de uma espécie tetraplóide e outro de uma espécie diplóide.

T. aestivum é originário da hibridação entre o tetraplóide *T. turgidum* com o diplóide *T. tauschii* (KAWAHARA et al., 2003; NEVO et al., 2003). A domesticação ocorreu nas lavouras primitivas do Sudeste da Ásia entre 7.000 e 9.000 A.C. e foi introduzido na Índia, China e Europa desde cinco mil anos A.C..

A ampla adaptação ecológica do trigo cultivado é atribuída em parte à espécie doadora do genoma D, *T. tauschii*. Essa espécie possui uma distribuição mais oriental do que as outras genitoras, extendendo-se do nordeste da Síria, ao leste do Himalaia e China (MURPHY et al., 1997; GÖÇMEN et al., 1998).

2.5 Melhoramento vegetal através de hibridação interespecífica: importância das espécies afins do trigo na busca de genes de resistência a doenças e estratégias de transferência

Os grandes avanços no desenvolvimento de variedades e cultivares de alta produtividade são, em parte, resultado da exploração pelo homem dos reservatórios de armazenagem genética de traços ancestrais das cultivares. Assim, a conservação da biodiversidade é estratégica para satisfazer a crescente demanda alimentícia da população mundial (COUCIL, 1999).

A exploração de espécies afins de plantas cultivadas tem sido considerada uma das formas mais eficientes de introduzir genes adicionais em variedades cultivadas. Espécies silvestres ou afins são aquelas que formam, natural ou artificialmente, híbridos de baixa fertilidade com a espécie cultivada, devido às barreiras genéticas de isolamento, que impedem o livre fluxo de genes entre espécies distintas. O reconhecimento do valor das espécies afins e da importância dos centros de origem como fonte de variabilidade, não é recente. Entretanto, somente com o progresso do conhecimento sobre as relações citotaxonômicas dentro do gênero *Triticum* e da tribo *Triticeae* é que se tornou possível o desenvolvimento de metodologias eficientes de transferência, as quais permitiram a obtenção de novas fontes de resistência geneticamente distintas (revisão em MORAES-FERNANDES et al., 1990).

Para o uso das espécies afins também é indispensável o conhecimento do sistema genético das espécies a serem utilizadas como fontes e como receptoras. O sistema genético envolve o modo de reprodução e o sistema meiótico. Dependendo da constituição cromossômica e das afinidades entre os genomas das espécies envolvidas no cruzamento, estratégias distintas podem ser utilizadas para a transferência (MORAES-FERNANDES, 1988).

Se a resistência que se busca transferir estiver presente em espécies ancestrais, cujos genomas são homólogos aos do trigo, a transferência torna-se facilitada, pois a recombinação pode ocorrer através do sobre cruzamento. No entanto, diferentes estratégias deverão ser utilizadas se a resistência for localizada

em espécies com o genoma A, B ou D: retrocruzamentos e seleção citológica, uso de espécies “pontes” e a síntese de alopoliplóides, são algumas das alternativas mais usadas. Se a resistência for localizada em espécies cujos genomas não são homólogos, há necessidade de indução de translocações para inserir no genoma do trigo, um segmento cromossômico, que deve ser o menor possível para evitar a transferência de outros caracteres indesejáveis da espécie afim (revisão em MORAES-FERNANDES, 1988; MORAES-FERNANDES et al., 1990).

Os limites para a possibilidade de hibridação interespecífica dependem de muitas variáveis experimentais e ambientais. Falhas na fertilização podem ser contornadas pela utilização de genótipos diferentes, pela alternância das espécies genitoras (genitor masculino ou feminino), ou pelo uso de espécies “pontes”; as falhas no desenvolvimento do embrião ou do endosperma podem ser contornadas pelo uso de hormônios ou pela cultura de embriões híbridos imaturos; a variação nos números cromossômicos das plantas segregantes, pela seleção citológica das plantas resistentes. Porém, mesmo após a obtenção da linhagem hexaplóide podem ocorrer dificuldades na quebra de ligações com outros caracteres indesejáveis ou mesmo interações com o novo reservatório genético que causem a modificação, ou até, a supressão da resistência (MORAES-FERNANDES, et al., 1990).

Os primeiros a sintetizar artificialmente um anfidiplóide de trigo repetindo o processo ocorrido na natureza ($2n = 28$ AABB x $2n = 14$ DD) foram Mc Faden & Sears (1946). As vantagens da metodologia de obtenção destas linhagens sintéticas se referem à rapidez de obtenção de linhagens homozigotas porque, através da duplicação com colchicina do híbrido estéril ($2n = 21$, ABD), se obtém, em uma geração, uma fonte de resistência totalmente homozigota ($2n = 42$, AABBDD). Esta nova linhagem, devido a homologia genética, permite a transferência das características desejadas, diretamente para cultivares hexaplóides, através de sobrecruzamentos (MORAES-FERNANDES et al., 1988).

2.5.1 Obtenção de linhagens sintéticas

Caminho alternativo para a introgressão de germoplasmas utilizando pontes genéticas ou cruzamentos intermediários é sugerido quando a hibridação direta é impossível de se obter ou quando a transferência de genes por métodos mais simples falharem. O método basicamente funciona nas condições onde a espécie A é compatível com a espécie B, mas é incompatível com a espécie C. Contudo, cruzamentos entre as espécies B e C formam híbridos viáveis (PRESTES & GOULART, 1995).

Vários exemplos são citados na literatura. Burk (1967) transferiu para a *Nicotiana tabacum* a resistência ao vírus do mosaico do fumo da *N. repanda* por meio de “ponte” genética. As espécies *N. repanda* e *N. sylvestris* foram intercruzadas, e o híbrido estéril foi tratado com colchicina. Após a duplicação cromossômica, o alopoliplóide sintético foi retrocruzado duas vezes com *N. sylvestris*. A progênie resistente, quase similar à da espécie *N. sylvestris*, foi prontamente cruzada com *N. tabacum*, transferindo assim a resistência.

No caso do melhoramento do trigo, tendo *T. tauschii* a constituição genômica DD ($2n = 14$) e o trigo de panificação constituição genômica AABBDD ($2n = 42$), faz-se necessário a transferência das características desejáveis do nível diplóide para o hexaplóide, permitindo assim, o uso da fonte pelos melhoristas sem problemas relacionados com esterilidade e segregação para números cromossômicos. O procedimento clássico inclui o cruzamento da fonte de resistência DD ($2n = 14$) com uma espécie tetraplóide AABB ($2n = 28$), que irá servir de “ponte”, originando um híbrido ABD ($2n = 21$) o qual, duplicado com colchicina, é denominado trigo sintético, pois representa o resultado da síntese artificial de uma linhagem hexaplóide. O cruzamento sob condições controladas reproduz artificialmente o processo ocorrido naturalmente para a origem do trigo hexaplóide (MORAES-FERNANDES, 1988; MORAES-FERNANDES et al., 1990).

No período de 1978 a 1984 na Embrapa Trigo, a espécie *T. tauschii*, foi utilizada em cruzamentos com as espécies *T. dicoccum*, *T. durum* e *T. carthlicum* ($2n = 28$, genomas AABB). Em 45 combinações distintas, foram efetuadas 10.839 polinizações em 423 espigas; o percentual de formação de embriões permaneceu em torno de 21%, variando entre zero e 32%. Os mesmos foram colocados em meio de cultura, originando 133 plantas verdes, híbridas, as quais apresentaram $2n = 21$ cromossomos (ABD). Muitas hibridizações resultaram em necrose híbrida ou

esterilidade. Após tratamento com colchicina para restauração da fertilidade ($2n = 42$, AABBDD) resultaram onze linhagens sintéticas hexaplóides viáveis e férteis derivadas de cruzamentos que envolveram *T. durum* e *T. tauschii*, sendo que alguns genótipos apresentaram melhores níveis de resistência à ferrugem do colmo e oídio. Através desse trabalho foi comprovada a transferência e síntese, em uma fonte homocigota hexaplóide, de resistência presente em diferentes espécies ancestrais do trigo atualmente cultivado (MORAES-FERNANDES et al., 2000).

2.5.2 Obtenção de fontes de resistência através de cruzamentos diretos

A rota mais fácil de incorporação de genes de espécies selvagens para espécies cultivadas é a hibridação direta entre duas espécies com o mesmo nível de ploidia. Quando ambas as espécies possuem cromossomos homólogos, a obtenção de híbridos é facilitada. Por outro lado, a hibridação direta é o método mais comum de cruzamento de espécies selvagens diplóides com a cultivar poliplóide. Um cruzamento entre espécies tetraplóides e diplóides resulta em esterilidade parcial, cuja fertilidade é restaurada por tratamento com colchicina, produzindo dessa forma, uma progênie hexaplóide. Em teoria, parece ser um procedimento fácil, mas na prática existem várias barreiras de incompatibilidade e de esterilidade, além do efeito adverso de grupos gênicos de ligação que tornam a transferência mais difícil. O sucesso na transferência dependerá também de os cromossomos substituídos pelos da espécie selvagem poderem ser tolerados nas espécies comerciais (PRESTES & GOULART, 1995).

Há fortes evidências de que o sucesso deste tipo de cruzamento também depende da escolha dos progenitores e da direção do cruzamento. Em geral, usa-se a espécie de mais alta ploidia como o genitor feminino, assim, há menor desbalanceamento entre o número cromossômico do embrião e do endosperma. E, no caso do trigo, é mais fácil emascular espigas da forma hexaplóide do que espigas de espécies silvestres, que geralmente apresentam as glumas muito fechadas (MUJEB-KAZI & KIMBER, 1985; KNOTT, 1987; PRESTES & GOULART, 1995).

Tanto o genoma A como o B do trigo poliplóide são, até certo ponto, diferenciados quando comparados com os genomas atuais das espécies genitoras.

Dessa forma, parte da variação genética útil presente nos genomas A e B das espécies genitoras pode ser inacessível para transferência por métodos normais de recombinação para um substrato genético de elite. *T. tauschii* pode ser a mais adequada entre as espécies genitoras, para introgressão direta. Há homologia completa entre o genoma D do trigo hexaplóide e os de *T. tauschii* (RILEY & CHAPMAN, 1960). Não apenas a variação genética total de *T. tauschii* é mais facilmente acessível, como também há pouca interação genética negativa entre o genoma D do trigo e o de *T. tauschii*. Há evidências de que *T. tauschii* tem maior variabilidade genética útil do que a encontrada em outras espécies genitoras (GILL et al., 1986; GILL & RAUPP, 1987).

Em relação à transferência de genes de resistência encontradas em *T. tauschii* para o trigo hexaplóide, é possível a realização de cruzamentos diretos entre a cultivar hexaplóide suscetível AABBDD ($2n = 42$) e a fonte de resistência *T. tauschii* DD ($2n = 14$), originando o híbrido ABDD ($2n = 28$) que, após a cultura de embrião e determinação do número cromossômico é retrocruzado com a cultivar suscetível. As plantas que apresentarem número cromossômico $2n = 42$ poderão ser avaliadas para a característica buscada. A vantagem desse método é a colocação do gene desejado em um substrato já adaptado (MORAES-FERNANDES, 1988).

Em 1978, foi iniciado, na Embrapa Trigo, um projeto visando a utilização de espécies afins ao trigo para obtenção de caracteres úteis ao melhoramento varietal. Mais de mil entradas dos gêneros *Aegilops*, *Triticum*, *Hordeum*, *Secale* e *Agropyron* estavam disponíveis no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo, provenientes do Canadá e outros países. Muitos esforços foram empreendidos a fim de se obter linhagens hexaplóides sintéticas, portadoras de resistência à ferrugem da folha e outras moléstias, originadas da polinização artificial entre a espécie silvestre e *T. aestivum*.

No período de 1981 a 1983, cruzamentos diretos entre *T. aestivum* e *T. tauschii* foram realizados visando à transferência da resistência a várias moléstias fúngicas, encontrada em *T. tauschii*, para o trigo hexaplóide.

Sementes de *T. tauschii* foram vernalizadas durante oito semanas, a 3° C, o que é um pré-requisito básico para o florescimento de materiais com hábito de crescimento hibernal, e cultivadas em casa de vegetação.

Os cruzamentos foram realizados através da emasculação das plantas de *T. aestivum* e posterior polinização das mesmas com pólen de *T. tauschii*. Quatorze a 18 dias após a polinização os grãos imaturos foram retirados e o embrião resgatado e colocado em meio de cultura antes que ocorresse a degeneração do endosperma. As plantas verdes obtidas foram transferidas para vermiculita e aclimatadas para posterior transferência para a terra. Estas plantas foram retrocruzadas com o trigo hexaplóide, sendo que a progênie apresentou número cromossômico que variou de $2n = 38$ até $2n = 49$. A descendência dos híbridos que possuíam 42, 48 ou 49 cromossomos foi cultivada e, após uma geração de autofecundação, o material foi coletado para análise do comportamento meiótico e avaliação da fertilidade. As plantas analisadas apresentaram $2n = 51$, $2n = 47$ e $2n = 42$. Foi realizada a análise da meiose em metáfase I (estudo de pareamento), anáfase I (estudo de segregação) e quartetos (determinação do índice meiótico). Essas mesmas plantas foram ainda selecionadas para a resistência à *Erisiphe graminis* e *Stagonospora nodorum* em plântula e planta adulta, não resultando no entanto, em variedades comerciais. (MOHR et al., 1988, 1991; MORAES-FERNANDES & LINHARES, 1988).

A partir desses resultados, pode-se observar que a utilização de cruzamentos diretos em programas de melhoramento genético de trigo que buscam resistência a moléstias fúngicas, destacando-se entre elas a ferrugem da folha, é um método que permite, em poucas gerações, a transferência, para uma linhagem hexaplóide, de características presentes em espécies ancestrais distintas e difíceis de serem combinadas através de metodologias convencionais de melhoramento. Assim, essa técnica permite a eficiente transferência dos caracteres desejados ao trigo cultivado.

É importante enfatizar também que novas metodologias biotecnológicas de avaliação da resistência e da qualidade tecnológica também são empregadas para abreviar o tempo de seleção e incorporação de características importantes para o melhoramento de novos genótipos de trigo. Marcadores moleculares estão sendo utilizados para identificar regiões genômicas importantes em trigo e suas espécies afins, para as características de resistência à ferrugem da folha e, assim, auxiliar na definição de estratégias para o melhoramento desta característica. Outros estudos são também bem sucedidos através de técnicas

citogenéticas, tanto clássicas quanto modernas, associadas às tecnologias mais recentes de biologia molecular.

Além disso, a transferência dos genes das espécies afins ao trigo cultivado depende de quanto e de como são introgridos tais genes. A transferência torna-se facilitada quando ambas as espécies apresentam maior homologia entre seus cromossomos, permitindo maior recombinação genética.

Atualmente, novo horizonte se abre para o melhoramento vegetal com o uso da transgenia, pela sua precisão, rapidez e superação da necessidade de compatibilidade nos cruzamentos. Na medida em que se tornar possível usá-la para transferência de genes de espécies silvestres seu valor será grandemente aumentado, devido a rapidez na introgressão desses genes.

2.6 Ferrugem da folha do trigo

A ferrugem da folha do trigo (Figura 1), causada pelo fungo *Puccinia triticina* Erikss. (ANIKSTER et al., 1997), é uma das principais doenças fúngicas do trigo em todas as regiões do mundo em que o cereal é cultivado. O patógeno sobrevive nas mesmas condições de ambiente favoráveis ao desenvolvimento do trigo, e pode causar infecções se houver um período de umidade de 3 horas ou menos, e temperaturas ao redor de 20° C. A disseminação da doença pode ser

muito rápida sob temperaturas entre 10° C e 30° C (ROELFS et al., 1992). Este problema tem sido contornado com o uso de fungicidas; este método, no entanto, aumenta os custos de produção. Além disso, envolve riscos à saúde humana e animal e ao ambiente. Por outro lado, o uso de cultivares suscetíveis resulta em riscos, como o aumento da probabilidade de epidemias e a ameaça de patógenos mutantes capazes de superar a resistência (revisão em MORAES-FERNANDES, 1987).



Figura 1 – Ferrugem da folha do trigo (Embrapa Trigo, 2002).

Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Bacaltchuk (1998) destaca a necessidade de utilização de novas tecnologias, métodos e procedimentos baseados nos avanços científicos recentes, que visem o aumento da produtividade tritícola com redução de mão-de-obra e de insumos. Diante disso, a resistência

genética é o método mais eficiente de controle (BARCELLOS, 1994) e o conhecimento da presença e ausência de genes de resistência, já descritos, é um fator importante a ser considerado pelos melhoristas na escolha dos genitores para os cruzamentos (ZOLDAN, 1998).

O valor da resistência genética no controle de doenças de plantas é reconhecido há muito tempo. Os avanços na genética e as vantagens de plantar variedades resistentes tornaram o melhoramento para resistência possível e desejável. As fontes de resistência a doenças são as mesmas das outras características herdáveis em uma cultura: variedades comerciais locais ou estrangeiras, variedades antigas cujo cultivo tenha sido abandonado ou que tenham sido descartadas dos estoques dos melhoristas e também espécies silvestres afins à espécie cultivada (BRAMMER, 2000).

Vários genes para resistência à ferrugem da folha foram localizados nos três genomas do trigo (Tabela 2), destacando-se o genoma D, de *Triticum tauschii* como uma importante fonte de genes de resistência à ferrugem da folha (AUTRIQUE et al., 1995).

Tabela 2 – Localização genômica e cromossômica dos genes *Lr* mapeados em trigo. Modificado de Cereal Disease Laboratory (2006). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Atualmente existe um grande número de genes de resistência já identificados, descritos na literatura. As novas fontes de resistência são divulgadas e utilizadas pelos melhoristas, embora as ferrugens continuem a evoluir e a desafiar os especialistas, pela dificuldade de obter resistência estável (BARCELLOS et al., 1997; BARCELLOS, 2001a).

De acordo com Knott (1989), apesar da eficiência da resistência genética, que dispensa o uso de químicos ou de métodos culturais de controle, em muitos países produtores de trigo o

Cromossomo	Genoma A	Genoma B	Genoma D
1	<i>Lr10</i> <i>Lr11, Lr17, Lr37,</i>	<i>Lr24, Lr26, Lr33,</i> <i>Lr44, Lr46</i> <i>Lr13, Lr16, Lr23,</i>	<i>Lr21, Lr40, Lr41, Lr42</i>
2	<i>Lr 38, Lr45</i>	<i>Lr35</i>	<i>Lr2, Lr15, Lr22, Lr39</i>
3	-	<i>Lr27</i>	<i>Lr24, Lr32</i>
4	<i>Lr25, Lr28</i>	<i>Lr12, Lr30, Lr31</i>	-
5	-	<i>Lr18</i>	<i>Lr1, Lr34, LrB</i>
6	-	<i>Lr3, Lr9, Lr36</i>	-
7	<i>Lr20, Lr 47</i>	<i>Lr14</i>	<i>Lr19, Lr29, Lr34, Lr43</i>

melhoramento para resistência parece ser uma tarefa interminável.

Cultivares resistentes são desenvolvidas e lançadas. Sua produção aumenta rapidamente e surgem novas raças virulentas do patógeno. O ciclo do melhoramento, então, recomeça.

2.7 Marcadores moleculares – microssatélites

Nos últimos anos tem aumentado significativamente a aplicação de marcadores moleculares na detecção da variabilidade genética, ao nível do DNA, tanto em estudos genéticos como na prática do melhoramento vegetal (MOLINA, 1999). Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares são todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1995). Segundo Milach (1998a), marcadores moleculares são características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados.

O surgimento dos marcadores moleculares se deu devido à necessidade de detectar o polimorfismo diretamente no DNA e sua aplicação tem aumentado muito nos últimos anos, tanto em estudos genéticos, como em programas de melhoramento vegetal, visando à identificação de genótipos superiores nas populações segregantes através da seleção assistida (MILACH, 1998b).

Existem diversas razões para que os marcadores moleculares apresentem vantagens sobre os marcadores morfológicos convencionais. Em contrastes com características morfológicas, os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados co-dominantemente, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos (BRAMMER, 2000).

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subseqüentes, comprovando sua natureza genética (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e Minisatélites ou locos VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”); STS (“Sequence Tagged Sites”) ou ASA (“Amplified Specific Amplicon”); Microssatélite (ou SSR- “Simple Sequence Repeats”) e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”). (MILACH, 1998b).

Dentre todos os marcadores, segundo Milach (1998b), vários se baseiam no princípio do PCR (“Polymerase Chain Reaction”), na qual se realiza a síntese enzimática *in vitro* de um segmento de DNA na presença da enzima DNA polimerase e primers. Em comparação com as técnicas que envolvem hibridização de DNA, as de PCR geralmente são de custo menor e menos elaboradas (MILACH, 1998b). Entre os marcadores que utilizam PCR está o SSR ou microssatélites (LITT & LUTY, 1989).

Os microssatélites são seqüências de um a seis pares de bases repetidas “em tandem” e adjacentes, distribuídas no genoma. Esse tipo de marcador utiliza primers específicos que amplificam regiões com DNA repetitivo por se anelarem em regiões adjacentes às mesmas. A maior vantagem dessa técnica é o elevado polimorfismo revelado, o que a torna uma das melhores opções para uso na caracterização de cultivares e de mapeamento genético, especialmente em germoplasma aparentado e de baixa variabilidade (MILACH, 1998b).

Os microssatélites são considerados os marcadores mais polimórficos. Devido a sua abundância, distribuição uniforme ao longo do genoma, co-dominância e por serem usualmente

multialélicos, são os que mais se aproximam do ideal para estudos genéticos. No caso dos microssatélites qualquer cruzamento é potencialmente informativo para o mapeamento molecular, dispensando cruzamentos distantes. Essa característica é importante para o trigo, que é uma espécie poliplóide e autógama (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares associados a genes de resistência à ferrugem da folha em trigo tem sido identificados em diversos estudos (HELGUERA et al., 2000; RAUPP et al., 2001; HUANG & GILL, 2001).

Mohan et al., (1997) apresentam uma extensa revisão sobre marcadores moleculares associados a genes de resistência em diversas culturas agronomicamente importantes. A medida que mais marcadores associados a genes de resistência sejam encontrados e aumentando a saturação de mapas de ligação, o uso de marcadores moleculares na seleção assistida de genes de resistência tende a se tornar mais freqüente (MILACH & CRUZ, 1997).

Procunier et al., (1995) destacam que muitos genes que conferem resistência à ferrugem da folha têm sido introgrididos de espécies selvagens do trigo e são usados nos programas de melhoramento.

Walker & Rapley (1999) abordam que o mapeamento de genes foi e continua sendo o objetivo primário de muitas pesquisas básicas e aplicadas. Técnicas sofisticadas e de alta resolução estão sendo desenvolvidas para facilitar a identificação de genes associados com doenças, principalmente de genes que se combinam para determinar a suscetibilidade a uma doença específica.

IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA À RAÇA SPJ-RS DE
Puccinia triticina EM *Triticum tauschii*

ÂNGELA BOMFOCO DE ALMEIDA¹, MARIA IRENE BAGGIO², SANDRA PATUSSI BRAMMER³, MÁRCIA SOARES CHAVES⁴,

RESUMO - No Brasil, os prejuízos ocasionados pela ferrugem da folha do trigo, doença causada pelo fungo *Puccinia triticina*, ocorrem anualmente. A incidência generalizada nas diferentes regiões produtoras varia em intensidade, dependendo das condições climáticas, da resistência genética das cultivares e do controle químico, sendo que a utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente de controle. Os genes que conferem resistência à ferrugem da folha em trigo são denominados *Lr* (leaf rust). Vários desses genes já foram identificados e mapeados. Alguns deles foram mapeados diretamente em trigos hexaplóides, enquanto outros foram primeiramente encontrados _____

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Produção Vegetal.

² Orientadora, Bióloga, Dra. em Ciências: Genética, Professora do PPGAgro.

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra. em Genética e Biologia Molecular, Professora do PPGAgro e Pesquisadora da Embrapa Trigo.

⁴ Eng^a – Agr^a., Dra. Pesquisadora da Embrapa Trigo.

em espécies afins, com menor nível de ploidia, e, posteriormente, transferidos para o trigo cultivado. Das espécies afins, destaca-se a espécie diplóide *Triticum tauschii*, doadora do genoma D do trigo cultivado, como uma importante fonte de genes de resistência à ferrugem. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência à ferrugem da folha em acessos de *T. tauschii*, oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo (BAG – Passo Fundo, RS), para utilização dos mesmos em cruzamentos nos programas de melhoramento, a fim de incorporação desta resistência em cultivares comerciais. Quarenta acessos foram avaliados quanto à reação à raça SPJ-RS de *Puccinia triticina*, a qual tinha o maior espectro de

virulência ocorrente no Brasil até a realização do trabalho, e destes, 25% (10 acessos) apresentaram resistência. Dessa forma, os dados obtidos neste estudo servem como subsídio na escolha de acessos resistentes que poderão ser utilizados como genitores em programas de melhoramento genético a fim de incremento de resistência a esse patógeno. Futuramente estudos de postulação gênica e análises genéticas deverão ser realizados para avaliar o potencial desta estratégia no controle da ferrugem da folha do trigo.

Palavras-chave: trigo, ferrugem da folha, *Aegilops tauschii*, *Aegilops squarrosa*.

IDENTIFICATION OF RESISTANCE SOURCES TO *Puccinia triticina* RACE SPJ-RS IN *Triticum tauschii*

ABSTRACT - In Brazil, losses caused by *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust, happen annually. The widespread incidence in the different producing areas varies in intensity, depending on the climatic conditions, the genetic resistance of the cultivars and the chemical control. Resistant cultivars are the most efficient method of control, and the genes conferring resistance to leaf rust fungus are denominated *Lr*. Several of these genes were already identified and mapped. Some of them were mapped directly in hexaploid wheats, while others were firstly found in related species, with smaller ploidy level, and, later, transferred for cultivated wheat. Among related species, *Triticum tauschii* Coos, the diploid species donor of the D genome to cultivated wheat, is pointed out as an important source of resistance genes to the rust. The objective of this work was to evaluate the resistance to leaf rust in accesses of *Triticum tauschii*, from the Active Germplasm Bank of Embrapa Trigo (BAG - Passo Fundo, RS), in order to incorporate this resistance in commercial varieties. Forty accesses were evaluated for the reaction to SPJ-RS, the race of *Puccinia triticina* with the wide virulence range occurring in

Brazil until this work; and 25% (10 accesses) were resistant. The data obtained in this study can help the choice of resistant accesses to be used as parents in breeding programs in order to increase the resistance to the pathogen. Studies of gene postulation and genetic analyses need be done to evaluate the potential of this strategy in wheat leaf rust control.

Key words: wheat, leaf rust, *Aegilops tauschii*, *Aegilops squarrosa*.

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem da folha do trigo (*Triticum aestivum* L.) causada pelo fungo *Puccinia triticina* Eriks. (ANIKESTER et al., 1997), anteriormente descrita como *Puccinia recondita* Rob. Ex Desm. f. sp. *tritici*, é provavelmente a mais importante doença fúngica que afeta esse cereal. A redução na produtividade varia entre 5% a 30%, dependendo da severidade da doença e da cultivar usada (AUNG & KERBER, 1998; RAUPP et al., 2001).

A ferrugem é controlada basicamente, com o uso de fungicidas. No entanto, este método, provoca o aumento dos custos de produção, exigindo a compra de produtos, maquinaria adequada e mão-de-obra para aplicação (TURRA, 2004). Dessa forma, a utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente e econômico para a redução das perdas provocadas pela ferrugem na lavoura (RAUPP et al., 2001).

Grandes progressos no melhoramento para resistência à ferrugem da folha do trigo foram alcançados nas últimas décadas, no entanto, o estreitamento da base genética e o surgimento de novas raças patogênicas implicam na necessidade contínua de buscar novas fontes de resistência (AGHAEI-SARBARZEH, et al., 2001).

Com o intuito de obter cultivares mais adaptadas e com resistência a essa moléstia, a introgressão de genes de espécies silvestres representa grande potencialidade econômica (BARBOSA et al., 1993, ANGRA et al., 1996).

A maioria das espécies da tribo *Triticeae* possui resistência genética à ferrugem da folha. (MORAES-FERNANDES et al. 2000; ZAHARIEVA et al., 2001; STEPIÉN et al., 2003). Essa resistência é baseada em genes de resistência, *Lr* (leaf rust), que são efetivos durante todo o ciclo da planta. No trigo, 57 genes *Lr*, para resistência à ferrugem foram descritos (MCINTOSH et al., 1995a, MCINTOSH et al., 1995b, SINGH et al., 1998; GOEL & SAINI, 2001, MCINTOSH et al., 2003). Assim, tem sido enfatizada a necessidade do melhoramento genético para a introgressão desses genes.

Entre as espécies silvestres que tem fornecido importantes genes de resistência específica *Lr* (como *Lr21*, *Lr22a*, *Lr32*, *Lr39*, *Lr40*, *Lr41*, *Lr42* e *Lr43*), se encontra *Triticum tauschii* (syn. *Aegilops squarrosa*, *Aegilops tauschii*, $2n = 2x = 14$, DD), a qual apresenta uma ampla distribuição ecológica e tem sido considerada uma das espécies diplóides mais importantes do grupo *Triticum-Aegilops*

(ZOHARY et al., 1969; COX et al., 1992; AGUILAR-RINCÓN et al., 2000; ASSEFA & FEHRMANN, 2004).

Além disso, *T. tauschii*, é uma espécie a que se tem dado particular atenção por produzir hexaplóides sintéticos (AABBDD), obtidos mediante cruzamentos interespecíficos diretos, podendo ser útil na transferência de genes de interesse (MUJEEB-KAZI, 1995; MORAES-FERNANDES et al., 2000; AGUILAR-RINCÓN et al., 2000). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência à raça SPJ-RS de *Puccinia triticina* em acessos de *T. tauschii* para posteriores cruzamentos em programas de melhoramento, a fim de incorporar esta resistência em cultivares comerciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Casa de Apoio da Embrapa Trigo (Passo Fundo – RS), durante o período de março a junho de 2004.

Foram avaliados 40 acessos de *T. tauschii* (Tabela 1), oriundos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) dessa instituição, os quais são provenientes da Universidade de Manitoba, Canadá, cuja identificação original apresenta a sigla RL, que se refere à Leaf Rust Laboratory. Na Embrapa Trigo, durante o período de 1978 a 1985, foram realizados diversos experimentos pelos pesquisadores Maria Irene Baggio de Moraes-Fernandes e Ariano Moraes Prestes, quanto à resistência à ferrugem da folha, ferrugem do colmo, oídio, septoria, giberela e helmintosporiose, além de análises citogenéticas. A partir dos resultados obtidos, nova denominação foi determinada para os respectivos acessos, mediante o número de entrada (NE) no BAG.

Tabela 1 – Acessos de *Triticum tauschii* utilizados no trabalho. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Número	Código do Acesso	Origem no BAG -Embrapa Trigo
1	RL5003	Oídio 89
2	RL5491	180455/89
3	RL5492	180457/89
4	RL5495	180458/89
5	RL5496	180460/89
6	RL5497	30720/88
7	RL5522	140510/83
8	RL5523	247369/94
9	RL5525	247375/94
10	RL5527	247376/94
11	RL5528	340010/91
12	RL5531	340014/91
13	RL5536	340016/91
14	RL5537	50744/82
15	RL5538	247381/94
16	RL5540	247382/94
17	RL5543	340019/91
18	RL5544	247383/94
19	RL5547	340021/91
20	RL5550	30769/88
21	RL5555	340028/91
22	RL5556	340030/91
23	RL5558	340031/91
24	RL5559	247397/94
25	RL5560	247399/94
26	RL5565	247401/94
27	RL5570	247403/94
28	NE 29227C	135278/93
29	RL 5422	OIDIO 89
30	RL 5552	247407/94
31	RL 5562	340033/91
32	RL 5660	825019/98
33	RL 5660	151653/85
34	RL 5665	825023/98
35	RL 5668	825024/98
36	RL 5684	825036/98
37	RL 5695	825042/98

38	RL 5771	OIDIO 89
39	RL 5793	625055/96
40	RL 5799	OIDIO 89

A raça de *P. triticina* selecionada para a inoculação foi SPJ-RS (LONG & KOLMER, 1989), por apresentar o mais amplo espectro de virulência ocorrente no Brasil até a realização dos testes. A raça SPJ-RS foi identificada em amostras de ferrugem coletadas em 2002 e é avirulenta aos genes *Lr3*, *Lr3ka*, *Lr16*, *Lr20*, *Lr21* e *Lr30*, e virulenta a *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr23*, *Lr24* e *Lr26* (CHAVES & BARCELLOS, 2006).

Sementes dos acessos selecionados foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% e álcool etílico a 70%, por 1 minuto cada, sendo em seguida, colocadas em papel germitest umedecido com água destilada e posteriormente transferidas para geladeira, durante sete dias, a 4 °C para realizar a quebra da dormência das mesmas. Após o processo de vernalização, as sementes foram transferidas para germinador a 20° C durante 15 dias, a fim de promover a germinação e o desenvolvimento da parte aérea até esta atingir cerca de 10 cm.

As plântulas foram então, transferidas para copos plásticos contendo 150 g de solo nativo. A acidez foi corrigida com calcário e adicionou-se adubação recomendada pela análise de solo. Cada acesso foi semeado em três copos; cada copo contendo três sementes. Os copos foram dispostos completamente ao acaso e mantidos em casa de vegetação.

Uredíniosporos da raça SPJ-RS em suspensão de óleo mineral Soltrol, foram inoculados na primeira folha totalmente expandida das plântulas, após estas terem sido aspergidas com solução aquosa contendo, aproximadamente, duas gotas por litro de Tween 20[®]. Após 16 horas em câmara úmida, na ausência de luz, com saturação de umidade sem escorrimento à temperatura de 20 °C, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação e distribuídas completamente ao acaso, sob condições naturais de luminosidade, umidade relativa na faixa de 60-80% e temperatura de cerca de 22±2 °C, tendo, por curtos períodos de tempo, esta atingido 30 °C. Juntamente com as plântulas dos acessos de *T. tauschii*, foram inoculados, também em fase de plântula, um conjunto da série internacional de diferenciais para raças de *P. triticina* (LONG & KOLMER, 1989), como aferidor da raça inoculada, e a cultivar de trigo Coxilha (testemunha suscetível). O tipo de infecção foi avaliado

dez a 15 dias após a inoculação. O método para estimar o tipo de infecção foi o internacionalmente utilizado: 0, ;, 1, 2, 3, 4 (Tabela 2 e Figura 1). Tipos de infecção 3 e 4 são considerados altos, correspondendo à suscetibilidade no hospedeiro, e os demais, à resistência (ROELFS et al., 1992).

Tabela 2 - Reação, tipos de infecção e sintomas de *Puccinia triticina* em primeira folha de plântulas de trigo (ROELFS et al., 1992). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Reação ¹	Tipo de infecção	Sintomas
R	0	Nenhuma pústula ou outro sinal macroscópico de infecção
	;	Sem pústulas, com pequenos pontos cloróticos ou necróticos (hipersensibilidade)
	1	Pústulas diminutas, circundadas por clorose/ necrose
	2	Pústulas pequenas a médias, freqüentemente circundadas por clorose ou necrose
S	3	Pústulas médias, que podem estar associadas com clorose
	4	Pústulas grandes, sem clorose

R=Resistência; S=Suscetibilidade

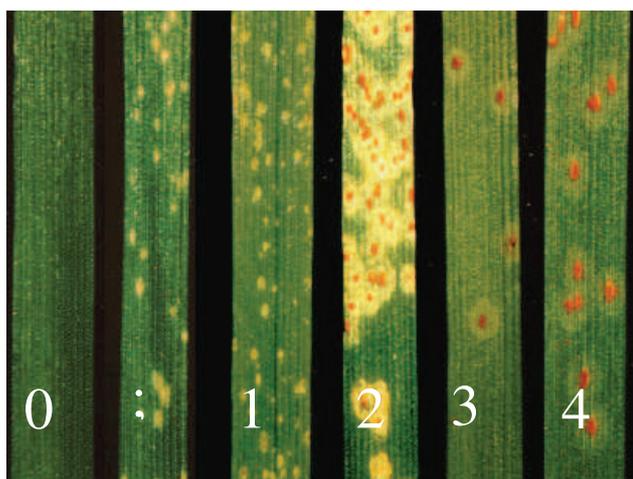


Figura 1 - Sintomas e tipos de infecção de *Puccinia triticina* em plântulas de trigo. Tipos de infecção de 0 a 2: avirulência (resistência), 3 e 4: virulência (suscetibilidade). Foto: Dr. James Kolmer, USDA-ARS, Dept. Plant Pathology, St. Paul, MN, USA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies silvestres tornaram-se importantes fontes de germoplasma para os programas de melhoramento, uma vez que a uniformidade genética das culturas leva à erosão da variabilidade genética. Tais espécies possuem ampla variabilidade natural e, conseqüentemente, são fontes de novos genes agronomicamente úteis,

principalmente no que se refere à resistência a doenças (PRESTES & GOULART, 1995; BRAMMER et al., 2002b).

T. tauschii é reconhecida por ser fonte de um grande número de genes de resistência para a maior parte das doenças que atacam o trigo, destacando-se a ferrugem da folha. Dessa forma, apresenta-se como uma importante alternativa aos programas de melhoramento. Por ser a espécie doadora do genoma D do trigo cultivado, a transferência de genes ocorre de forma rápida e eficiente, possibilitando a ocorrência de cruzamentos diretos entre *T. tauschii* e *T. aestivum* (HUSSIEN et al., 1997; RAUPP et al., 2001). Dos 40 acessos avaliados 10 acessos (RL 5003, RL 5491, RL 5496, RL 5497, RL 5528, RL 5531, RL 5550, RL 5665, RL 5771, RL 5793) apresentaram resistência à ferrugem em estágio de plântula, totalizando um percentual de 25% de acessos resistentes (Tabela 3). Estes resultados evidenciam a variabilidade de reação à *P. triticina* dos acessos de *T. tauschii* testados.

A ocorrência de variabilidade genética quanto à reação a doenças tem sido salientada na literatura internacional por vários autores (KNOTT & DVORAK, 1976; DHALIWAL et al., 1986). No Brasil, mais de 700 entradas de várias espécies afins ao trigo foram

testadas para resistência a septoriose (MORAES-FERNANDES et al., 1980). Diversas espécies mostraram resistência em plântula, mas as entradas de *T. tauschii* foram aquelas que apresentaram melhor nível de resistência à essa moléstia, nesse estágio. Esses dados são concordantes com os resultados aqui relatados quanto a testes no estágio de planta jovem.

Tabela 3 - Acessos de *Triticum tauschii* e tipo de infecção em primeira folha de plântulas inoculadas com a raça SPJ-RS de *Puccinia triticina*, sob condições controladas. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Número	Código do Acesso	Tipo de Infecção
1	RL5003	0
2	RL5491	;
3	RL5492	3
4	RL5495	3
5	RL5496	;
6	RL5497	0
7	RL5522	3
8	RL5523	3
9	RL5525	3
10	RL5527	3
11	RL5528	1
12	RL5531	;
13	RL5536	3
14	RL5537	3
15	RL5538	3
16	RL5540	3
17	RL5543	3
18	RL5544	3
19	RL5547	3
20	RL5550	;
21	RL5555	3
22	RL5556	3
23	RL5558	3
24	RL5559	3
25	RL5560	3
26	RL5565	3
27	RL5570	3
28	NE 29227C	3
29	RL 5422	3
30	RL 5552	3
31	RL 5562	3
32	RL 5660	3
33	RL 5660	3
34	RL 5665	;
35	RL 5668	3
36	RL 5684	3
37	RL 5695	3
38	RL 5771	;
39	RL 5793	;
40	RL 5799	3

Dessa forma, os acessos de *T. tauschii* que apresentaram resistência em plântula à ferrugem da folha constituem-se em germoplasma valioso para cruzamentos com materiais de trigo suscetíveis à *P. triticina* a fim de incorporação de resistência genética a esses materiais.

As reações dos acessos resistentes variaram de 0 a 1, o que sugere a possibilidade de que os genes presentes nestes acessos sejam diferentes. Diversos genes *Lr* foram relatados em *T. tauschii* (BARCELLOS et al., 1997; CEREAL DISEASE LABORATORY, 2006). Dentre os 57 genes *Lr* conhecidos, os genes *Lr21*, *Lr22a*, *Lr32*,

Lr 39, Lr40, Lr41, Lr42 e Lr43, podem estar presentes, uma vez que ambos possuem origem em *T. tauschii* (CEREAL DISEASE LABORATORY, 2006). O conhecimento dos genes *Lr* presentes, tanto nas fontes de resistência quanto nas cultivares, o número de genes envolvidos, o fenótipo da reação do hospedeiro à infecção, o estágio de desenvolvimento da planta em que a resistência se expressa, as interações com o ambiente, os mecanismos genéticos envolvidos e a combinação das resistências específica e não-específica a raças são aspectos de extrema valia nos programas de melhoramento, porque permite utilizar os genes disponíveis de forma a obter uma proteção consistente contra o patógeno (BARCELLOS, 2001b; BRAMMER et al., 2002a).

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que a utilização de *T. tauschii* para a criação de fontes de resistência é uma estratégia promissora para o controle da ferrugem da folha do trigo. Para que o potencial prático dessa estratégia possa ser melhor utilizado, outros estudos sobre a herança, expressão e as interações dos genes *Lr* serão de grande utilidade.

4 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que existe variabilidade no germoplasma de *T. tauschii* presente no BAG da Embrapa Trigo, no que se refere a resistência à raça SPJ-RS de *Puccinia triticina*.

**AVALIAÇÃO DA SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE
Triticum tauschii POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**ÂNGELA BOMFOCO DE ALMEIDA¹, MARIA IRENE BAGGIO², SANDRA
PATUSSI BRAMMER³, ANA LÍDIA VARIANI BONATO⁴**

As espécies afins às plantas cultivadas são importantes para os programas de melhoramento, como fonte de variabilidade genética. *Triticum tauschii* ($2n = 14$) é o doador do genoma D do trigo cultivado hexaplóide ($2n = 42$, AABBDD) e é fonte de genes de resistência a diversas moléstias atualmente disponíveis para o

melhoramento desta cultura. O conhecimento da similaridade genética entre os acessos dos bancos de germoplasma é importante para um uso mais preciso e eficiente dos recursos genéticos. Técnicas de biologia molecular, baseadas nos marcadores microssatélites, permitem a análise e detecção de diferenças individuais ao nível do DNA, tornando as medidas mais fáceis e diretas. Com a finalidade de

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Produção Vegetal.

² Orientadora, Bióloga, Dra. em Ciências: Genética, Professora do PPGAgro.

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra. em Genética e Biologia Molecular, Professora do PPGAgro e Pesquisadora da Embrapa Trigo.

⁴ Eng^a – Agr^a., Dra, Pesquisadora da Embrapa Trigo.

investigar a similaridade de 40 acessos de *Triticum tauschii* do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Trigo marcadores microssatélites foram analisados. O grau de similaridade variou de 0,17 a 0,92; indicando um alto nível de diversidade genética, podendo ser usado como um apoio adicional na escolha dos genitores no planejamento de cruzamentos para transferência de características úteis do nível diplóide para o hexaplóide.

Palavras-chave: *Aegilops tauschii*, *Aegilops squarrosa*, diversidade genética.

EVALUATION OF GENETIC SIMILARITIES BETWEEN *Triticum tauschii* BY MICROSATELLITES MARKERS

ABSTRACT – Related species of crop plants, being sources of genetic variability, are important for breeding programs. *Triticum tauschii* ($2n = 14$) is the donor of D genome of cultivated hexaploid wheat ($2n = 42$, AABBDD) and is a source of several disease resistance genes now available from wheat improvement. The knowledge of genetic similarity in germoplasma banks accesses is important for a more precise and efficient use of these genetic resources. Molecular biology techniques, based on microsatellite markers, allow the analysis and detection of individual differences at DNA level, making the measurements of genetic diversity, easier and more direct. In order to investigate the microsatellite markers similarity, 40 accesses of *T. tauschii*, from Germoplasm Bank (BAG) of Embrapa Trigo were analysed. The similarity degree was 0,17 a 0,92; indicating a high level of genetic diversity and may be used as an additional support for parents choice in planning crosses for transference of useful genes from diploid to hexaploid level.

Key words: *Aegilops tauschii*, *Aegilops squarrosa*, genetic diversity

1 INTRODUÇÃO

Recursos genéticos provenientes de espécies diplóides ancestrais estão sendo cada vez mais utilizados nos programas de melhoramento de trigo devido ao aumento da uniformidade genética das cultivares modernas (EASTWOOD et al., 1991; SCHACHTMAN et al., 1991; WILLIAM et al., 1993; MCKENDRY & HENKE, 1994; COX et al., 1995; HSAM et al., 2001; YAN et al., 2003).

De acordo com revisão em Bered et al. (2002) desde o início do século XX, os principais cereais cultivados vêm sofrendo intensa manipulação humana a partir da hibridação artificial e seleção, com o objetivo de aumentar o rendimento de grãos. Como resultado, os melhoristas obtiveram um expressivo ganho genético na maioria das espécies. No caso do trigo, o ganho foi estimado em até 50%, entretanto, em virtude dos freqüentes e intensos ciclos de seleção, está ocorrendo uma redução da variabilidade genética.

A utilização de recursos genéticos para a obtenção de novos genes, principalmente de resistência a doenças, inclui o uso dos parentes selvagens dos cereais e o germoplasma proveniente dos centros de diversidade das espécies cultivadas. *Triticum tauschii* (syn. *Aegilops squarrosa*, *Aegilops tauschii*, $2n = 2x = 14$, DD), tem se mostrado uma importante fonte de genes de interesse, que podem ser usados como fonte de resistência a diversas moléstias que afetam o trigo cultivado (*Triticum aestivum* L. em Thell) (EASTWOOD et al., 1991; MCKENDRY & HENKE, 1994; HSAM et al., 2001; YAN et al., 2003; ASSEFA et al., 2004).

Por ser a espécie doadora do genoma D do trigo hexaplóide, o genoma de *T. tauschii* e o genoma D do trigo cultivado são altamente relacionados, sendo que os cromossomos de *T. tauschii* efetuam um completo pareamento com os cromossomos encontrados no genoma D de *T. aestivum*. Dessa forma, a transferência de genes na produção de populações resistentes ocorre de forma rápida e eficiente (PESTOVA et al., 2000; RAUP et al., 2001; BOYKO et al., 2004).

Tendo em vista que *T. aestivum* é um alohexaplóide ($2n = 42$, AABBDD) formado por três diferentes genomas A, B e D, sendo o produto da hibridação entre o trigo tetraplóide *T. turgidum* L. ($2n = 28$, AABB) e a espécie diplóide *T. tauschii* (RÖDER et al., 1998; PESTOVA et al., 2000) o estudo da variabilidade genética dessas espécies ancestrais representa uma importante ferramenta na busca de diversificação genética. Alia-se a isso o fato do trigo ser uma das culturas de maior expansão mundial, ocupando cerca de 17% de toda a área de cereais cultivada no mundo, fornecendo ainda cerca de 20% do total de calorias consumidas pela humanidade (GILL et al., 2004).

Visando estudar a similaridade e/ou diversidade genética das espécies afins ao trigo cultivado, o uso de marcadores moleculares microsatélites apresenta-

se como uma técnica importante aos programas de melhoramento genético (PESTOVA et al., 2000).

Microsatélites ou seqüências simples repetidas (SSRs) são unidades de cerca de 1 a 6 nucleotídeos repetidas “em tandem” (em seqüência) dentro do genoma dos organismos eucariotos (LITT & LUTY, 1989). São utilizados como marcadores moleculares devido ao alto nível de polimorfismo encontrado em seus locos o que proporciona sua utilização em diversos estudos. Além disso, apresentam como vantagens eficiência, estabilidade e codominância, estando assim, entre os marcadores mais informativos para estudos em trigo (FAHIMA et al., 1998; RÖDER et al., 1998; SONG et al., 2004).

Vários estudos procurando caracterizar o mapa genético do trigo através de marcadores microsatélites já foram desenvolvidos. Esses marcadores têm sido utilizados com sucesso em estudos de similaridade e diversidade genética e mapeamento genético (PESTOVA et al., 2000; SALINA et al., 2000; SUN et al., 2002; SONG et al., 2004; SONG et al., 2005).

Em razão da diversidade genética requerida nos programas de melhoramento, torna-se fundamental a caracterização das espécies silvestres afins ao trigo. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a similaridade genética de acessos de *T. tauschii* através de marcadores microsatélites, para posterior utilização em cruzamentos, a fim de incorporação de genes agronomicamente importantes ao melhoramento do trigo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e extração de DNA

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia – área de genética molecular - do Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno da Embrapa Trigo (Passo Fundo – RS). Foram avaliados 40 acessos* de *T. tauschii* oriundos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) dessa instituição.

Os acessos selecionados são oriundos da Universidade de Manitoba, Canadá, cuja identificação original apresenta a sigla RL, que se refere à Leaf Rust Laboratory. Na Embrapa Trigo, durante o período de 1978 a 1985, foram realizados diversos experimentos pelos pesquisadores Maria Irene Baggio de Moraes-Fernandes e Ariano Moraes Prestes, quanto à resistência à ferrugem da folha, ferrugem do colmo, oídio, septoria, giberela e helmintosporiose, além de análises citogenéticas. A partir dos resultados obtidos, nova denominação foi determinada para os respectivos acessos, mediante o número de entrada (NE) no BAG (Tabela 1).

* Acesso: amostra de germoplasma representativa de um indivíduo ou de vários indivíduos da população. Em caráter mais geral, qualquer registro individual constante de uma coleção de germoplasma (Valois et al., 1996).

Tabela 1 – Acessos de *Triticum tauschii* utilizados. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Número	Código do Acesso	Origem no BAG -Embrapa Trigo
1	RL5003	Oídio 89
2	RL5491	180455/89
3	RL5492	180457/89
4	RL5495	180458/89
5	RL5496	180460/89
6	RL5497	30720/88
7	RL5522	140510/83
8	RL5523	247369/94
9	RL5525	247375/94
10	RL5527	247376/94
11	RL5528	340010/91
12	RL5531	340014/91
13	RL5536	340016/91
14	RL5537	50744/82
15	RL5538	247381/94
16	RL5540	247382/94
17	RL5543	340019/91
18	RL5544	247383/94
19	RL5547	340021/91
20	RL5550	30769/88
21	RL5555	340028/91
22	RL5556	340030/91

23	RL5558	340031/91
24	RL5559	247397/94
25	RL5560	247399/94
26	RL5565	247401/94
27	RL5570	247403/94
28	NE 29227C	135278/93
29	RL 5422	OIDIO 89
30	RL 5552	247407/94
31	RL 5562	340033/91
32	RL 5660	825019/98
33	RL 5660	151653/85
34	RL 5665	825023/98
35	RL 5668	825024/98
36	RL 5684	825036/98
37	RL 5695	825042/98
38	RL 5771	OIDIO 89
39	RL 5793	625055/96
40	RL 5799	OIDIO 89

Para obtenção do tecido vegetal, sementes dos acessos selecionados foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% e álcool etílico a 70%, por 1 minuto cada, sendo em seguida, colocadas em papel germitest umedecido com água destilada e posteriormente transferidas para germinador a 20° C durante 15 dias, a fim de promover a germinação e o desenvolvimento da parte aérea até esta atingir cerca de 10 cm.

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o método CTAB (modificado), descrito por Saghai-Marooft et al., (1984), sendo que as amostras de DNA obtidas foram mantidas a - 80° C, até o momento do uso.

2.2 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Pharmacia-Ultrospece 1000), com diluição do DNA concentrado de 1/100, sendo a pureza da amostra verificada através da relação entre as leituras de absorbância a 260 nm (detecta presença de DNA) e a 280 nm (detecta presença de proteínas e polissacarídeos).

O cálculo da concentração de DNA foi obtido pela multiplicação da leitura de absorbância à 260 nm, o fator de Unidade Ótica (50), e o fator de diluição (100).

Para verificação da integridade do DNA, fez-se eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando-se DNA de fago lambda como padrão (MANIATIS et al., 1982). As amostras de DNA foram diluídas para uma concentração de 25 ng/μl e mantidas a -20° C.

2.3 Marcadores microssatélites e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os 20 primers (Tabela 2) empregados foram desenvolvidos especificamente para o genoma D do trigo, conforme consulta em Röder et al., (1998), Pestova et al., (2000) e Gupta et al., (2002). Os mesmos foram escolhidos devido à sua localização cromossômica, procurando cobrir a maior parte dos sete cromossomos da espécie em questão.

Os principais componentes da reação de PCR para uma reação de 20 μl de volume foram: tampão PCR na concentração de 1x, cloreto de magnésio na concentração de 1,5 mM, dNTPs na concentração de 0,8 mM, primer na concentração de 250 nM, Taq polimerase 1U e 25 ng de DNA.

Para o preparo do MIX, ou seja, os componentes da reação, exceto o DNA, os valores encontrados foram multiplicados pelo número de amostras (40) que foram testadas. O DNA de cada amostra foi aplicado primeiro, separadamente do MIX. Para cada primer testado foi feito um novo MIX.

Tabela 2 – Primers específicos para o genoma D empregados nas análises moleculares por microsatélites. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Primer	Localização	Primer esquerda	Primer direita	T° de Anelamento (°C)	Referência
GDM 5	2D	CTA GCC AGA AGG TTA CTT TG	CAA CAT TAA CAT TAA CGC AC	50	Pestova et al., 2000
GDM 6	2D	GAT CAA TCA AGC ATG TGT GTG T	GGA TGC CAT GCC AAA GTA TT	60	Pestova et al., 2000
GDM 8	3D	TTC TCC AAC GCA CGT TAG C	CCC AAA TGA TGG CAG CTA CT	55	Pestova et al., 2000
WMC 25	2D	TAA GAT ACA TAG ATC CAA CAC C	TCT GGC CAG GAT CAA TAT TAC T	50	Gupta et al., 2002
WMC 41	2D	GGA GGA AGA TCT CCC GGA GCA GAT	TCC CTC TTC CAA GCG CGG ATA GAT	55	Gupta et al., 2002
WMC 48	4D	ACG TGC TAG GGA GGT ATC TTG CAT	GAG GGT TCT GAA ATG TTT TGC CAT	55	Gupta et al., 2002
WMC 52	4D	GAA CGC ATC AAG GCA TGA AGT AAT	TCC AAT CAA TCA GGG AGG AGT AAT	55	Gupta et al., 2002
GDM 62	3D	GAA AGC CGT CCA CTG CC	GAT CTT GAA GCA CTC TTG GT	55	Pestova et al., 2000
GDM 107	2D	AGC AAC AAA CGC GAG AGC	TGA CAC CCG GTT GTT GG	55	Pestova et al., 2000
WMS 114	3D	ATC CAT CGC CAT TGG AGT G	ACA AAC AGA AAA TCA AAA CCC G	60	Röder et al., 1998
WMC 167	2D	TCG GTC GTA TAT GCA TGT AAA G	AGT GGT AAT GAG GTG AAA GAA G	55	Gupta et al., 2002
WMS 205	5D	GGG TCT TCA TCC GGA ACT CT	CCA TGA TTT ATA AAT TCC ACC	60	Röder et al., 1998
WMS 210	2D	TGC ATC AAG AAT AGT GTG GAA G	TGA GAG GAA GGC TCA CAC CT	60	Röder et al., 1998
WMS 232	1D	ATC TCA ACG GCA AGC CG	CTG ATG CAA GCA ATC GAC C	55	Röder et al., 1998
WMC 245	2D	AGA TGC TCT GGG AGA GTC CTT A	GCT CAG ATC ATC CAC CAA CTT C	50	Gupta et al., 2002
WMS 295	7D	GTG AAG CAG ACC CAC AAC AC	GAC GGC TGC GAC GTA GAG	60	Röder et al., 1998
WMC 331	4D	GGA GTT CAA TCT TTC ATC ACC AT	CCT GTT GCA TAC TTG ACC TTT TT	55	Gupta et al., 2002
WMS 341	3D	TTC AGT GGT AGC GGT CGA G	CCG ACA TCT CAT GGA TCC AC	55	Röder et al., 1998
WMS 455	2D	ATT CCG TTC GCT AGC TAC CA	ACG GAG AGC AAC CTG CC	55	Röder et al., 1998

WMS 642	ID	ACG GCG AGA AGG TGC TC	CAT GAA AGG CAA GTT CGT CA	60	Röder et al., 1998
---------	----	------------------------	----------------------------	----	--------------------

Depois da aplicação do DNA, todos os componentes do MIX foram somados e divididos pelo número total de amostras. O valor encontrado foi o volume aplicado para cada amostra de DNA.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador MJ Research modelo PTC 100, programado para: 45 ciclos a 94° C por 1 minuto; 50, 55 ou 60° C (dependendo da especificidade de cada primer, de acordo com a Tabela 2) por 1 minuto; 72° C por 2 minutos e 1 ciclo de extensão a 72° C por 10 minutos.

2.4 Análise eletroforética dos fragmentos amplificados por PCR

Os produtos da amplificação acrescidos de 10 µl de tampão da amostra contendo azul de bromofenol, foram submetidos à eletroforese horizontal, em géis de agarose 2% submersos, preparados em TBE 1X juntamente com brometo de etídio (10 mg/ml) e aplicado diretamente no momento da confecção do gel, na quantidade de 20 µl, utilizando-se o tampão TBE 1X para a corrida. A visualização dos fragmentos foi feita sob luz ultra violeta. Em seguida os géis foram fotografados sob UV, com filtro 35 mm preto e branco, utilizando-se máquina fotográfica Polaroid com filtro laranja.

2.5 Análise estatística

Para a análise da similaridade genética, primeiramente foram construídas matrizes de dados, codificando-se a presença (1) ou ausência (0) das bandas visualizadas nos géis. A ausência de amplificação num indivíduo foi considerada como dado perdido (9). A análise dos dados foi realizada através do programa NTSYS versão 2.0 “Numerical Taxonomy System of Multivariate Analysis System” (ROHLF, 1998).

A similaridade genética entre os diferentes acessos foi estimada pelo coeficiente de Jaccard (1901), uma vez que esse índice é utilizado para fenótipos não interpretáveis em nível de locos e alelos por ser próprio para dados do tipo presença/ausência (dados binários) (ALFENAS et al., 1991; ALFENAS, 1998).

Os acessos foram agrupados usando o UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), desenvolvido por Sokal & Michener

(1958), ou método de agrupamento aos pares usando médias não ponderadas, sendo que os acessos foram considerados as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e os caracteres (binários) foram as bandas obtidas por microssatélites.

A correlação cofenética entre os dados da matriz de similaridade genética e os valores cofenéticos do dendrograma foi estimada para indicar a representatividade do dendrograma em relação às estimativas originais de similaridade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quarenta acessos de *T. tauschii* oriundos do BAG-Embrapa Trigo, foram analisados quanto à similaridade genética através de marcadores microssatélites visando a avaliação da sua variabilidade genética. Um grande número de bandas polimórficas pôde ser detectado, o que reflete a grande diversidade genética existente nesse material, como também comprova a natureza multialélica desse tipo de marcador.

De um total de 20 pares de primers testados na avaliação do polimorfismo em SSR, 19 pares (95%) amplificaram, dando origem a bandas polimórficas, sendo que o primer monomórfico foi WMS 114. Segundo Ling et al., (2004), o genoma de *T. tauschii* é altamente polimórfico e estudos realizados com marcadores RFLP demonstraram que mais de 60% dos marcadores testados foram polimórficos.

De acordo com Röder et al., (1998), marcadores microssatélites apresentam um maior nível de polimorfismo e por serem multialélicos são altamente informativos, podendo ser usados em estudos de evolução e similaridade genética. Além disso, por serem abundantes e necessitarem de pequena quantidade de DNA genômico para análise, são adequados como marcadores genéticos de trigo para mapeamento de genes agronomicamente úteis.

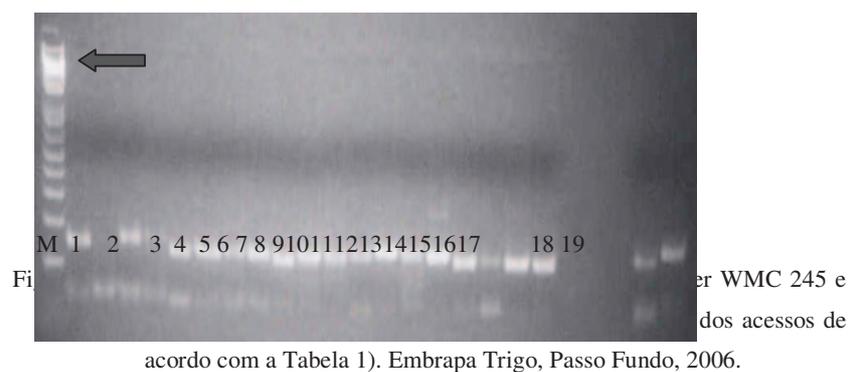
O alto polimorfismo encontrado refere-se ao fato dos primers testados serem isolados de regiões microssatélites encontradas especificamente no genoma D do trigo cultivado, sendo então, amplificadas no genoma de *T. tauschii*. Da mesma forma, Pestova et al., (2000), detectaram que primers desenvolvidos a partir de seqüências obtidas de *T. tauschii* podem ser usados nas análises genômicas do trigo

cultivado. Isso demonstra que essa técnica pode ser usada com sucesso na análise de germoplasmas de *T. tauschii* e *T. aestivum*.

O número máximo de bandas encontradas por acesso foi de 6,00 (Tabela 3), sendo que os primers que apresentaram maior polimorfismo foram WMC 245 (Figura 1), GDM 5, WMS 341, GDM 107, WMC 25, WMS 642. Por se tratarem de seqüências de alta taxa evolutiva, o conteúdo genético informativo de um marcador SSR é bastante alto. Mesmo em comparações de germoplasma com estreita base genética, como é o caso desse estudo, geralmente detecta-se um alto número de bandas por primer (BUSO et al., 2003).

Tabela 3 – Valor aproximado de pares de base obtidos por banda. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

Número de Bandas	Valor aproximado de pares de base (pb)
1	100 pb
2	200
3	170
4	150
5	100
6	50



As estimativas de similaridade genética, a partir do coeficiente de Jaccard, estão representadas na Tabela 4. Através da análise do dendrograma (Figura 2) pode-se perceber que os maiores valores de similaridade foram observadas entre

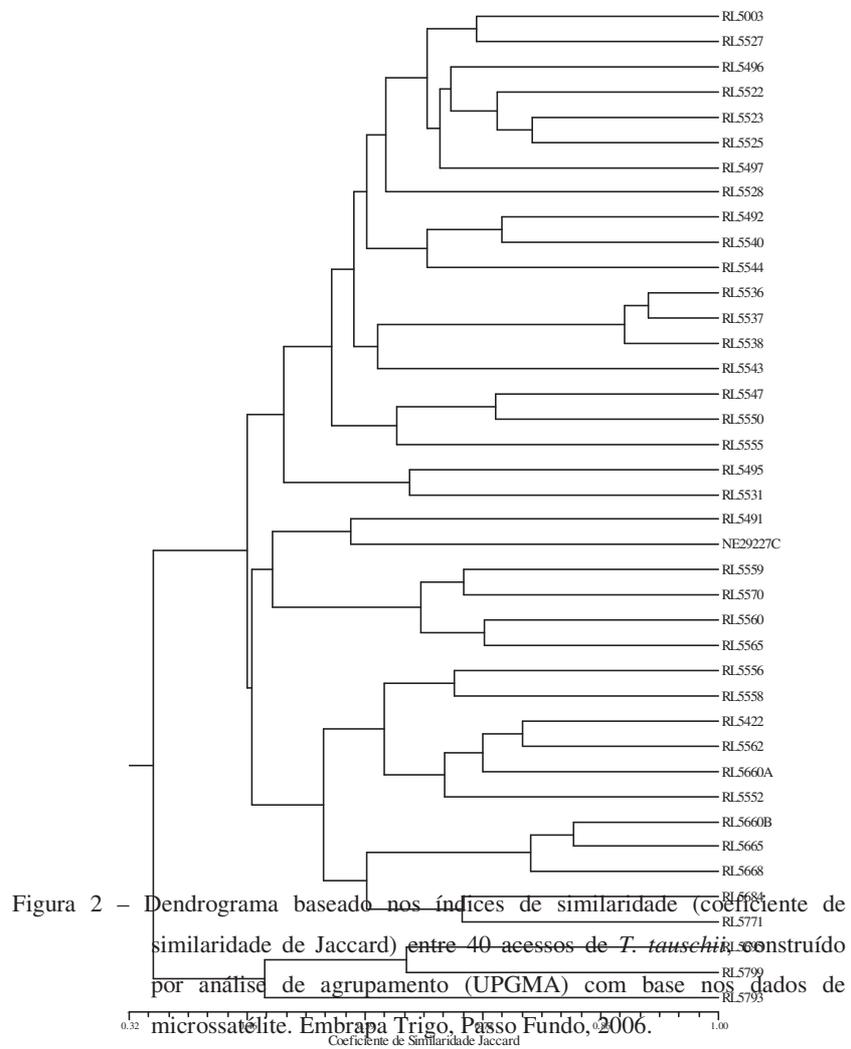
RL 5536 e RL 5537 (0,92), RL 5537 e RL 5538 (0,91) e entre RL 5536 e RL 5538 (0,87).

Os menores índices de similaridade foram encontrados entre RL 5547 e RL 5793 (0,17) seguidos de RL 5550 e RL 5799 (0,18) e RL 5497 e RL 5793 (0,21). O valor médio de similaridade obtido foi de 0,48; o que indica uma alta diversidade entre os acessos analisados. A alta diversidade encontrada entre os acessos pode ser também importante no incremento da variabilidade genética, tendo em vista que a mesma é essencial aos programas de melhoramento.

É importante enfatizar que não existe melhoramento sem a presença da variabilidade genética, e dessa forma ela deve ser conhecida e preservada. As coleções de germoplasma são extremamente úteis, revelando-se como fonte de variabilidade genética disponível aos melhoristas. Portanto, ressalta-se a importância da caracterização desse germoplasma como fonte de genes úteis.

Os acessos RL 5660A e RL 5660B ficaram em grupos diferentes, demonstrando a partir dessa análise que são distintos geneticamente, provavelmente tenham se modificado ao longo do tempo ou de acordo com o ambiente. Apresentaram um índice de similaridade de 0,71.

A correlação cofenética (Figura 3) obtida a partir dos dados da similaridade genética e dos valores estimados pelo UPGMA indicou um índice de correlação de 0,77 (valor R) o que demonstra mais uma vez, a alta diversidade genética existente entre o material avaliado.



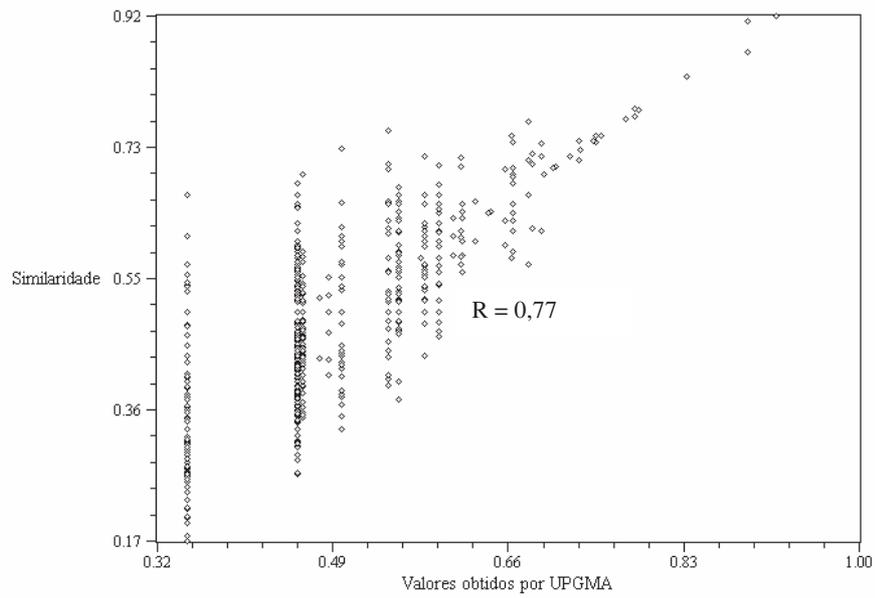


Figura 3 – Correlação cofenética obtida através dos dados gerados entre a similaridade genética e os valores estimados pelo UPGMA. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2006.

4 CONCLUSÕES

A alta diversidade genética revelada pelos marcadores microssatélites neste estudo possivelmente reflete uma alta variabilidade genética dentro do germoplasma de *Triticum tauschii*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no capítulo I p.30-44, indicam que os acessos que apresentaram resistência à *Puccinia triticina* em estágio de plântula, poderão ser utilizados como genitores para a criação de fontes de resistência e obtenção de incremento de resistência a esse patógeno. Estudos de postulação gênica

e análise genética após a transferência para o nível hexaplóide deverão ser realizados visando otimizar o potencial da utilização dessa estratégia no controle da moléstia.

Em relação aos dados apresentados no capítulo II p. 45-65, os mesmos, permitem sugerir que o material analisado é representativo da diversidade genética existente em *Triticum tauschii*. Além disso, as informações obtidas servem como subsídio na escolha dos acessos para realização de futuros cruzamentos em programas de melhoramento genético de trigo que buscam ampliar a variabilidade genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAEI-SARBARZEH, M.; SINGH, H.; DHALIWAL, H.S. A microsatellite marker linked to leaf rust resistance transferred from *Aegilops triuncialis* into hexaploid wheat. *Plant Breeding*, v. 120, p. 259-261, 2001.

AGUILAR-RINCÓN, V.H.; SINGH, P.R.; MOLINA-GALÁN, J.D.; HUERTA-ESPINO, J. Inheritance of resistance to leaf rust in four synthetic hexaploid wheats. *Agrociencia*, v. 34, p. 235-246, 2000.

ALFENAS, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574p.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242p.

ALVES DE SOUZA, C.N.; ROSA, O.S. Multiplicar o grão. *Ciência Hoje*, v. 3, p. 46-52, 1985.

ANGRA, D.C.; MARTINELLI, P.; PRESTES, A. M.; FERNANDES, M. I. B. Haplodiploidização de híbridos intergenéricos via gimnogênese. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 19, n. 3, p. 124, 1996.

ANIKSTER, Y.; BUSHNELL, W.R.; EILAM, T.; MANISTERSKI, J.; ROELFS, A.P. *Puccinia recondita* causing leaf rust on cultivated wheats, wild wheats, and rye. *Canadian Journal of Botany*, v. 75, p. 2082-2096, 1997.

ASSEFA, S.; FEHRMANN, H. Evaluation of *Aegilops tauschii* Coss. For resistance to wheat stem rust and inheritance of resistance genes in hexaploid wheat. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 51, p. 663-669, 2004.

AUNG, T.; KERBER, E. Incorporation of stem rust and leaf rust resistance from *Aegilops triuncialis* into common wheat. In: 9th INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 2., 1998, Saskatoon. *Proceedings...* University of Saskatchewan, 1998. p. 7-10.

AUTRIQUE, E.; SING, R.P.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat relatives. *Genome*, v. 38, p. 75-83, 1995.

BACALTCHUK, B. *Visão estratégica para a triticultura brasileira*. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1998.

BADAEVA, E.D.; FRIEBE, B.; ZOSHCHUK, S.A.; ZELENIN, A.V.; GILL, B.S. Genome differentiation in diploid and polyploidy *Aegilops* species. In: 9th INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 1., 1998, Saskatoon. *Proceedings...* University of Saskatchewan, 1998. p. 61-65.

BARBOSA, M.M.; PRESTES, A.M.; ANGRA, D.C. *Agropyron* como fonte de resistência à mancha bronzeada do trigo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 18, n. 2, p. 335, 1993.

BARCELLOS, A.L. Genética da resistência de planta adulta à ferrugem da folha na cultivar brasileira de trigo Toropi (*Triticum aestivum* L. em Thell). 1994. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

BARCELLOS, A.L.; MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; ROELFS, A.P. Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. *Summa Phytopathologica*, v. 23, n. 2, p. 101-117, 1997.

BARCELLOS, A. L. *Ferrugem da folha do trigo: resistência de planta adulta (RPA)*. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 2001a.

BARCELLOS, A.L. Resistência durável à ferrugem da folha do trigo. In: CUNHA, G.R. (Ed.). *Trigo no Brasil: história e tecnologia de produção*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001b. 208p.

BELL, G.D.H. The history of wheat cultivation. In: LUPTON, F.G.H. *Wheat Breeding*. London: Chapman and Hall, 1987. 19p.

BERED, F.; BARBOSA, J.F.B.; DA ROCHA, B.M.; PEGORARO, D.G.; VACARO, E.; DE CARVALHO, F.I.F. Caracterização de germoplasma de trigo por meio dos caracteres adaptativos ciclo e estatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 2, p. 145-150, 2002.

BOYKO, E.; KALENDAR, R.; KORZUN, V.; FELLERS, J.; KOROL, A.; SCHULMAN, A.H.; GILL, B.S. A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense-related genes: insights into cereal chromosome structure and function. *Plant Molecular Biology*, v. 48, n. 5, p. 767-790, 2004.

BRAMMER, S.P. *Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (Triticum aestivum L. em Thell)*. 2000. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BRAMMER, S.P.; MORAES-FERNANDES, M.I.B.; MILACH, S.C.K.; BARCELLOS, A.L. Estudos genéticos, mapeamento de genes e desenvolvimento de marcadores moleculares associados à ferrugem da folha em trigo. In: BRAMMER, S.P.; IORCZESKI, E.J. (Orgs.). *Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002a. p. 201-216.

BRAMMER, S.P.; SALAZAR, S.; MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; BARCELLOS, A.L. *Identificação de marcador isoesterásico associado ao gene Lr24 com resistência à ferrugem da folha em trigo*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002b. 12p. Circular Técnica Online; 13. Disponível: <<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p cil13.htm>>

BURK, L.G. An interespecific bridge-cross-*Nicotiana repanda* through *N. sylvestris* to *N. tabacum*. *Journal Heredity*, v. 58, p. 215-218, 1967.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZHON, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais – Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites em espécies vegetais tropicais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 30, p. 46-50, 2003.

CEREAL DISEASE LABORATORY. United States Department of Agriculture: Agriculture Research Service, 2006. Disponível em: <<http://www.cdl.umn.edu/>>. Acesso em: 17 fev. 2006.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L. Especialização fisiológica de *Puccinia triticina* no Brasil em 2002. *Fitopatologia Brasileira*, v. 1, n. 2, p. 57-62, 2006.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: março de 2006.

COUCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. *Benefits of biodiversity*. Ames, 1999. 33p.

COX, T.S.; RAUPP, W.J.; WILSON, D.L.; GILL, B.S.; LEATH, W.W.; BROWDER, L.E. Resistance to foliar disease in a collection of *Triticum tauschii* germoplasm. *Plant Disease*, v. 76, p.1061-1064, 1992.

COX, T.S.; SEARS, R.G.; BEQUETTE, R.K.; MARTIN, T.J. Germoplasm Enhancement in Winter Wheat x *Triticum tauschii* Backcross Populations. *Crop Science*, v. 35, p. 913-919, 1995.

DHALIWALL, H.S.; GILL, K.S.; SINGH, P.; MULTANI, D.S.; SINGH, B. Evaluation of germplasm of wild wheats, and *Aegilops*, *Agropyron*, for resistance to various diseases. *Crop Improvement*, v. 13, n. 2, p. 107-112, 1986.

EASTWOOD, R.F.; LAGUDAH, E.S.; APPELS, R.; HANNAH, M.; KOLLMORGEN, J.F. *Triticum tauschii*: a novel source of resistance to cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*). *Australian Journal Agriculture Research*, v. 42, p. 69-77, 1991.

FAHIMA, T.; RÖDER, M.S.; GRAMA, A.; NEVO, E. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 96, p. 187-195, 1998.

FEDERIZZI, L.C.; SCHEEREN, P.L.; NETO, J.F.B.; MILACH, S.C.K.; PACHECO, M.T. Melhoramento do Trigo. In: BORÉM, A. (Ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 52p.

FELDMAN, M. Historical aspects and significance of the Discovery of wild wheats. In: STADLER GENETICS SYMPOSIUM, 9, Columbia, 1977. p. 121-145.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1998.

GILL, B.S.; RAUPP, W.J.; SHARMA, H.C.; BROWDER, L.E.; HATCHETT, J.H.; HARVEY, T.L.; MOSEMAN, J.G.; WAINES, J.G. Resistance in *Aegilops squarrosa* to wheat leaf rust, wheat powdery mildew, greenbug, and Hessian fly. *Plant Disease*, v. 70, p. 553-556, 1986.

GILL, B.S.; RAUPP, W.J. Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. *Crop Science*, v. 27, p. 445-450, 1987.

GILL, B.S.; APPELS, R.; BOTHA-OBERHOLSTER, A.M.; BUELL, C.R.; BENNETZEN, J.L.; CHALHOUB, B.; CHUMLEY, F.; DVORAK, J.; IWANAGA, M.; KELLER, B.; LI, W.; McCOMBIE, R.W.; OGIHARA, Y.; QUETIER, F.; SASAKI, T. A workshop report on wheat genome sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. *Genetics*, v. 168, p. 1087-1096, 2004.

GÖÇMEN, B.; ESER, V.; KESKIN, S.; ERIEN, S. Protein and isozyme patterns of *Aegilops tauschii* populations. *Grain Quality*, v. 4, p. 160-162, 1998.

GOEL, R.K.; SAINI, R.G. Effectiveness of *Triticum tauschii* (*Aegilops squarrosa*) derived *Lr* genes in conferring resistance to Indian races of leaf rust (*Puccinia recondita tritici*) of wheat. *Wheat Information Service*, v. 93, p.19-21, 2001.

GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; EDWARDS, K.J.; ISAAC, I.; KORZUN, V.; RÖDER, M.S.; GAUTIER, M.F.; JOUDRIER, P.; SCHLATTER, A.R.; DUBCOVSKY, J.; DE LA PENA, R.C.; KHAIRALLAH, M.; PENNER, G.; HAYDEN, M.J.; SHARP, P.; KELLER, B.; WANG, R.C.C.; HARDOUIN, J.P.; JACK, P. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 105, p. 413-422, 2002.

HELGUERA, M.; KHAN, I. A.; DUBCOVSKY, J. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 101, p. 625-631, 2000.

HSAM, S.L.K.; KIEFFER, R.; ZELLER, F.J. Significance of *Aegilops tauschii*/*Triticum tauschii* glutenin genes on bread-making properties of wheat. *Cereal Chemistry*, v. 78, p. 521-525, 2001.

HUANG, L.; GILL, B.S. An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 103, p. 1007-1013, 2001.

HUSSIEN, T.; BOWDEN, R.L.; GILL, B.S.; COX, T.S.; MARSHALL, P.S. Performance of four new leaf rust resistance genes transferred to common wheat from *Aegilops tauschii* and *Triticum monococcum*. *Plant Disease*, v. 81, p. 582-586, 1997.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura Bull. *Society Vaudoise Scientific Nature*, v. 37, p. 547-579, 1901.

KAWAHARA, T.; TAKUMI, S.; MATSUOKA, Y.; MORI, N.; YASUI, Y. *Tauschii* core collection, a powerful tool for utilize wheat D genome genetic resources. In: TENTH INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 2., 2003, Paestum. *Proceedings...* Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, 2003. p. 584-587.

KNOTT, D.R. Transferring alien genes to wheat. In: HEYNE, E.G. (Ed.). *Wheat and wheat improvement*. 2. ed.. Madison: American Society of Agronomy, 1987. p. 462-471.

KNOTT, D. R. *The Wheat Rusts-Breeding for Resistance*. Berlin: Ed. Springer-Verlag, 1989.

KNOTT, D.R.; DVORAK, J. Allien germplasm as a source of resistance to disease. *Annual Review of Phytophatology*, v. 14, p. 211-235, 1976.

LAGOS, M. B. *História do Melhoramento do Trigo no Brasil*. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas Agronômicas, 1983.

LEÃO, F.S C; GIRAFFA, H.A.R; MOTTA, J.C.M. *O trigo no Rio Grande do Sul*. Passo Fundo: Embrapa –CNPT, 1972.

LING, H-Q; QIU, J.; SINGH, R.; KELLER, B. Identification and genetic characterization of an *Aegilops tauschii* ortholog of the wheat leaf rust disease resistance gene *Lr1*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 109, p.1133-1138, 2004.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a unicleotide repeat within the cardiac muscle action gene. *Annual Journal Human Genetics.*, v. 44, p. 398-401, 1989.

LONG, D.L.; KOLMER, J.A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, v. 79, p. 525-529, 1989.

MANIATIS, T.; FRITSCH, D.F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Press, 1982.

Mc. FADDEN, E.S.; SEARS, E.R. The artificial synthesis of *Triticum spelta*. *Resource Genetic Society American*, v. 13, p. 26-27, 1946.

McINTOSH, R.A.; FRIEBE, B.; JIANG, J.; THE, D.; GILL, B.S. Cytogenetical studies in wheat XVI. Chromosome location of a new gene for resistance to leaf rust in a Japanese wheat Rye translocation line. *Euphytica*, v. 82, p.141-147,1995a.

McINTOSH, R.A.; WELLINGS, R.F. *Wheat Rust: an atlas of resistance genes*. Australia: University of Sydney, 1995b.

McINTOSH, R.A.; YAMAZAKI, Y.; DEVOS, K.M.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, J.; APPELS, R. *Macgene Catalogue of gene symbols for wheat*. Italy: System environments, 2003. 1 CD-ROM.

McKENDRY, A.L.; HENKE, G.E. Evaluation of wheat wild relatives for resistance to *Septoria tritici* Blotch. *Crop Science*, v. 34, p. 1080-1084, 1994.

McKEY, J. The boundaries and subdivision of the genus *Triticum*. In: 12 SYMPOSIUM INTERNATIONAL OF BOTANY, *Proceedings...* 1975, Leningrado. 1975, 23p.

MILACH, S.C.K.; CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. *Ciência Rural*, n. 4, v. 27, p. 685-689, 1997.

MILACH, S.C.K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998a.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998b. p. 17-28.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R.; SASAKI, T. Genome mapping molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, v. 3, p. 87-103, 1997.

MOHR, H.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; MORAES-FERNANDES, M.I.B. Análise do pareamento meiótico em híbridos entre *Triticum aestivum* x *Aegilops squarrosa*. In: XV RENAPET, Resumos... Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1988.

MOHR, H. Híbridos interespecíficos entre *Triticum aestivum* L. e *Aegilops squarrosa* L.; comportamento meiótico, fertilidade e teste de resistência à oídio (*Erysiphe graminis* Dc f. sp. *tritici* E. MARCHAL).

1991. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

MOLINA, S.C. Marcadores genéticos e o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. de O.F. (Org). *Genética para que te quero?* Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. p. 127-132.

MORAES-FERNANDES, M.I.B.; FERNANDES, J.M.C.; PICININI, E.C.; AITA, L.; SARTORI, J.F. Transferência de genes de resistência a *Septoria nodorum* (Berk.) de espécies afins para o trigo. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE TRIGO, 11, 1980, Porto Alegre. *Resumos e comunicados técnicos: Embrapa-CNPT, 1980. p. 130-140.*

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.9, n. 10, p. 881-896, 1987.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. O uso de espécies afins ao trigo para obtenção de novas fontes de resistência a moléstias fúngicas no Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Embrapa. In: SEMINÁRIO SOBRE MELHORAMENTO DE TRIGO PARA RESISTÊNCIA A ENFERMIDADES, 1., 1988, Passo Fundo. *Resumos...* Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1988.

MORAES-FERNANDES, M.I.B.; ANTONIOLLI, S.R.; BARCELLOS, A.L.; LINHARES, W.I. Obtenção de linhagens hexaplóides sintéticas através de cruzamentos interespecíficos entre *Triticum durum* Desf. e *Aegilops squarrosa* L., resistentes a moléstias fúngicas. In: XV RENAPET, Resumos... Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1988.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. & LINHARES, W.I. Expressão da resistência a oídio originadas de *Aegilops squarrosa* L. obtida através de cruzamentos diretos com o trigo (cv. CNT 10). In: XV RENAPET, Resumos... Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1988.

MORAES-FERNANDES, M.I.B.; ANTONIOLLI, S.R.; BARCELLOS, A.L.; COELHO, E.T.; LINHARES, W.I. Transferência de genes de resistência a moléstias fúngicas (ferrugens e oídio), de espécies afins para o trigo cultivado "*Triticum aestivum* L. Thell" através do cultivo de embriões híbridos. *Ciência e Cultura*, Porto Alegre, v. 42, n. 7, p. 474-480, 1990.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. *Genética e novas biotecnologias no melhoramento de trigo*. Documento on line nº 4. Publicações Embrapa Trigo, 2000.

MORAES-FERNANDES, M.I.B.; ZANATTA, A.C.A.; PRESTES, A.M.; CAETANO, V.R.; BARCELLOS, A.L.; ANGRA, D.C.; PANDOLFI, V. Cytogenetics and immature culture embryo at

Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n.4, p. 1051-1062, 2000.

MORRIS, R.; SEARS, E.R. The cytogenetics of wheat and its relatives. In: QUISENBERRY, K.S. & REITZ, L.P. (Ed.). *Wheat and wheat improvement*. American Society of Agronomy, 1967, p. 19-87.

MUJEEB-KAZI, A.; KIMBER, G. The production, cytology and practicality of wide hybrids in the *Triticeae*. *Cereal Research*, v. 13, n. 2, p. 111-124, 1985.

MUJEEB-KAZI, A. Interspecific crosses: Hybrid production and utilization. In: MUJEEB-KAZI, A.; HETTEL, G.P. (eds). *Utilizing Wild Grass Biodiversity in Wheat Improvement: 15 Years of Wide Cross Research at CIMMYT Research*. México: CIMMYT Research Report No. 2., 1995. p. 14-21.

MURPHY, J.P.; GRIFFEY, C.A.; FINNEY, P.L.; LEATH, S. Agronomic and grain quality evaluations of *Triticum aestivum* x *Aegilops tauschii* backcross populations. *Crop Science*, v. 37, n. 6, p. 1960-1966, 1997.

NEVO, E.; KOROL, A.B.; BEILES, A.; FAHIMA, T. Evolution of wild emmer wheat and wheat improvement. In: TENTH INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 1., 2003, Paestum. *Proceedings: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura*, 2003. p. 29-33.

PESTSOVA, E.; GANAL, M.W.; RÖDER, M.S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome*, v. 43, p. 689-697, 2000.

PETERSON, R.F. *Wheat botany, cultivation and utilization*. New York: Interscience, 1965, 422p.

PRESTES, A.M. & GOULART, L.R. Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 3, p.315-363, 1995.

PROCUNIER, J.D.; TOWNLEY-SMITH, T.F.; FOX, S.; PRASHAR, S.; GRAY, M.; KIM, W.K.; CZARNECKI, E.; DYCH, P.L. PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *Lr 25* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetics and Breeding*, v. 49, p. 87-92, 1995.

RAUPP, W.J.; SUKHWINDER, S.; BROWN, G.L.; GILL, B.S. Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 102, p. 347-352, 2001.

RILEY, R.; CHAPMAN, V. The D genome of hexaploid wheat. *Wheat Information Service*, v. 11, p. 18-19, 1960.

RÖDER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M-H.; PHILIPPE, L.; GANAL, M.W. A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics*, v. 149, p. 2007-2023, 1998.

ROELFS, A. P.; SINGH, R. P.; SAARI, E. E. *Las royas de trigo: conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades*. México: CIMMYT, 1992.

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

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS*, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SALINA, E.; BÖRNER, A.; LEONOVA, I.; KORZUN, V.; LAIKOVA, L.; MAYSTRENKO, O.; RÖDER, M.S. Comparative microsatellite mapping of the induced sphaerococcoid mutation genes in *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 100, p. 686-689, 2000.

SCHACHTMAN, D.P.; MUNNS, R.; WHITECROSS, M.I. Variation in sodium and salt tolerance in *Triticum tauschii*. *Crop Science*, v. 31, p. 992-997, 1991.

SCHEEREN, P.L. *Informações sobre o trigo Triticum spp*. Passo Fundo: Embrapa – CNPT, 1986.

SINGH, R.P.; MUJEEB-KAZI, A.; HUERTA-ESPINO, J. *Lr46*: A gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology*, v. 88, p.890-894, 1998.

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Sci. Bull.*, v. 38, p. 1409-1438, 1958.

SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; SPECHT, J.E, CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 109, p. 122-128, 2004.

SONG, Q.J.; SHI, J.R.; SINGH, S.; FICKUS, E.W.; COSTA, J.M.; LEWIS, J.; GILL, B.S.; WARD, R.; CREGAN, P.B. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 110, n.3, p. 1432-2242, 2005.

STEPIÉN, L.; GOLKA, L.; CHELKOWSKI, J. Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources. *Journal Applied Genetics*, v. 44, n.2, p. 139-149, 2003.

SUN, Q.; WEI, Y.; NI, Z.; XIE, C.; YANG, T. Microsatellite marker for yellow rust resistance gene Yr5 in wheat introgressed from spelt wheat. *Plant Breeding*, v. 121, p. 539-541, 2002.

TURRA, C. Uso de marcadores moleculares no mapeamento e incorporação de genes de resistência durável à ferrugem da folha do trigo (*Triticum aestivum* L.) 2004. *Monografia* (Especialização em Genética e Evolução Biológica) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Evolução Biológica, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

VALOIS, A.C.C.; SALOMÃO, A.N.; ALLEN, A.C. (Org). *Glossário de Recursos Genéticos Vegetais*. Brasília: Embrapa-SPI, 1996. 56p.

WALKER, M.R.; RAPPLEY, R. *Guia de rotas na tecnologia do gene*. São Paulo: Atheneu, 1999.

WILLIAM, M.D.H.; PEÑA, R.J.; MUJEEB-KAZI, A. Seed protein and isozyme variations in *Triticum tauschii* (*Aegilops squarrosa*). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 87, p. 257-263, 1993.

YAN, Y.M.; HSAM, S.L.K.; YU, J.Z.; JIANG, Y.; ZELLER, F.J. Genetic polymorphisms at *Gli-D¹* gliadin loci in *Aegilops tauschii* as revealed by acid polyacrylamide gel and capillary electrophoresis. *Plant Breeding*, v. 122, p. 120-124, 2003.

ZAHARIEVA, M.; MONNEVEUX, P.; HENRY, M.; RIOVAL, R.; VALKOUN, J. Evaluation of a collection of wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth and identification of potential sources for useful traits. *Euphytica*, v. 119, p. 33-38, 2001.

ZOHARY, D.; HARLAN, J.R., VARDI, A. The wild diploid progenitors of wheat and their breeding value. *Euphytica*, v. 18, p. 58-65, 1969.

ZOLDAN, S. M. *Identificação de genes de resistência à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (Triticum aestivum L.)*. 1998. Dissertação (Mestrado) -Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 1998.