

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Agrícola



Dissertação

Transferabilidade de microssatélites de arroz para
trigo na busca por marcadores ligados à resistência à
fusariose

Alexandre Zanardo de Carvalho

Pelotas, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALEXANDRE ZANARDO DE CARVALHO

**TRANSFERABILIDADE DE MICROSSATÉLITES DE ARROZ PARA TRIGO NA
BUSCA POR MARCADORES LIGADOS À RESISTÊNCIA À FUSARIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia Vegetal).

Orientador: Dr. José Antonio Peters

Co-Orientador: Dr. Valmor João Bianchi

Pelotas, 2007

Banca examinadora:

Dr. José Antonio Peters

Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Dr. Ariano Martins de Magalhães Jr.

Dra. Fabiana Roos Nora

Aos meus pais, Antônio e Vera e aos
meus irmãos, Gustavo e Juliana, pelo
incentivo e amor,

DEDICO.

Agradecimentos

À Deus e aos meus familiares por estarem sempre ao meu lado.

Aos Professores Dr. José Antonio Peters, e Dr. Valmor João Bianchi, pela orientação e co-orientação, confiança, dedicação e amizade.

Ao Pesquisador Dr. Sandro Bonow, pelo suporte, apoio e grande contribuição na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Agrícola, que viabilizaram a realização deste mestrado.

A CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de estudos.

À Embrapa pela concessão das sementes utilizadas neste trabalho.

Aos colegas, estagiários e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pelo auxílio e apoio na realização deste trabalho e pela convivência.

Ao amigo Luciano da Silva Pinto, doutorando do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Agrícola, pelas atividades de seqüenciamento de DNA e análise.

A todos os professores, pelos ensinamentos e experiências transmitidas ao longo deste período e que contribuíram para meu desenvolvimento profissional.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho mas não foram aqui mencionadas.

Resumo

CARVALHO, Alexandre Zanardo de. **Transferabilidade de microssatélites de arroz para trigo na busca por marcadores ligados à resistência à fusariose.** 2007. 52f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A fusariose do trigo, causada principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum*, é uma das principais doenças nessa cultura, ocasionando perda de produtividade e de qualidade de grãos, além dos efeitos nocivos à saúde do homem e de animais devido ao acúmulo de micotoxinas nos grãos infectados. A resistência genética é a melhor forma para o controle dessa patologia que atinge a cultura em várias regiões do mundo. Ela exhibe herança quantitativa, ou seja, são QTLs que tem um pequeno efeito sobre o caráter. Estudos com marcadores de microssatélites têm gerado um grande número de informações a respeito da posição desses QTLs no genoma e no desenvolvimento de novas variedades para cultivo em programas de melhoramento. Os microssatélites são pequenas seqüências de bases repetidas, posicionadas adjacente e distribuídas amplamente no genoma dos organismos. Para sua amplificação são utilizados *primers* específicos para cada loco. As relações genéticas entre espécies permitem que informações geradas a partir do estudo de uma delas sejam utilizadas para o estudo de espécies relacionadas. Dessa forma, *primers* desenhados para locos de microssatélites em uma espécie podem ser utilizados para detectar marcadores em espécies afins e serem associados a características de interesse. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a transferabilidade de locos de microssatélites de arroz para genótipos de trigo com diferentes níveis de resistência à fusariose e verificar a existência de polimorfismo entre os genótipos contrastantes que pudessem ser associados à característica de resistência. Foram testados 55 pares de *primers* de locos de microssatélites, isolados do genoma do arroz, em 13 cultivares de trigo, classificadas como suscetíveis, moderadamente suscetíveis, moderadamente resistentes e resistentes. Houve a transferabilidade de 76,4% desses locos de microssatélites. Destes, 23,8% apresentaram polimorfismo e o restante, 76,2%, apresentaram-se monomórficos. A análise do polimorfismo não permitiu a identificação de marcadores que pudessem ser associados à resistência para fusariose do trigo.

Palavras-chave: Marcadores moleculares. Melhoramento genético. SSR.

Abstract

CARVALHO, Alexandre Zanardo de. **Transferability of microsatellite from rice to wheat in search of markers related to *Fusarium* head blight resistance**. 2007. 52f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Fusarium head blight (FHB) is one of the most important diseases known to affect wheat crop. FHB, caused mainly by *Fusarium graminearum*, results in severe losses of productivity and grain quality besides its harmful effects to human and animal health due to the accumulation of mycotoxins in infected grains. Genetic resistance is the best way to control FHB which affects crops in several parts of the world. FHB resistance shows a quantitative heritage, hence are QTLs (quantitative-trait-loci) that have a weak effect on character. Studies with microsatellite markers have generated a great number of information related to the position of those QTLs in the genome, in addition to the development of new varieties to be used in breeding programs. The microsatellites are short sequence repeats, spread thoroughly in the organism's genome. For amplification of those sequences it is used specific primers to each loco. Due to the genetic relation between species, information generated from the study in one species can be used successfully when studying related species. Therefore, primers designed for microsatellites in one species can be used to detect markers in related species and to associating those markers with characteristics of interest. Here, the main objective of my work was to verify the transferability of microsatellites from rice to wheat in search of markers related to FHB resistance. It was tested different wheat genotypes showing different levels of resistance to *Fusarium* and was verified the existence of polymorphism among those genotypes. A number of 55 primer pairs of microsatellites isolated from the rice genome were tested in 13 wheat cultivars classified as susceptible, moderately susceptible, moderately resistant and resistant. In my results, the rate of microsatellite transferability was of 76.4%, where from these, 23.8% showed polymorphism and 76.2% showed monomorphism. In spite of the high rate of the microsatellite transferability observed in my results, the analysis of polymorphism did not allow the identification of markers that could be possibly associated with resistance to *Fusarium head blight* in wheat.

Keywords: Molecular markers. Genetic improvement. SSR.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Sintenia entre genomas de arroz, milho, cevada e trigo.....	23
Figura 2 - Padrões de amplificação obtidos com os <i>primers</i> para locos de microssatélites OS49, OS52, OS46, OS48, OS35, OS23, OS5 e OS3 em 10 cultivares de trigo com diferentes níveis de resistência à fusariose.....	32
Figura 3 - Padrões de polimorfismos gerados pelos marcadores de locos microssatélites OS40, OS29, OS1, OS7, OS16 e OS22 em 10 cultivares de trigo com diferentes níveis de resistência à fusariose.....	35
Figura 4 - Padrões de amplificação obtidos com os <i>primers</i> para locos de microssatélites OS35, OS23 e OS49 aplicados aos bulks de DNA das cultivares de trigo.....	36

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Relação das cultivares de trigo utilizadas na pesquisa e suas classificações quanto ao nível de resistência à fusariose.....	25
Tabela 2 -	Descrição das seqüências dos <i>primers</i> para locos de microsatélites utilizados na pesquisa e tamanho aproximado dos alelos amplificados em arroz.....	26
Tabela 3 -	Marcadores de locos de microsatélites genômicos de arroz testados nas cultivares de trigo incluídas na pesquisa.....	28
Tabela 4 -	Descrição dos locos de microsatélites de arroz, usados para análise em trigo, quanto ao tamanho de fragmentos amplificados (pb) e comportamento em relação ao polimorfismo.....	31
Tabela 5 -	Seqüência parcial de nucleotídeos, tamanho dos alelos e das moléculas seqüenciadas (pb).....	38
Tabela 6 -	Acessos de ESTs do gênero <i>Triticum</i> com alinhamento significativo à seqüência relativa ao loco de microsatélite OS35.....	39
Tabela 7 -	Acessos de ESTs com alinhamento significativo à seqüência relativa ao loco de microsatélite OS 46, proteínas similares após tradução e suas respectivas funções biológicas.....	40
Tabela 8 -	Acessos de ESTs com alinhamento significativo à seqüência relativa ao loco de microsatélite OS 49, proteínas similares e suas respectivas funções biológicas.....	41

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Lista de ilustrações.....	7
Lista de tabelas.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 A cultura do trigo.....	12
2.2 Trigo no Brasil: importância social e econômica.....	13
2.3 Melhoramento genético do trigo.....	14
2.4 Origem e evolução do trigo.....	16
2.5 A fusariose e a resistência à fusariose em trigo.....	17
2.6 Marcadores moleculares.....	19
2.7 Bioinformática e a transferabilidade de SSRs.....	22
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	25
3.1 Material biológico.....	25
3.2 <i>Primers</i> para análise de locos de microssatélites.....	26
3.3 Extração de DNA.....	28
3.4 Amplificação do DNA.....	29
3.5 Eletroforese dos fragmentos amplificados.....	29
3.6 Avaliação dos polimorfismos de DNA.....	30
3.7 Seqüenciamento de fragmentos de DNA produzidos por PCR.....	30
3.8 Análise <i>in silico</i> das seqüências de nucleotídeos.....	30
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Amplificação heteróloga de marcadores moleculares.....	31
4.2 Associação de marcadores com a resistência à fusariose.....	34
4.3 Seqüenciamento e análise.....	37
5 CONCLUSÕES.....	43
6.REFERÊNCIAS.....	44

1 Introdução

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma planta pertencente à família Poaceae e está entre os cereais mais cultivados em todo o mundo. Caracteriza-se por ter ciclo anual, é cultivado durante o inverno e a primavera e é uma das mais abundantes fontes de carboidratos e proteínas, sendo a sua produção destinada à fabricação de pães, massas alimentícias, bolos e biscoitos, entre outros produtos (PATNAIK; KHURANA, 2001).

Em nível mundial, o trigo é a segunda cultura de grãos em produção, e um dos principais alimentos da humanidade. No Brasil, a produção ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste e oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas ano, enquanto o consumo tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas. A maior concentração da produção está na região Sul devido a fatores de ordem natural, como o clima e o solo, bem como de ordem econômica, já que o trigo é uma cultura de inverno e se constitui como forma de exploração da terra durante este período (ROCHA et al., 2004).

A produção de trigo enfrenta dificuldades devido a fatores como danos causados por estresses bióticos, como as doenças causadas por fungos. A giberela ou fusariose da espiga, causada por *Fusarium graminearum*, é uma das mais importantes doenças na cultura do trigo no mundo, prejudicando a produtividade e a qualidade de grãos (PARRY et al., 1995; MCMULLEN et al., 1997). No Brasil, a maior frequência da doença ocorre na região Sul, causando consideráveis impactos econômicos (LUZ, 2003; PANISSON et al., 2003).

A resistência é herdada como uma característica quantitativa governada por muitos QTLs (Quantitative Trait Loci), individualmente responsáveis por uma parte relativamente pequena na variação fenotípica, ou seja, controlada por vários genes que têm um pequeno efeito sobre o caráter. O mapeamento de QTLs envolvidos na resistência à fusariose tem sido realizado através da utilização de marcadores moleculares. A identificação de locos intimamente ligados a esses QTLs é importante, pois pode facilitar a seleção desse complexo caráter em programas de melhoramento.

Com base nas pesquisas com marcadores moleculares associados a resistência à fusariose, nos últimos anos houve um grande avanço no conhecimento da genética e da herdabilidade da resistência à essa doença em trigo. Porém, nos

estudos que buscam por fontes de resistência e o desenvolvimento de novas cultivares, devem ser preconizados o uso de marcadores moleculares ligados à característica de interesse, a fim de aumentar a eficiência na seleção de genótipos.

Os microssatélites têm assumido um papel importante em análises genéticas no estudo de um grande número de espécies de plantas. Eles são considerados os marcadores mais polimórficos e, devido a sua característica de codominância, abundância e distribuição uniforme ao longo do genoma são os mais apropriados para estudos genéticos.

Recentemente, a ênfase na área dos marcadores moleculares tem sido no uso de microssatélites posicionados em ESTs (Expressed Sequence Tag – Etiquetas de Seqüências Expressas). Eles oferecem vantagens sobre os marcadores genômicos, entre elas, a associação com genes de interesse, bem como, após isolados em uma espécie, poderem ser utilizados com sucesso em espécies relacionadas.

Uma vez desenvolvidos, os marcadores de microssatélites podem ser utilizados para uma variedade de fins em diferentes espécies. Nesse sentido, a transferabilidade de marcadores de locos de microssatélites entre espécies relacionadas, e a possível associação dos mesmos com caracteres de interesse, é uma alternativa interessante em programas de melhoramento, para acompanhar a introgressão de caracteres desejados.

Levando em consideração a importância da cultura do trigo no Brasil, principalmente na região Sul, onde a maior parte deste cereal é cultivado e onde o clima pode favorecer o desenvolvimento da fusariose, são importantes as pesquisas voltadas à identificação de marcadores moleculares que possam ser úteis no desenvolvimento de cultivares com resistência a essa doença.

Em vista disso, o objetivo desse estudo foi testar a estratégia da transferabilidade de *primers* de locos de microssatélites, construídos com base em regiões expressas do genoma do arroz, para cultivares de trigo, visando obter marcadores moleculares que identificassem genótipos com resistência, à giberela, gerando informações que possam ser úteis ao melhoramento desta espécie.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 A cultura do trigo

O trigo é originário do continente Asiático, mais precisamente do Oriente Médio (MUNDSTOCK, 1983). É uma planta que pertence ao gênero *Triticum* e possui um número elevado de espécies. As variedades cultivadas no Rio Grande do Sul pertencem à espécie *Triticum aestivum* que é a mais cultivada em todo o mundo. Outra espécie cultivada é o *Triticum durum*, plantado na América do Norte, Europa, Norte da África, Rússia, Índia e alguns países do Oriente Médio. As demais espécies têm pequena expressão em termos de área de cultivo, mas são extremamente importantes como fonte de material genético em programas de melhoramento (ARENDDT, 2006)

O trigo está classificado como membro da família *Poaceae*, tribo *Triticeae*, subfilo *Triticinae*, gênero *Triticum* e espécie *Triticum aestivum* (SCHEEREN, 1986). O uso industrial do trigo é muito amplo, mas se destaca na obtenção de farinha por ser o grão preferido no preparo de pães, em função da excelente qualidade de panificação que sua farinha oferece e por produzir uma farinha branca com qualidades físico-químicas únicas para esse processo (ARENDDT, 2006)

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 elasticidade, a qual permite sua fermentação e confere uma estrutura leve e estável. Sua importância está relacionada ao desenvolvimento da civilização e da agricultura moderna, sendo considerado um alimento sagrado para muitos povos (ALMEIDA, 2006)

Em termos mundiais o trigo é a segunda cultura de grãos em produção, sendo ultrapassada apenas pelo milho, sendo um dos principais alimentos da humanidade. A área mundial plantada em 2004/2005 foi de 209,9 milhões de hectares, com produção de 622,2 milhões de toneladas de grãos e consumo de 607,8 milhões de toneladas segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (ARENDDT, 2006).

2.2 Trigo no Brasil: importância social e econômica

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).

Ao longo dos 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.

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 (2007), a área de cultivo, no Brasil, na safra 2005/06, foi de aproximadamente 2,4 milhões de ha, com produtividade média de 2063 kg ha⁻¹ e uma produção total em torno de 4,9 milhões de toneladas. Para a safra 2007/08 está prevista a produção de 3,8 milhões de toneladas numa área de 1,8 milhões de ha, atingindo a produtividade média de 2100 kg ha⁻¹. 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.

A produção do trigo no Brasil se concentra mais na Região Sul, principalmente nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, pois é a mais apta para o desenvolvimento desta cultura, tendo condições de solo e clima para cultivar aproximadamente cerca de 10 milhões de hectares, bem como de ordem

econômica, já que o trigo é uma cultura de inverno e se constitui numa forma de exploração da terra por parte do agricultor durante este período (REUNIÃO..., 2003).

A produção de trigo no Rio Grande do Sul e em outros estados enfrenta sérias dificuldades devido a danos causados por estresses bióticos e abióticos. Dentre os estresses bióticos, estão as doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, sendo que as doenças fúngicas representam danos de magnitude econômica, chegando, em alguns casos, a frustrar totalmente a produção de grãos. A giberela é a doença que causa maiores danos no trigo e vem aumentando a sua frequência em muitas regiões onde este cereal é cultivado (MCMULLEN et al., 1997).

A incidência desta e de outras doenças requer a adoção de controle, principalmente com o uso de fungicidas, aumentando os custos de produção e o impacto ambiental. Por outro lado, o uso de genótipos com resistência genética às principais doenças representa uma estratégia mais econômica e ambientalmente mais correta.

2.3 Melhoramento genético do trigo

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. Embora as técnicas de manejo das culturas tenham evoluído significativamente, possibilitando grandes avanços produtivos, de acordo com Alves de Souza e Rosa (1985), é provável que o aumento da produtividade das principais espécies agrônomicas nos últimos cinquenta anos foi decorrente do melhoramento genético.

As atividades relacionadas ao melhoramento genético de trigo no Brasil iniciaram com a implantação de estações experimentais do Ministério da Agricultura no estado do Paraná e no Rio Grande do Sul. Essas atividades consolidaram-se em 1974 com a criação do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT), da Embrapa. Os trabalhos iniciais do CNPT envolveram a coleta de amostras utilizadas no país, a seleção de linhagens, 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. Na década de 80, a hibridização 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). A cultivar BRS CANELA foi desenvolvida na Embrapa Trigo, sendo a primeira cultivar de trigo criada e desenvolvida, no Brasil, pelo método de haplodiploidização, via cruzamento intergenérico "trigo x milho" (Reunião... 2004). Da mesma forma, a aplicação de marcadores moleculares de DNA, vem auxiliando no processo de melhoramento genético da cultura (MILACH, 1998a).

A exploração de espécies afins às plantas cultivadas é uma forma eficiente para introduzir genes adicionais em variedades cultivadas. Espécies afins são aquelas que formam 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 progresso no conhecimento sobre as relações citotaxonômicas dentro do gênero *Triticum* e da tribo *Triticeae* é que tornou possível o desenvolvimento de metodologias eficientes de transferência de características, as quais permitiram a obtenção de novas fontes de resistência geneticamente distintas (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 de genes. Este sistema envolve o modo de reprodução e o sistema meiótico. Dependendo da constituição cromossômica e das afinidades entre os genomas das

espécies envolvidas, estratégias distintas podem ser utilizadas para a transferência de características de interesse (MORAES-FERNANDES, 1988).

2.4 Origem e evolução do trigo

Triticum aestivum é uma planta anual, hermafrodita, autógama, e uma das culturas de maior expansão mundial, possuindo milhares de cultivares disponíveis em todo mundo. A domesticação ocorreu nas lavouras primitivas do Sudeste da Ásia de 7000 a 9000 a.C. e foi introduzido na Índia, na China e na Europa desde cinco mil anos a.C. (BRAMMER, 2000). O trigo pertence à família *Poaceae* e se originou do cruzamento de outras plantas silvestres que existiam nas proximidades dos rios Tigre e Eufrates e foi uma das primeiras espécies a ser cultivadas (MORAES-FERNANDES et al., 2000).

As espécies do gênero *Triticum*, com número cromossômico básico de sete, apresentam diferentes níveis de ploidia, incluindo espécies diplóides ($2n=14$, genoma AA), tetraplóides ($2n=28$, genomas AABB) e hexaplóides ($2n=42$, genomas AABBDD). Atualmente as espécies cultivadas comercialmente em grande escala são do tipo trigo duro, tetraplóide, *Triticum turgidum* L. e de trigo comum, hexaplóide, *Triticum aestivum* L. Esse último é composto por três genomas distintos AA, BB e DD ($2n=6x=42$). Esta poliploidia natural confere ao trigo certas características que facilitam a incorporação de genes de espécies afins (JAUHAR, 1993).

Embora o trigo seja uma das culturas poliplóides mais estudadas, sua provável história evolutiva foi recentemente estabelecida através do estudo das várias espécies selvagens relacionadas. Estudos de meiose e do comportamento de cromossomos, em híbridos interespecíficos, durante o pareamento revelaram as linhagens evolucionárias das espécies poliplóides de trigo (MCLAUCHLAN et al., 2001).

O conjunto cromossômico "A" teve origem a partir de *T. urartu* (DVORAK, 1993), o "D" de *T. tauschii* (MORRIS; SEARS, 1967). Tem havido dúvidas quanto à espécie diplóide que contribuiu com o genoma "B" das espécies tetraplóides e hexaplóides, sendo que atualmente evidências moleculares confirmam ser *Aegilops speltoides* o mais provável doador (BADAEVA et al., 1998). O *T. aestivum* é originário da hibridação entre o tetraplóide *T. turgidum* com o diplóide *T. tauschii* (NEVO et al., 2003). Sua ampla adaptação é atribuída, em parte, à espécie doadora do genoma "D", *T. tauschii*. (MURPHY et al., 1997).

2.5 A fusariose e a resistência à fusariose em trigo

A giberela ou fusariose da espiga está, na atualidade, entre uma das mais importantes doenças na cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) no mundo. Frequentes epidemias têm sido relatadas nos últimos tempos em diversas regiões, promovendo danos na produtividade e na qualidade de grãos (PARRY et al., 1995; MCMULLEN et al., 1997). No Brasil, o patossistema tem sido estudado há cerca de três décadas indicando que a doença, a qual se apresentava na forma de epidemias leves e esporádicas, transformou-se na principal doença nas regiões tritícolas, com maior frequência no Sul do Brasil, causando consideráveis impactos econômicos (LUZ, 2003; PANISSON et al., 2003).

No Brasil, e também no mundo, o principal patógeno associado à giberela do trigo é o fungo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch (anamorfo = *Fusarium graminearum* Schwabe), embora outras espécies sejam importantes em algumas regiões, como *Fusarium culmorum* e *Gibberella avenacea* (BOTTALICO; PERRONE, 2002).

A qualidade do produto é afetada, principalmente, com o acúmulo de micotoxinas nos grãos infectados com *Fusarium* spp., as quais podem apresentar efeitos tóxicos aos seres humanos e animais (BOTTALICO; PERRONE, 2002). Visando diminuir os riscos à população, países da América do Norte e Europa determinaram níveis máximos permitidos para desoxinivalenol, principal micotoxina produzida por *Fusarium* spp., em grãos de trigo para diferentes destinos (D'MELLO, 1999). Além dos fatores climáticos, como a maior frequência de chuvas coincidindo com o florescimento da cultura, suspeita-se que a prática de manutenção dos resíduos culturais, pela adoção do plantio direto, tenha contribuído para o aumento de inóculo e a sobrevivência do patógeno entre as estações de cultivo, exercendo, dessa forma, uma maior pressão de inóculo (DILL-MACKY; JONES, 2000; SCHAAFSMA et al., 2001).

Embora tenham sido conduzidos estudos extensivos acerca da influência de condições ambientais, genéticas e culturais no desenvolvimento da doença, a complexidade do patossistema ainda exige maior investigação, a ponto de se obter um melhor manejo da doença. Medidas de controle, como o uso de fungicidas, têm sido preconizadas, entretanto, a dificuldade reside em se conhecer a necessidade e o momento ideal de aplicação e na tecnologia empregada, para se obter bons

resultados (MESTERHAZY; BARTOK, 1996; PICININI; FERNANDES, 2001). Além deste fato, existem poucas fontes de resistência genética e a incorporação de tais genes em materiais de qualidade tecnológica é uma tarefa difícil e de longo prazo (WILCOXSON et al., 1992; MESTERHAZY, 1997; LIMA et al., 2000).

A literatura sobre giberela é vasta e diversos avanços têm sido obtidos nos últimos anos devido à atenção que esta doença tem despertado. São encontradas diversas revisões, e entre elas as com enfoque na resistência genética (MESTERHAZY, 1995).

Mecanismos de resistência para *Fusarium* em trigo são classificados em morfológicos ou fisiológicos (RUDD et al., 2001). As características morfológicas incluem caracteres como a altura e a largura de abertura da flor durante a antese. A resistência fisiológica envolve, presumivelmente, uma trajetória bioquímica envolvendo a produção de compostos que inibem o patógeno após a infecção. Em relação aos tipos de resistência do trigo à giberela, mencionam-se cinco tipos. A resistência Tipo I é definida como resistência à infecção inicial; Tipo II, resistência à colonização, subsequente ao tecido após a infecção; Tipo III, resistência expressa no próprio grão; Tipo IV, resistência ao acúmulo de micotoxinas; e Tipo V, tolerância de rendimento (MESTERHAZY, 1995).

A exploração de marcadores moleculares associados com genes para a resistência a giberela tem sido focada no tipo II (YANG et al., 2003). A resistência a fusariose é herdada quantitativamente e as regiões cromossômicas responsáveis por ela já foram identificadas em muitos cromossomos, entre os quais o 1B, 2A, 2B, 2D, 3A, 3BS, 5A, 5D, 6B, 7B (BAI et al., 1999; ANDERSON et al., 2001; BUERSTMAYR et al., 2002; ZHOU et al., 2002; STEINER et al. 2004; MARDI et al., 2005; SCHMOLKE et al., 2005; YANG et al., 2005; KLAHR et al., 2007).

A interação entre o genótipo e o ambiente tem um impacto significativo sobre a expressão da resistência (KLAHR et al., 2007). Estes fatores, e o fato da característica ser expressa no estágio adulto, são obstáculos à seleção, tornando assim, a resistência, um valioso alvo para seleção assistida por marcadores moleculares (KORZUN; EBMEYER, 2003) que poderia permitir a combinação de diversos genes de resistência de germoplasmas exóticos em cultivares adaptados.

A resistência é herdada como uma característica quantitativa governada por muitos QTLs, individualmente responsáveis por uma parte relativamente pequena na

variação fenotípica, porém a precisa validação destes efeitos em diferentes locais é crucial (LANDJEVA et al., 2007).

Miedaner et al. (2006) relataram o piramidamento de três QTLs de trigo para resistência à fusariose, provenientes de duas fontes não adaptadas ao cultivo, dando origem a linhagens contendo os alelos dos respectivos QTLs doadores, individualmente e em combinações. A avaliação dos efeitos na expressão da resistência revelou que todos os três QTLs, individualmente, reduziram significativamente o conteúdo de desoxinivalenol e a severidade da infecção, quando comparados aos controles suscetíveis contrastantes. A combinação de alelos dos QTLs posicionados nos cromossomos 3B e 5A produziu o mais alto efeito para ambos os caracteres

As tentativas anteriores de transferência de resistência não foram inteiramente bem sucedidas, devido à diluição do efeito produzido pelas novas interações de genes em outras formações genéticas, ou simplesmente porque a ligação marcador/QTL não foi suficiente para acompanhar esta transferência (LANDJEVA et al., 2007).

Melhorias possíveis à resistência poderiam ser alcançadas através de uma combinação da transferência de alguns QTLs de grande efeito por seleção assistida por marcadores moleculares e uma posterior acumulação de QTLs de menor efeito (WILDE et al., 2007).

Atualmente, não existem cultivares de trigo indicadas para plantio com bom nível de resistência à giberela. Além disso, a rotação de culturas tem se mostrado pouco eficiente para o controle dessa doença. A redução dos danos causados reside na adoção de cultivares menos suscetíveis associadas ao uso de fungicidas. O controle químico, com os fungicidas atualmente disponíveis, tem eficiência moderada e aumenta o custo de produção. Além disso, o controle químico poderá não ser efetivo, devido ao longo período de suscetibilidade das espigas, bem como às dificuldades para aplicação, principalmente quando se diz respeito ao momento adequado (EMBRAPA...2007a).

2.6 Marcadores moleculares

Nos últimos anos tem aumentado significativamente a aplicação de marcadores moleculares na detecção da variabilidade genética, a nível de DNA (MOLINA, 1999). Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da

detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) e suas aplicações têm 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).

Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de uma seqüência específica de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Segundo Milach (1998a), marcadores moleculares são características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados.

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, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos (BRAMMER, 2000).

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 Minissatélites 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”) AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) e Microssatélite (ou SSR-“Simple Sequence Repeats”) (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 destacam-se os baseados na análise de SSR ou microssatélites (LITT; LUTY, 1989).

Os microssatélites são seqüências de um a seis pares de bases repetidas “em tandem” ou seja, adjacentes umas às outras, distribuídas no genoma. Eles são abundantes e têm distribuição por todo o genoma dos organismos eucarióticos. 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 têm assumido um papel importante em análises genéticas, inicialmente no estudo de genomas humanos e mais recentemente no estudo de um grande número de espécies de plantas. Eles 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 (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Gupta et al. (2003), recentemente, a ênfase na área dos marcadores moleculares tem sido no uso de EST-SSR, os quais são obtidos pela utilização de ferramentas de bioinformática, sendo derivados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) ou genomas completos seqüenciados. Esses marcadores são utilizados para análise de regiões expressas do genoma. EST-SSR oferecem as seguintes vantagens sobre outros marcadores: detectam variação na porção expressa do genoma, assim podem ter uma perfeita associação com genes de interesse; podem ser desenvolvidos sem custo a partir de bases de dados de ESTs e uma vez desenvolvidos, esses marcadores, diferentemente dos genômicos, podem ser usados com sucesso em espécies relacionadas.

Segundo Federizzi (1998), para a eficiente utilização de marcadores moleculares, esses devem preencher alguns pré-requisitos: o marcador de DNA deve co-segregar ou estar proximalmente ligado ao gene de interesse; a técnica deve ser reproduzível entre os diferentes laboratórios; deve ser eficiente para avaliar um grande número de genótipos como rotina; ser de custo acessível para uso rotineiro nos programas e ainda de fácil execução. Dentre os requisitos citados, os microssatélites genômicos preenchem a todos, com exceção ao primeiro, ao menos em altas percentagens, em que o marcador deve co-segregar ou estar próximo ao gene de interesse. Os microssatélites genômicos são determinados aleatoriamente no genoma, independente de marcarem regiões expressas ou não, com pequena probabilidade de estarem próximos a genes de interesse. Ao contrário disso, marcadores EST-SSR são situados em regiões expressas do genoma.

A localização de microssatélites e o desenvolvimento de *primers* em outras regiões codificadoras de interesse são muito úteis para os programas de melhoramento genético. Podem-se destacar, como regiões de interesse no genoma, as ligadas aos genes “mads box”, que formam um grupo de genes envolvidos em vários aspectos do desenvolvimento das plantas, incluindo aqueles relacionados ao desenvolvimento e manutenção de meristemas, época de florescimento, identidade floral, desenvolvimento de órgãos florais, fertilidade do pólen, desenvolvimento do óvulo e várias outras características relacionadas a estruturas florais (CAUSIER et al., 2002).

2.7 Bioinformática e a Transferabilidade de SSRs

A principal desvantagem de marcadores SSR é o seu desenvolvimento, que consome muito tempo, além de ser um trabalho moroso e de custos elevados. No entanto, uma vez desenvolvidos, estes podem ser utilizados para uma variedade de fins e, com frequência, em diferentes espécies. Além disso, recentemente foram criadas técnicas para facilitar o desenvolvimento desses marcadores e reduzir seus custos. Eles podem ser obtidos tanto de bibliotecas genômicas como a partir de ESTs (BOUCK; VISION, 2007).

Com o desenvolvimento da bioinformática (permitindo a chamada análise *in silico*) e o rápido crescimento de bases de dados de ESTs fez com que este tipo de seqüência se tornasse fonte importante para identificação de novos locos microssatélites. Segundo Saha et al. (2006), em espécies onde dados de EST não estão bem estabelecidas, bibliotecas genômicas são consideradas como uma fonte importante de marcadores de microssatélites.

Dentro desse contexto, a genômica comparativa tornou-se uma importante estratégia para a utilização de informações genéticas entre diferentes espécies (Figura 1), revelando que o conteúdo e a forma de genes são, geralmente, conservadas entre algumas espécies estreitamente relacionadas (GALE; DEVOS, 1998).

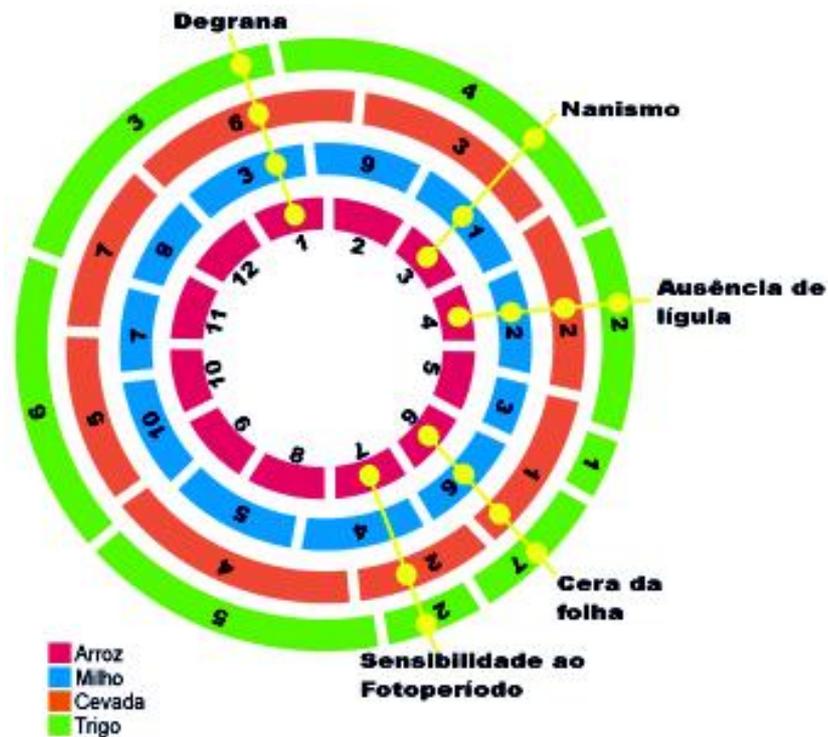


Figura 1 - Sintenia entre genomas de arroz, milho, cevada e trigo. As informações obtidas com o estudo do genoma menor (arroz) podem ser úteis para localizar, mapear e clonar genes em genomas maiores. Os pontos amarelos indicam a posição de genes e os cromossomos são indicados por números.

O mapeamento comparativo tem sido usado para estender informações genéticas a partir de organismos modelo para espécies mais complicadas (PATERSON et al., 1995). A colinearidade de marcadores comuns entre as espécies sugere que os conhecimentos adquiridos através de análise molecular em uma espécie serão úteis em espécies afins. No entanto, estudos recentes têm revelado considerável complexidade na estrutura do genoma entre espécies (SORRELLS et al., 2003), bem como dentro de espécies (FU; DOONER, 2002; BRUNNER et al., 2005). Análises de seqüências de locos de SSR indicaram alta homologia em regiões flangeadoras de várias espécies de gramíneas (SAHA et al., 2004). Assim, pares de *primers* desenvolvidos a partir de uma espécie podem ser utilizados para detectar SSRs em espécies relacionadas (KULEUNG et al., 2004; YU et al., 2004).

Elevadas taxas de transferência de marcadores de SSR em várias espécies, dentro de um gênero (GAITÁN - SOLÍS et al., 2002) e, por vezes, entre gêneros (VARSHNEY et al., 2005), foram relatadas. A transferência de marcadores SSRs genômicos entre gêneros é geralmente baixa (ROA et al., 2000). No entanto, a elevada similaridade de seqüências entre os membros da família Poaceae e a

transferência de EST-SSRs entre várias espécies (VARSHNEY et al., 2005) sugerem que a transferência de SSRs genômicos entre diferentes gêneros dessa família devem ser investigados, pois podem ser úteis para aumentar a resolução de mapas comparativos entre espécies relacionadas.

3 Materiais e Métodos

O presente estudo de amplificação heteróloga e busca de marcadores moleculares de microssatélites associados com resistência à fusariose foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos e de Caracterização Molecular de Plantas, localizado no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

3.1 Material Biológico

Para o desenvolvimento desse estudo foi utilizado o DNA de 13 cultivares de trigo com diferentes níveis de resistência à giberela ou fusariose. Os genótipos utilizados no estudo são classificados como: suscetíveis, moderadamente suscetíveis, moderadamente resistentes e resistentes (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação das cultivares de trigo utilizadas na pesquisa e suas classificações quanto ao nível de resistência à fusariose. UFPel/Pelotas 2007

Nome da Cultivar	Instituição	Nível de resistência	Fonte
BRS 194	Embrapa	S	CNPT/Embrapa (2007b)
BRS 49	Embrapa	S	CNPT/Embrapa (2007c)
Br 23	Embrapa	S	CNPT/Embrapa (2007d)
CD 111	Coodetec	S	Coodetec (2007)
CEP 40	Fundacep Fecotrigo	MS	Fundacep (2007)
Ônix	OR Sementes	MS	Apassul (2007a)
CEP 27 missões	Fundacep Fecotrigo	MS	Apassul (2007b)
BRS 177	Embrapa	MR	CNPT/Embrapa (2007e)
BRS 179	Embrapa	MR	CNPT/Embrapa (2007f)
CEP 24 industrial	Fundacep Fecotrigo	MR	Apassul (2007c)
Frontana	Iwar Beckman	R	Berzonsky et al. (2007)
Sumai 3	Introdução (China)	R	Ban e Suenaga (2000)
GW 3	Introdução (Japão)	R	Garcia Júnior et al. (2007)

S - suscetível, MS - moderadamente suscetível, MR - moderadamente resistente, R - resistente

3.2 Primers para a análise de locos de Microsatélites

Neste estudo foram testados 55 pares de *primers* para locos de microsatélites ou SSRs, destes, 13 pares são flaqueadores de locos de SSRs posicionados na região anterior, supostamente promotora, de genes “mads box” oriundos de um genótipo de arroz (*Oryza sativa*) da subespécie *indica* e de um genótipo da subespécie *japonica*. Estes microsatélites estão posicionados na região anterior a uma distância de até 3Kb do gene e possuem “motifs” com duas repetições do nucleotídeo, sendo o “motif” repetido, no mínimo, oito vezes.

Além disso, foram utilizados, também, 39 pares de *primers* que flanqueiam locos de microsatélites posicionados em ESTs (Expressed Sequence Tags) construídos com base em ESTs de arroz disponíveis nos bancos de dados. Estes microsatélites possuem “motifs” contendo três repetições do nucleotídeo, sendo o “motif” repetido, no mínimo, seis vezes.

Os 52 pares de *primers* de microsatélites, tanto aqueles posicionados próximos a região “mads box” quanto os localizados em ESTs, foram desenhados de modo que amplificassem fragmentos entre 100 e 400 pares de bases e que a temperatura de anelamento ideal fosse em torno de 55°C. A seqüência dos *primers* de cada loco marcador e o tamanho do fragmento de DNA esperado em arroz podem ser visualizados na tabela. 2

Tabela 2 - Descrição das seqüências dos *primers* para locos de microsatélites utilizados na pesquisa e tamanho aproximado dos alelos amplificados em arroz. (BONOW, 2004)

Marcador	Tamanho do alelo esperado em arroz (pb)	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')
OS1	238	TCCGCGCTTAATTTCTCGACCTGT	GCTACCCGGCATTGCCATTTTC
OS2	300	GGGCGCCGGCGGAGATG	AGGCGTCCACGTTTAGGCTTGTC
OS3	192	ATGCGGATAATCAAATAGACTACG	CTGTGCTGGCCGGAGTGCT
OS4	269	GGTGGCTGGCGATATTAATTCA	TCACAGCGCGGCACGAC
OS5	160	ATCCCAATCCCAAAGTAGTGTAGG	GATCCCCGGGTCTCGTGA
OS6	216	GATGAGGACGACATAAAAGGTGTG	TGTCCACATGTGCCAACAATATA
OS7	208	CTTATTCTCCGTACATCAAACAT	TTCGTGCGAGCCAATTT
OS8	253	TGCCGTTGCCCTAAGTTGTCTTCT	AGGCCCTAGGGCTTGCTGTTTCT
OS9	271	GCTTTTCAAAGGAAACAGAATTAT	TTAGGGACAAATTCATTTTCTTC
OS10	287	CAGGGAAGACAATCGAAAGGTA	CCTTGTTTTAGCGTGTGATGTAAA
OS11	233	TCCACCCCATGTGGTATAATGTGC	TGGCCATGGCCATGAGGAGT
OS12	147	ACCGAGCCCTACCCCTACGTCGAT	GGAGCGCCGAAATGGAAACTG
OS13	198	TTATACTCCCTCCATTTTCATATTG	ATCCGTTTCACAATGTAAGAATT
OS14	143	CGGCGGCGGGGATTGGGAGTAGGA	GAGCGCCTGGTTGATGGCCGTGAA

Continua...

Tabela 2 - continuação

OS15	209	CTCGGCCTGCATAGCGGAGAGGTA	GTACGCGCCGGCCCTGTCAG
OS16	244	GCGCCGAGGCCGAGCAACAGTGAG	CAGGCGCCGATGCCGAGCTTGCTC
OS17	320	ATGTGTTGCCATTCTTTGTTCA	TCTTCTTCGGCATCCGATCAT
OS18	179	CCGCCGCCACGCTCGACCTTCTC	CGCGGCGGCGACCTTCTTGTCCTC
OS19	215	CGGCGGCGGGAACGCGATGAAC	CACCACCGCGCTCGTCGTC
OS20	210	GACCTGGCTGATCTGGCTTCTCA	AACTCCCCATTCTCGATGAGCT
OS21	250	TGGTGCCTCGTGCTGGCACTCG	CACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG
OS22	264	GACGGCTTACCCGGAGAAGGTC	ATCCACCATCGATCGATTACACC
OS23	183	CCCGCCGCCACGCTCGACCTTCTC	CGGCGGCGGCGACCTTCTTGT
OS24	400	TCTAGCTCGTCGCCCATGAACG	CTTGCGGCGGAGGACTGCACCAC
OS25	213	AAGGGAACCCCTTCTTCTCCTC	AGGCCGACGCGGAGGCCCTGGAG
OS26	143	CGGCGGCGGGGATTGGGAGTAGGA	GACCGCTGGTGTATGGCCGTGAA
OS27	160	CCCGGCGCCACGGCGGAGAG	CACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG
OS28	98	CCGCATCACACCCCTTAAAGGAAG	CCCGGCGCCACGGCGGAGAGG
OS29	234	GCGCGGCCGACGCCACTTCTTG	GTGCGGCCCTTGGCGAATTGAG
OS30	206	CTCTCGCAAGCCAAGTCGCAATCC	TTTGCCGCTCCTTTTTGTAGGT
OS31	160	TAGCAATGGCTCCTCTCGGTGACG	TCCCCGACGACACCACCAGGTTG
OS32	201	AGGGGTTCTCGGGACGGCAATTC	CCAACTGCGCAGCGGAGCCAATG
OS33	217	ACCCCCAGGGGCAATTTTATTTA	ATGCGGTGGGTGCAAAGCAAGTAC
OS34	233	GCGCGGCCGACGCCACTTCTTG	TCGCGGCCCTTGGCGAATTGAGC
OS35	252	TTGCCGGGCAATACCGAACCTC	CCGCCGACCGCCACGTC
OS36	182	GCCCTCCCTCCGTTCCGACAGAC	GGCCGCTCGTGCCCTTCATCAG
OS37	179	GGGGGCGGCGAGGGGAAGT	TTCCTTTGCGCATTACTACTAG
OS38	127	CGGCGTCGTCGGTTCGTCGGTCTC	GCCGGTGGCGGCGGAGGAGCAG
OS39	125	CGCCGGCGCGGAGGCTGTAGTACA	GCCGGTGTCCGCCCAAGAAGT
OS40	128	GCGCCGGCGCGGAGGCTGTAGTAC	GCCGGTGTCCGCCAAGAAGT
OS41	255	CAAAGGGGATTTCTGCAAGAA	ACGGGTGCAACAGCGACCTC
OS42	126	CGGCGTCGTCGGTTCGTCGGTCTC	CCGGTGGCGGCGGAGGAGCAG
OS43	187	CGCCGCCCAAGTCCGACAC	CCAGCTGAGCCGCTTCGTCCAG
OS44	242	TCCTGCGATTGCGTAATCATCCTA	ATGGCCGGTTAATTTTCGTGGTTA
OS45	106	ACAGGCCGAGGAGGAAGAGGAA	AAGGCGGCGAGGATGAGGTCT
OS46	139	GTGGCGGTGGCTACAACAGAGGT	CTGCCACCACGGTGGTCATCA
OS47	249	AGGTGGCTTTAGCCAGTCAGACTT	CTCGGCTCTTTTCGCTAGACCTT
OS48	116	CGCGGCGGCGAGGGCAGGAG	CGCCGAGTGGTGAACGCCACCTC
OS49	194	AGACGGAGGCTCGTGCAGCAACC	GGCGGGGCGGGCGATGGAGGTGTA
OS50	181	GCCGCCGCCACGCTCGACCTTCTC	GCGCGGCGGCGACCTTCTTGTCCT
OS51	Nr	TAGCAATGGCTCCTCTCGGTGACGTTG	TCCCCGACGACACCACCAGG
OS52	Nr	CGGCGGCGGGAACGCGATGAAC	CACCACCGCGCTCGTCGTC
RM206	Nr	CCCATGCGTTAACTATTCT	CGTTCCATCGATCCGATGG
RM208	Nr	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTGTGTGGACC
RM243	Nr	GATCTGCAGACTGCAGTTGC	AGCTGCAACGATGTTGTCC

Nr – Não relatado

Foram testados, também, três pares de *primers* para locos de microssatélites genômicos de arroz, posicionados em regiões cromossômicas envolvidas na síntese de proteínas, entre elas, algumas supostamente com função de resistência a patógenos, como pode ser observado na tabela 3. A seqüência de *primers* para esses locos também pode ser visualizada na tabela 2, identificados com RM.

Tabela 3 - Marcadores de locos de microssatélites genômicos de arroz testados nas cultivares de trigo incluídas na pesquisa. (Malone, 2006)

Marcador	Identificação	Proteína	Função
RM206	Q2R1X3_ORYSA	NB-ARC domínio protéico	Resposta de defesa a patógenos
RM208	Q6K9S2_ORYSA	Possível proteína de resistência	Desconhecida
RM243	Q2QM30_ORYSA	Possível proteína	Desconhecida

3.3 Extração de DNA

O DNA, para amplificação dos locos de microssatélites, foi extraído a partir de folhas de plântulas provenientes de sementes colocadas para germinar em vasos, em casa-de-vegetação, sob condições de umidade e temperatura controladas. Para o isolamento de DNA genômico de cada cultivar de trigo foram utilizados um pool de subamostras de 10 plantas por cultivar. Para a extração do DNA foi utilizado, o método descrito por Doyle e Doyle (1991). O processo básico consiste em: maceração de aproximadamente 200 mg de folhas em nitrogênio líquido; adição de 900µL de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris pH 8,0, 0,5% β-Mercaptoetanol, 1% PVP); manutenção em banho-maria por 50 min a 65°C; uma desproteinização com 1 volume de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1); precipitação com 1 volume de etanol absoluto e lavagens com 500µL de etanol 70% e etanol absoluto; ressuspensão em 50-200µL de TE (10mM tris, 1mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase (10µg/mL). A quantificação do DNA e confirmação da sua integridade foi realizada em gel de agarose 0,8% com base no padrão de bandas do marcador de massa molecular Lambda clivado com a enzima de restrição *Hind* III.

3.4 Amplificação do DNA

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (PCR Sprint – Thermo Electron Corporation) e consistiu, inicialmente, de 5 minutos a 94°C, após, repetidos 35 ciclos com a seguinte seqüência: desnaturação a 94 °C por 50 segundos, o anelamento de 50°C a 60°C, dependendo do *primer*, por 50 segundos e a extensão a 72°C por 50 segundos e, finalizando a reação de amplificação, 10 minutos a 72°C.

Nas reações de PCR foram utilizados 20 ng de DNA; 2,5 µl de 10x PCR buffer; 2mM de MgCl₂; 2µM de cada *primer*; 100µM de cada dNTPs; 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água Milli-Q para um volume final de 25µl.

Os *primers* para locos de microsatélites foram inicialmente testados com diferentes temperaturas de anelamento, utilizando apenas uma cultivar de trigo com cada nível de resistência, para verificar a transferência de marcadores de microsatélites de genótipos de arroz para genótipos de trigo, e então, selecionados para serem utilizados na busca de marcadores moleculares indicadores de resistência à fusariose com as demais cultivares de trigo.

Inicialmente, as cultivares de trigo, caracterizadas como suscetíveis (S), moderadamente suscetíveis (MS) e moderadamente resistentes (MR) é que foram, individualmente, submetidas à amplificação com os *primers* de locos de microsatélites. Após, houve a formação de “bulks” de DNA, quando foram incluídas as cultivares classificadas como resistentes, sendo cada um deles formado pela mistura de iguais concentrações de DNA das cultivares com iguais níveis de resistência. Sendo assim, foram constituídos quatro bulks; o primeiro formado pelas cultivares de trigo classificadas como suscetíveis (BS); o segundo formado pelas cultivares classificadas como moderadamente suscetíveis (BMS); o terceiro representado por cultivares moderadamente resistentes (BMR) e o quarto constituído pelas cultivares resistentes (BR).

3.5 Eletroforese dos fragmentos amplificados

Os fragmentos de DNA amplificados a partir dos *primers* selecionados foram inicialmente submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% em tampão TBE 0,5X em cuba de eletroforese horizontal. Como marcador de massa molecular foi utilizado DNA Ladder 100pb e a visualização dos fragmentos foi realizada com brometo de etídeo e a observação feita sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR também foram

desnaturados e submetidos à separação em gel de poliacrilamida 6% em cuba vertical e a visualização das bandas ocorreu pela coloração dos géis com prata, segundo protocolo proposto por Bassan et al. (1991).

3.6 Avaliação dos polimorfismos de DNA

Os padrões de bandas obtidos foram avaliados quanto à ocorrência de polimorfismos de DNA, entre as cultivares de trigo com diferentes níveis de resistência à fusariose. Buscou-se identificar algum marcador de microssatélite nos genótipos moderadamente resistentes (MR), quando a avaliação ocorreu nos cultivares individualmente, e nos cultivares moderadamente resistentes (BMR) e resistentes (BR) quando foi realizada a análise de bulks. Nesta etapa buscou-se também caracterizar o tamanho dos alelos amplificados.

3.7 Seqüenciamento de fragmentos de DNA produzidos por PCR

O produto de PCR correspondente às amplificações com os *primers* para os locos OS35, OS46 e OS49 foram submetidos ao seqüenciamento. Para isso, foram utilizadas 100ng de DNA amplificado juntamente com o kit de seqüenciamento DYEnamic™ ET termination (Amershal Biosciences) conforme protocolo do fabricante. As reações de seqüenciamento foram analisadas em um seqüenciador automático MegaBACE 500 (Amershal Biosciences) e os fragmentos amplificados foram seqüenciados no mínimo três vezes para confirmação dos resultados. As seqüências dos *primers*, cujos produtos amplificados foram utilizados no seqüenciamento podem ser verificados na tabela 2.

3.8 Análise *in silico* das seqüências de nucleotídeos

Após o seqüenciamento, a qualidade das seqüências de nucleotídeos foi analisada pela sobreposição dos fragmentos reunidos utilizando o software Vector NTI Advance 10.0, AlignX e Contig Express (InforMax, Inc.). A determinação da seqüência consenso foi feita pelo alinhamento dos produtos obtidos utilizando o software ClustalX (THOMPSON et al., 1997). A natureza das seqüências foi confirmada a partir do alinhamento contra seqüências depositadas no banco de dados de nucleotídeos e de ESTs do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4 Resultados e Discussão

4.1 Amplificação Heteróloga de marcadores moleculares

No estudo da transferabilidade de marcadores moleculares de microssatélites de genótipos de arroz para genótipos de trigo foram analisados 55 locos de microssatélites, sendo que destes, 42 locos (76,4%) tiveram alelos amplificados. Dentre os locos amplificados, 32 (76,2%) apresentaram-se monomórficos (Fig. 1) e 10 (23,8%) apresentaram-se polimórficos

A maioria dos alelos amplificados teve seqüências acima do tamanho esperado. Segundo Tang et al. (2006) isso pode ser atribuído a uma inserção de íntrons a qual está sujeito o genoma de trigo. Apenas 12 (21,8%) apresentaram amplificação de alelos de acordo com o tamanho esperado, ou seja, em torno de 100 a 400 pares de bases. Apenas 13 (23,6%) pares de *primers* flanqueadores de locos de microssatélites não apresentaram amplificação heteróloga (Tabela 4).

Tabela 4 - Descrição dos locos de microssatélites de arroz, usados para análise em cultivares de trigo, quanto ao tamanho de fragmentos amplificados (pb) e comportamento em relação ao polimorfismo. UFPel/Pelotas, 2007

Marcador	Fragmento aproximado pb	Polimorfismo	Marcador	Fragmento aproximado pb	Polimorfismo
OS1	280 – 900 *	P	OS29	140 – 1500 *	P
OS2	750	M	OS30	200 – 600 *	M
OS3	1300	M	OS31	300 – 1200 *	M
OS4	400 – 750 *	M	OS32	200 – 1300 *	M
OS5	300	M	OS33	230 – 1500 *	M
OS6	-	NA	OS34	140 – 530 *	M
OS7	350 – 600 *	P	OS35	420	M
OS8	130 – 550 *	M	OS36	110 – 700 *	P
OS9	-	NA	OS37	250 – 550 *	M
OS10	-	NA	OS38	-	NA
OS11	-	NA	OS39	200 – 600 *	M
OS12	350	M	OS40	200 – 800 *	P
OS13	-	NA	OS41	300 – 1100 *	M
OS14	-	NA	OS42	200 – 650 *	M
OS15	250	M	OS43	340 – 400 *	M
OS16	300 – 400 *	P	OS44	200 – 500 *	P
OS17	230	M	OS45	200 – 600 *	P
OS18	400 - 700*	M	OS46	150	M
OS19	-	NA	OS47	-	NA
OS20	230	M	OS48	320	M
OS21	200 – 600 *	M	OS49	210	M
OS22	150 – 700 *	P	OS50	200 – 1100 *	P
OS23	400	M	OS51	250 – 400 *	M
OS24	260 – 1300 *	M	OS52	180	M
OS25	400 – 600 *	M	RM206	-	NA
OS26	-	NA	RM208	-	NA
OS27	300 – 400*	M	RM243	-	NA
OS28	230 – 600 *	M			

P - Polimórfico, M – Monomórfico, NA – Não Amplificado, * mais de um fragmento amplificado

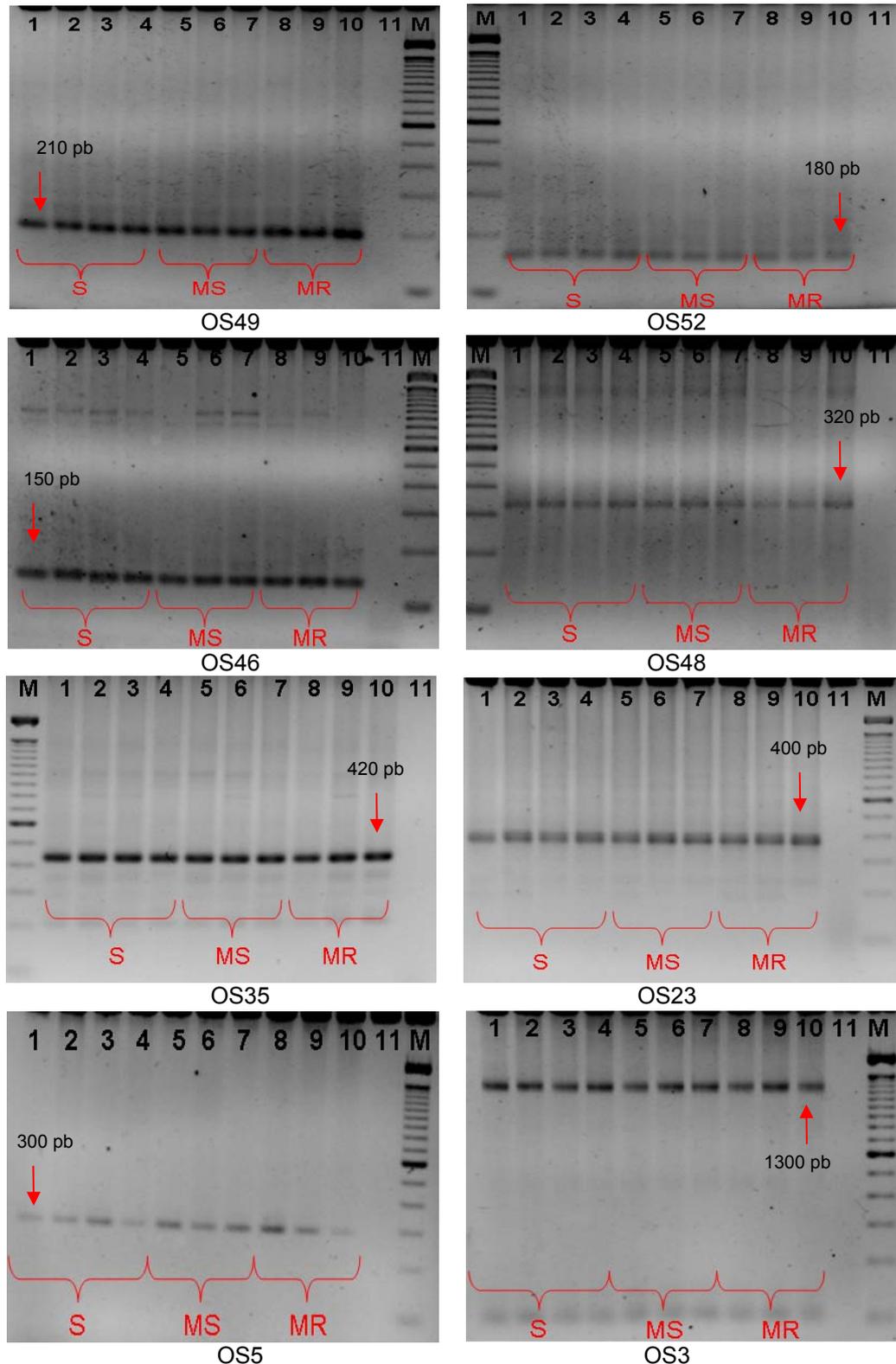


Figura 2 - Padrões de amplificação obtidos com os *primers* para locos de microsatélites OS49, OS52, OS46, OS48, OS35, OS23, OS5 e OS3 em 10 cultivares de trigo com diferentes níveis de resistência à fusariose. (1-BRS194, 2-BRS49, 3-BR23, 4-CD111, 5-CEP40, 6-Ônix, 7-CEP27, 8-BRS177, 9-BRS179, 10-CEP24, 11 - controle negativo, M - Ladder 100pb, S - suscetível, MS - moderadamente suscetível e MR - moderadamente resistente).

Se forem considerados apenas os locos de microssatélites posicionados em ESTs ou próximos a genes “mads box” a taxa de transferibilidade dos genótipos de arroz aos genótipos de trigo chega a 80,8% (42 dos 52 testados), sendo que os três pares de *primers* para locos de microssatélites genômicos de arroz utilizados não produziram amplificação nos genótipos de trigo incluídos neste estudo.

Em um trabalho realizado por Kuleung et al (2004) foi verificada a transferibilidade de marcadores de microssatélites genômicos entre trigo, triticale e centeio. Foram utilizados 148 marcadores de trigo e 28 marcadores de centeio para amplificar o DNA genômico de cada um dos cereais, sendo verificada uma transferibilidade de marcadores do trigo para o centeio de apenas 17%, enquanto que 25% dos marcadores de centeio foram amplificados em trigo. Em triticale, foi atingido 58% e 39% de transferibilidade com marcadores de trigo e centeio, respectivamente.

Tang et al. (2006) analisaram a homologia e a transferibilidade de marcadores SSR-ESTs de trigo entre cevada, arroz e milho. Baseados em 428 SSR-ESTs comuns às quatro espécies produziram 243 pares de *primers* para o teste. Destes, 216 (88,9%) produziram amplificação em trigo, 211 (86,8%) em cevada, 166 (68,3%) em milho e 187 (77,0%) em arroz, taxa semelhante à encontrada no presente trabalho (80,8%), onde a transferibilidade ocorreu de forma inversa, ou seja, do genoma do arroz para o genoma do trigo.

A percentagem de pares de *primers* funcionais decresceu com o aumento da distância filogenética e somente com quatro deles foi obtido produtos de PCR do mesmo tamanho entre as espécies. Os *primers* foram desenhados para amplificar fragmentos entre 100 e 300 pb, mas aproximadamente 6,2% (15/243) amplificaram fragmentos muito maiores (>600 pb) que o esperado. No genoma de trigo isso é esperado devido à inserção de íntrons (TANG et al, 2006).

Em outra pesquisa, para determinar a potencial amplificação cruzada entre espécies, foram testados 165 marcadores EST-SSRs de cevada em trigo, centeio e arroz, sob as mesmas condições, e de acordo com a amplificação original em cevada. Dos *primers* usados, 78,2% amplificaram em trigo, 75,2% em centeio e 42,4% em arroz, e como esperado, não foram todos os marcadores que produziram um produto do mesmo tamanho. Os resultados da amplificação de DNA, de pelo menos dois genótipos de trigo e centeio, indicaram que a taxa de transferibilidade entre espécies é genótipo dependente. Por exemplo, em centeio, 106 (64,2%)

marcadores renderam ampliações no genótipo P87, em comparação com 119 (72,1%), no genótipo P105. Dos marcadores moleculares de cevada, 62 (37,6%) mostraram amplificação em ambas as espécies de Triticeae (trigo e centeio), em comparação com 28 (16,9%) para as três espécies de cereais (trigo, centeio e arroz) examinadas (VARSHNEY et al., 2005).

A alta taxa de transferibilidade de EST-SSRs de trigo para centeio (67,9%) observada por Zhang et al. (2005) contrasta com a baixa transferibilidade (17%) encontrada por Kuleung et al. (2004) e também com aquela referida por Röder et al. (1995) que foi de apenas 6,75%. A transferibilidade de marcadores de microssatélites posicionados em ESTs de trigo para cevada, por exemplo, foi de 55,8% e de trigo para arroz foi de 28,3%, taxas que foram consideradas relativamente boas (ZHANG et al., 2005). Esses resultados também são compartilhados por Yu et al. (2004) que mostraram uma taxa de 53% de transferência de trigo para cevada e uma alta porcentagem de transferência (45%) de marcadores do trigo para arroz. Este fato pode ser atribuído à seleção de *primers*, que confere melhor resultado quando feita com base em regiões conservadas entre as duas espécies (trigo e arroz), do que quando projetados apenas sobre seqüências de ESTs de trigo, o que foi realizado por Zhang et al. (2005).

Neste trabalho, foram utilizados 52 pares de *primers* flanqueadores de microssatélites posicionados próximos ou em genes do genoma de arroz e a taxa de transferibilidade para cultivares de trigo foi de 80,8%, mostrando que existe uma alta homologia entre estas duas espécies quando se leva em consideração as porções expressas do genoma.

Conforme Gupta et al. (2003), a transmissibilidade de EST-SSRs entre espécies afins é elevada em relação aos SSRs genômicos, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho e à indicação de que os EST-SSRs são um dos recursos mais úteis de marcadores moleculares em estudos de genômica comparativa. Estas maiores taxas de amplificação heteróloga podem ser atribuídas ao maior nível de conservação das seqüências de DNA pertencentes às regiões transcritas dos genomas.

4.2 Associação de marcadores com a resistência à fusariose

Embora a taxa de transferência de marcadores moleculares de microssatélites isolados de arroz para cultivares de trigo tenha sido elevada (76,4%)

o polimorfismo observado foi relativamente baixo, apenas 23,8% dos locos amplificados apresentaram-se polimórficos. Este baixo índice de polimorfismo não permitiu a identificação de bandas que evidenciassem a ligação para a resistência à fusariose no trigo, como pode ser observado nas imagens dos géis da fig. 2, quando avaliados os genótipos individuais e os bulks de cultivares contrastantes (Figura 3).

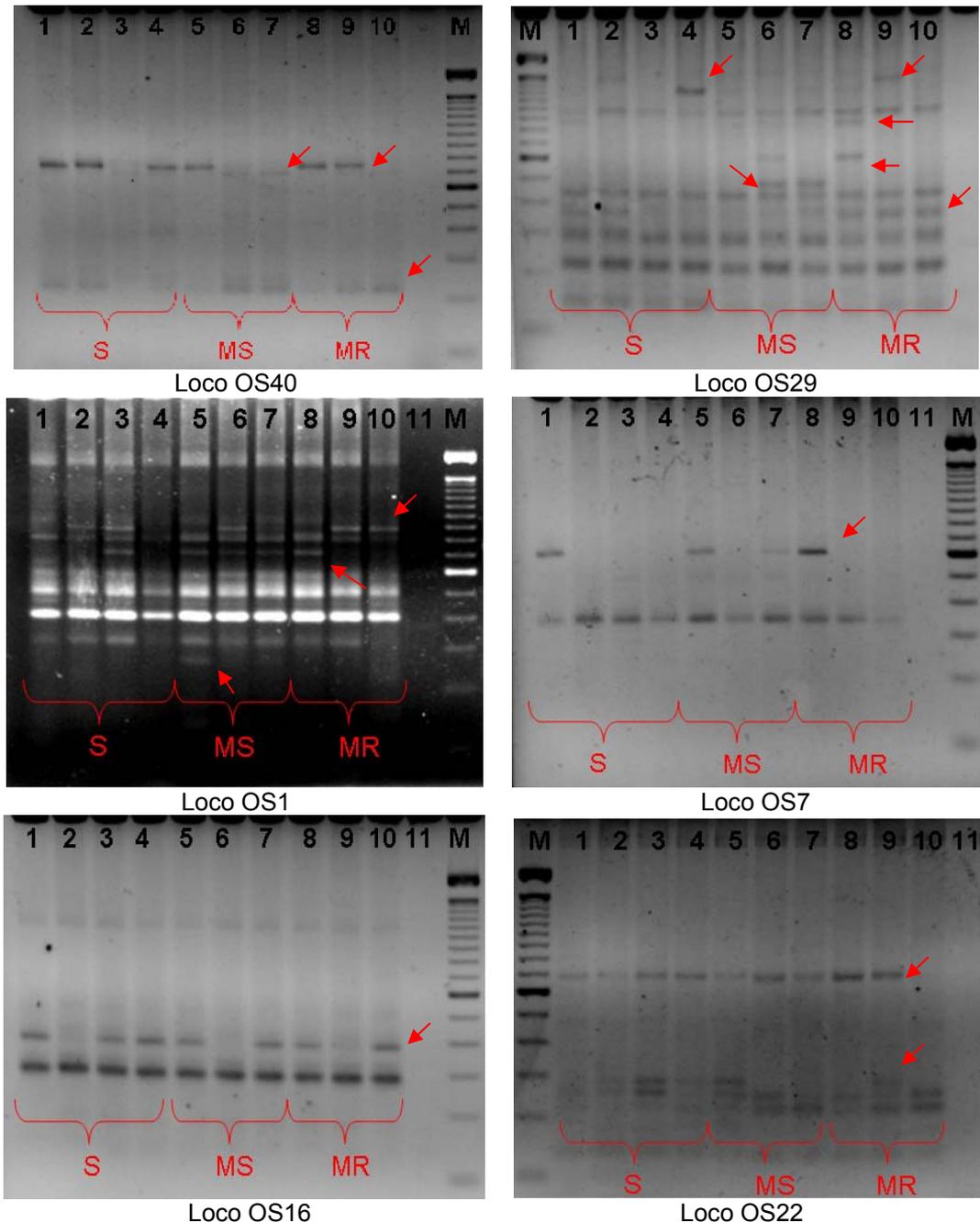


Figura 3 - Padrões de polimorfismos gerados pelos marcadores de locos microssatélites OS40, OS29, OS1, OS7, OS16 e OS22 em 10 cultivares de trigo com diferentes níveis de resistência à fusariose. (1-BRS194, 2-BRS49, 3-BR23, 4-CD111, 5-CEP40, 6-Ônix, 7-CEP27, 8-BRS177, 9-BRS179, 10-CEP24, 11 - controle negativo, M – Ladder 100pb, S – suscetível, MS – moderadamente suscetível e MR – moderadamente resistente, setas indicam polimorfismos). UFPel/Pelotas, 2007.

Nem mesmo com a formação dos bulks, relativos aos níveis de resistência, sendo que um deles foi formado pelas cultivares classificadas como resistentes, não utilizadas na amplificação individual, não houve amplificação de bandas polimórficas que pudessem ser utilizadas para testar a possível associação com a resistência à fusariose (Figura 3).

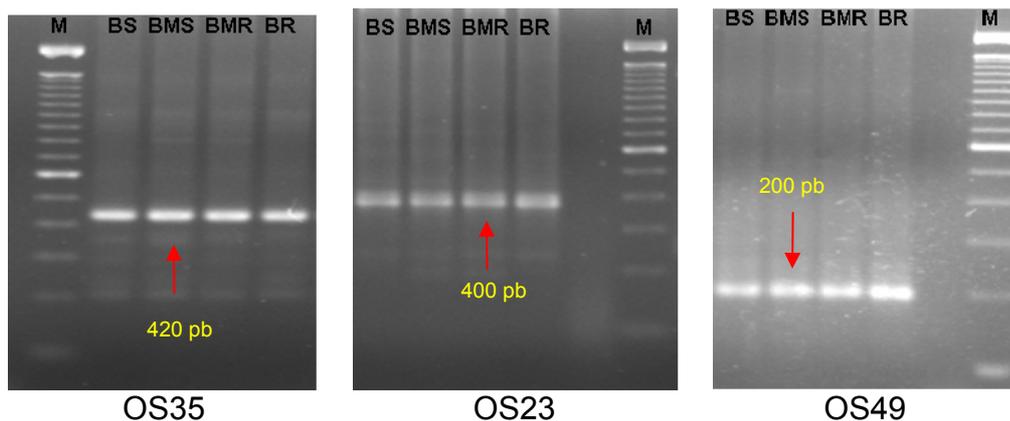


Figura 4 - Padrões de amplificação obtidos com os *primers* para locos de microsatélites OS35, OS23 e OS49 aplicados aos bulks de DNA das cultivares de trigo. (M – Ladder 100pb, BS – bulk suscetível, BMS – bulk moderadamente suscetível, BMR – bulk moderadamente resistente e BR – bulk resistente).

Partindo de ESTs do cromossomo 3B de trigo, onde está posicionado um QTL para a resistência à fusariose, e com similaridade a genes de resistência a doenças, Shen et al. (2006) construíram *primers* que amplificassem regiões do DNA de plantas resistentes em uma população segregante. Com esse método, foi encontrado uma EST (acesso no NCBI - BE499618) que identifica o QTL.

Chen et al. (2007) relataram o uso de marcadores de microsatélites derivados de ESTs isoladas do cromossomo 3A, associado com o QTL para resistência a *Fusarium*, e também buscaram ESTs relacionadas a genes de resistência a doenças. Os autores verificaram que dos 17 pares de *primers* de microsatélites utilizados, 9 foram polimórficos, mas nenhum deles foi encontrado no cromossomo 3A.

Em um estudo desenvolvido por Yang et al. (2003), também visando à identificação de marcadores ligados à resistência, foram utilizados marcadores de microsatélites específicos, localizados nos cromossomos 3B, 6B e 5A de trigo, em populações segregantes. Nestes cromossomos é relatada a existência de QTLs

envolvidos na resistência à fusariose. A combinação de marcadores de microssatélites para os cromossomos 3B e 6B mostrou-se eficiente na identificação de genótipos resistentes.

Neste trabalho, não foram utilizados *primers* baseados em ESTs posicionadas nos cromossomos que portam QTLs específicos para resistência à fusariose, nem similares a genes de resistência a doenças. Foram usados *primers* para locos de microssatélites e, entre eles, 39 posicionados em ESTs, que potencialmente poderiam gerar marcadores para diferenciar os genótipos contrastantes.

4.3 Seqüenciamento e análise

Considerando que os produtos de amplificação gerados a partir de vários locos de microssatélites revelaram a presença de alelos com tamanho superior aos esperados em arroz, levantou-se a hipótese de estarem sendo amplificados seqüências SSR e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), simultaneamente, ou então outros tipos de seqüências genômicas, a exemplo da inserção de íntrons, conforme sugerido por Tang et al. (2006). Com isso, realizou-se o seqüenciamento de alguns desses alelos para confirmar a presença de um microssatélite no interior dos produtos amplificados. Além disso, as ESTs estão relacionadas a um gene e, conseqüentemente, a uma proteína. Portanto, o seqüenciamento foi necessário para permitir a identificação de parte da composição e a ordem de nucleotídeos de alelos amplificados para o alinhamento em bases de dados, com o intuito de encontrar seqüências similares e proteínas relacionadas.

Através do seqüenciamento do DNA foi possível conhecer partes das seqüências relativas aos locos OS35, OS46 e OS49. Houve a perda de extremidades por se tratarem de fragmentos pequenos e por serem produtos de PCR submetidos diretamente ao seqüenciamento. A identificação dos microssatélites nas seqüências processadas não foi possível, mas através do alinhamento das mesmas com o BLAST (blastn), no banco de dados de nucleotídeos do NCBI, foi possível encontrar alinhamento significativo (86% de identidade) do loco OS35, com uma seqüência genômica de *Triticum turgidum* subespécie *durum* (acesso no NCBI – AY146587.2) formada, basicamente, por DNA repetitivo. O mesmo foi observado com o alinhamento da seqüência relativa ao loco OS49 (92% de identidade) a outra seqüência genômica de *Triticum turgidum* (acesso

no NCBI - CT009588.1). Não foi possível realizar um alinhamento com alta similaridade de seqüências com a seqüência correspondente ao loco OS46 no banco de dados de nucleotídeos do NCBI. A seqüência dos marcadores pode ser visualizada na tabela 5.

Tabela 5 - Seqüência parcial de nucleotídeos, tamanho dos alelos e das moléculas seqüenciadas (pb). UFPel/Pelotas 2007

Loco	Alelo (pb)	Seqüência (pb)	Seqüência
OS35	420	222	CCGCACCCACCACCCACTTGAGTAGCCACTGTGCGACGATCTAACC GACATGCTAGACTATGACTCCGAAGACATCGACGGTATGGCACGA CTGATGCCGGAGACGACCAAGAACCAGCGCCTACCGGGCACTTGG AAAGCCACCCCAACGTCACGACGTATACATGGTGGATACACCAAAA GGAAGCGATAATGAGGAAAAAACGGACGTGGCGGTGCGGCG
OS46	150	107	GGGCCTGTCACATCACGATTAGTCATCCTCCTTGTGCTCCCCCGG CACCACCATCACGACCACCATGAGTTGTAATCCCCATCACCTCTGT TGTAGCCACCGCCAC
OS49	210	190	GGCGGGGCGGGCGATGGAGGTGTAGCAGGAACAAGCTCCGGTGC GGTGAAGGGTGGCGAACGTTGGAGCGGCAGCGGTGAGGCGCAG GACGGCGTGGTTGAACTGGCTCGGGTACGGACGGCTCGGCCTCG GCTTCAACTACTAGCCGTGGAGGGCGTTGCGGTTGAGGTTGCTGC ACGACGCCTCCGT

As seqüências destes locos de microssatélites também foram submetidas ao alinhamento, através de um BLAST (blastn), com seqüências depositadas no banco de dados de ESTs do NCBI.

A seqüência relativa ao loco OS35, foi significativamente similar a 11 ESTs de *Triticum* depositadas no banco de ESTs (Tabela 6), sendo que uma delas (CA681993.1), é similar a uma seqüência relacionada a um gene de *Oryza sativa*, cultivar *japonica* (acesso no NCBI - NP_001048038.1), que codifica a proteína Os02g0734300, com função de hidrólise.

Tabela 6 - Acessos ESTs do gênero *Triticum* com alinhamento significativo à seqüência relativa ao loco de microssatélite OS35. UFPel/Pelotas 2007

Acesso	Descrição
CA648521.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA
CA652369.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA
AL816199.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA
DR092352.1	EST00012 <i>Triticum aestivum</i> cDNA
CA681439.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA
AJ716705.1	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i> cDNA
AJ610315.1	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i> cDNA
CA696832.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA
CA640793.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA
AL810708.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA
CA681993.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA

Para a seqüência correspondente ao loco OS46 foram identificadas, entre as ESTs com alinhamento significativo, ESTs de arroz das cultivares *japonica* e *indica* e de trigo, entre elas, uma EST produzida a partir de mRNA extraído de plantas da cultivar Sumai 3, resistente à fusariose, infectada por *Fusarium graminearum*, embora o alelo amplificado seja comum a todas as cultivares de trigo utilizadas, não dependendo do nível de resistência. Não houve relação com seqüências de genes da base de dados com esta EST. Para outras 15 ESTs, semelhantes ao loco, existe relação com genes identificados (Tabela 7).

A seqüência do loco OS49 mostrou-se similar, entre outras, a ESTs de trigo, milho e arroz (de cultivares *indica* e *japonica*). Como no caso anterior, para este loco, houve alinhamento a uma outra EST de trigo, cultivar Sumai 3, produzida de um mRNA de espigas previamente infectadas por *F. graminearum*. Neste caso ocorreu semelhança dessa EST com uma seqüência similar a um gene de arroz (Tab. 8). Para outras 15 ESTs também há similaridade com seqüências associadas a genes identificados.

As proteínas similares, encontradas para os locos avaliados, estão envolvidas, basicamente, em processos de regulação da transcrição e no processamento e reconhecimento do RNA.

Tabela 7 - Acessos de ESTs com alinhamento significativo à seqüência relativa ao loco de microssatélite OS 46, proteínas similares após tradução e suas respectivas funções biológicas. UFPel/Pelotas, 2007

ESTs		Proteína relacionada			
Acesso	Descrição	Acesso	Nome	Descrição	Função
BJ245435.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA	NP_001042101.1	Os01g0164400	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i>)	RRM - Motivo de reconhecimento de RNA
CA698729.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
BP184672.1	<i>Oryza sativa (japonica)</i> cDNA				
CB672466.1	<i>Oryza sativa (japonica)</i> cDNA				
CJ541651.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA	NP_001056331.1	Os05g0564200	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i>)	RRM – Motivo de reconhecimento do RNA Dedo de Zinco
CJ611006.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
DR736835.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CK208262.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CA708674.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
BJ308457.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CJ908609.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CJ896808.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CJ809984.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CJ785165.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CT863415.1	<i>Oryza sativa (indica)</i> cDNA	NP_001060383.1	Os07g0634900	<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i>)	Domínio de ligação ao DNA encontrado em complexos de regulação da repressão da transcrição
BM134812.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA, infectado por <i>Fusarium graminearum</i>				Sem relação
BJ213630.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
BJ247388.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				

Tabela 8 - Acessos de ESTs com alinhamento significativo à seqüência relativa ao loco de microssatélite OS 49, proteínas similares após tradução e suas respectivas funções biológicas. UFPel/Pelotas, 2007

ESTs		Proteína relacionada			
Acesso	Descrição	Acesso	Nome	Descrição	Função
BP184690.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica) cDNA				
CV771566.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CN011348.1	cDNA <i>Triticum aestivum</i> infectado por <i>Fusarium graminearum</i>	XP_470308.1	Possível proteína OSJNBa0091P11.3	<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Regulação da transcrição, está associada a zíper de leucina e domínios de ligação ao DNA
CA628776.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CJ788970.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				
CI140448.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica) cDNA				
CI137050.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica) cDNA				
CI226102.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica) cDNA				
CI220375.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica) cDNA	NP_001047214.1	Os02g0575800	<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Aldose 1-epimerase
CI253828.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica) cDNA				
CI175558.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica) cDNA				
CI136214.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica) cDNA				
EC883410.2	<i>Zea mays</i> cDNA	NP_001063159.1	Os09g0412900	<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Não conhecida. Supostamente envolvida na estabilidade e processamento de RNA
EB164904.1	<i>Zea mays</i> cDNA				
DY235782.1	<i>Zea mays</i> cDNA	NP_001064556.1	Os10g0404900	<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Zíper de leucina, domínios de ligação ao DNA envolvidos na regulação da transcrição
DR806150.1	<i>Zea mays</i> cDNA				
CF957515.1	<i>Oryza sativa</i> (<i>indica</i>) cDNA				
D48120.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica) cDNA			Sem relação	
CD910797.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA				

Embora tenha sido avaliada a seqüência amplificada de apenas três locos de microssatélites do trigo, este tipo de estudo deveria ser ampliado para conhecer a seqüência amplificada dos alelos com tamanhos bem acima do esperado, a exemplo dos obtidos para os locos OS 03, OS 23, entre outros, buscando verificar que tipos de seqüências estão sendo amplificadas, pois as mesmas podem conter regiões aptas para seleção de novos marcadores polimórficos, específicos para o trigo.

Apesar de ser possível a transferabilidade de marcadores moleculares entre as espécies, a identificação de seqüências, em bancos de dados do genoma do trigo, a construção e o teste de *primers*, inclusive para locos de microssatélites, são necessários para o melhor entendimento das relações genéticas intra-específicas e a possível associação de marcadores com a resistência à fusariose e o uso dos mesmos em futuros trabalhos de seleção assistida por marcadores moleculares nessa cultura de grande importância sócio-econômica para o Brasil.

Além disso, devido à resistência a essa doença estar envolvida com regiões específicas do genoma, estratégias devem ser adotadas para a identificação de marcadores posicionados nas regiões relacionadas à mesma, para que, posteriormente, tais marcadores possam ser usados em estudos de associação e seleção de genótipos com a resistência à fusariose em trigo.

5 Conclusões

Existe alta similaridade entre as regiões codificadoras dos genomas de trigo e arroz, sendo importantes os testes de transferabilidade de locos de microssatélites posicionados em regiões expressas e a utilização dos mesmos na busca de marcadores moleculares que possam ser úteis na identificação e seleção de características de interesse.

Não é possível identificar marcadores de microssatélites associados à característica de resistência à fusariose com estes locos de microssatélites de arroz aplicados na análise dos genótipos de trigo.

6 Referências

ALMEIDA, Ângela Bonfoco de. **Identificação e caracterização de fontes de resistência à ferrugem da folha em *Triticum tauschii* Coss. Schmal.** 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

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

ANDERSON, J. A.; STACK, R. W.; LIU, S.; WALDRON, B. L.; FJELD, A. D.; COYNE, C.; MORENO-SEVILLA, B.; FETCH, J. M.; SONG, Q. J.; CREGAN, P. B.; FROHBERG, R. C. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTL in two wheat populations. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 102, n. 8, p. 1164–1168, 2001.

ARENDDT, Pablo Fernando. **Resistência de genótipos de trigo à brusone.** 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RS. Apassul. Disponível em: <<http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=12&a=details&ID=376>>. Acesso em Abr. 2007a.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RS. Apassul. Disponível em: <<http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=12&a=details&ID=369>>. Acesso em Abr. 2007b.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RS. Apassul. Disponível em: <<http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=12&a=details&ID=368>>. Acesso em Abr. 2007c.

BADAEVA, E. D.; FRIEBE, B.; ZOSHCHUK, S. A.; ZELENIN, A. V.; GILL, B. S. Molecular cytogenetic analysis of tetraploid and hexaploid *Aegilops crassa*. **Chromosome Research**. v. 6, n. 8, p. 629-637, 1998.

BAI, G.; KOLB F. L.; SHANER, G.; DOMIER, L. L. Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. **Phytopathology**. v. 89, n. 4, p. 343–348, 1999.

BAN, T.; SUENAGA, K. Genetic analysis of resistance to Fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum* in Chinese wheat cultivar Sumai 3 and the Japanese cultivar Saikai 165. **Euphytica**. v. 113, n. 2, p. 87-99, 2000.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal Biochemistry**. v. 196, p. 80-83, 1991.

BERZONSKY, W. A.; GEBHARD, B.; L. GAMOTIN, E.; LEACH, G. D.; ALI, S. A reciprocal backcross monosomic analysis of the scab resistant spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar, 'Frontana'. **Plant Breeding** v. 126, n. 3, p. 234–239, 2007.

BONOW, Sandro. **Caracterização morfológica, isoenzimática e molecular de cultivares de arroz**. 2004. 132f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BOTTALICO, A.; PERRONE, G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. **European Journal of Plant Pathology**. v. 108, n. 7, p. 611-624, 2002.

BOUCK, A.; VISION, T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. **Molecular Ecology**. v. 16, n. 5, p. 907-924, 2007.

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

BRUNNER, S.; FENGLER, K.; MORGANTE, M.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. **Plant Cell**. v.17, n. 2, p. 343–360, 2005.

BUERSTMAYR, H.; LEMMENS, M.; HARTL, L.; DOLDI, L.; STEINER, B.; STIERSCHNEIDER, M.; RUCKENBAUER, P. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). **Theoretical and Applied Genetics**. v. 104, n. 1, p. 84–91, 2002.

CAUSIER, B.; KIEFFER, M.; DAVIES, B. MADS-box genes reach maturity. **Science**, Washington, v. 296, n. 5566, p. 275-276, 2002.

CHEN, X.; FARIS, J. D.; HU, J.; STACK, R. W.; ADHIKARI, T.; ELIAS, M. E. Saturation mapping of a major *Fusarium* head blight resistance QTL in tetraploid wheat. **Molecular Breeding**. v. 19, n. 2, p.113–124, 2007.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/TrigoSerieHist.xls>>. Acesso em: Out. 2007.

COOPERATIVA CENTRAL DE PESQUISA AGRÍCOLA. Coodetec. Disponível em: <<http://www2.coodetec.com.br/coodetec/produto.action?culturald=4&produtold=11>>. Acesso em Mai. 2007. cd111

DILL-MACKY, R.; JONES, R. K. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. **Plant Disease**. v. 84, n. 1, p. 71-76, 2000.

D'MELLO, J.P.F. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science Technology**. v. 80, n. 3-4, p. 183-205. 1999.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** , v.1, p.13-15, 1991.

DVORAK, J.; DITERLIZZI, P.; ZHANG, H. B.; RESTA, P. The evolution of polyploid wheats - identification of the A-genome donor species. **Genome**. v. 36, n. 1, p. 21-31, 1993.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Embrapa. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/noticias/2007/not0723.htm>>. Acesso em: Jul. 2007a.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Embrapa. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/cultivares/c_tr194.htm>. Acesso em Mar. 2007b.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Embrapa. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/cultivares/c_tr49.htm>. Acesso em Mar. 2007c.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Embrapa. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/cultivares/c_tr23.htm>. Acesso em Mar. 2007d.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Embrapa. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/cultivares/c_tr177.htm>. Acesso em Mar. 2007e.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Embrapa. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/cultivares/c_tr179.htm>. Acesso em Mar. 2007f.

FEDERIZZI, L. C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. Marcadores moleculares em plantas. UFRGS, Porto Alegre., 1998. 141 p

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.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1995. 220 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2. ed. Brasília: EMBRAPA- CENARGEM, 1998. 220 p.

FU, H. H.; DOONER, H. K. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 99, n. 14, p. 9573–9578, 2002.

FUNDAÇÃO CENTRO DE EXPERIMENTAÇÃO E PESQUISA FECOTRIGO. Fundacep. Disponível em: <<http://www.fundacep.com.br/sessao.php?sessao=20&PHPSESSID=52d848cee18e20804b245c1afbca2028>>. Acesso em Mai. 2007. cep40

GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J., TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science.** v. 42, n. 6, p. 2128–2136, 2002.

GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Plant comparative genetics after 10 years. **Science.** v. 282, n. 5389, p. 656-659, 1998.

GARCIA, JÚNIOR D.; VECHIATO, M. H.; MENTEN, J. O. M.; LIMA, M. I. P. M. Influência de *Fusarium graminearum* na germinação de genótipos de trigo (*Triticum aestivum* L.). Arquivos do Instituto Biológico. v. 74, n. 2, p. 157-162, 2007.

GUPTA, P.K. RUSTGI, S.; SHARMA, S.; SINGH, R.; KUMAR, N.; BALYAN, H. S. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. **Molecular Genetics and Genomics.** v. 270, n. 4, p. 315-323, 2003.

JAUHAR, P. P. Alien gene transfer and genetic enrichment of bread wheat. In: DAMANIA, A. B. (Ed.). **Biodiversity and wheat improvement.** Chichester: John Wiley & Sons / ICARDA / Sayce, 1993. Part.3, p. 103-119.

KLAHR A; ZIMMERMANN, G; WENZEL, G; MOHLER, V. Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on the detection of QTLs for resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat cross. **Euphytica.** v. 154, n. 1-2, p. 17-28, 2007.

KORZUN V, EBMEYER E. Molecular markers and their applications in wheat breeding. In: Pogna NE, Romano M, Pogna EA, Galterio G (eds) **Proceedings of the 10th International Wheat Genetics Symposium**, Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Rome, Italy, v.1, p.140–143, 2003.

KULEUNG, C.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye and triticale. **Theoretical and Applied Genetics.** v. 108, n. 6, p. 1147–1150, 2004.

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

LANDJEVA, S.; KORZUN, V.; BORNER, A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. **Euphytica**. v. 156, n. 3, p. 271-296, 2007.

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

LIMA, M. I. P. M.; FERNANDES, J. M. C.; PICININI, E. C. Avaliação da resistência à giberela em trigo. **Fitopatologia Brasileira**. v. 25, p. 30-35, 2000.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a unicleotide repeat within the cardiac musclection gene. **Annual Journal Human Genetics**., v. 44, n. 3, p. 397-401,1989.

LUZ, W. C. Manejo integrado de doenças de trigo no século XXI. **Fitopatologia Brasileira**. v.28 (Suplemento):S101-S109. 2003.

MALONE, Gaspar. **Estudos fisiológicos e moleculares da germinação e vigor de sementes em arroz vermelho**. 2006. 102f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MARDI, M.; BUERSTMAYR, H.; CHAREYAZIE, B.; LEMMENS, M.; MOHAMMADI,S. A.; NOLZ, R.; RUCKENBAUER, P. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a ‘Wangshuibai’-derived population. **Plant Breeding**. v. 124, n. 4, p. 329–333, 2005.

MCLAUHLAN, A.; HENRY, R. J.; ISAAC, P. G.; EDWARDS, K. J. Microsatellite analysis in cultivated hexaploid wheat and wild wheat relatives. In: **Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants**, Vol. (ed. RJ Henry) CABI, Oxford UK, 2001. p. 147-159.

MCMULLEN, M.; JONES, R.; GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. **Plant Disease**. v. 81, n. 12, p. 1340-1348, 1997.

MESTERHAZY, A. Types and components of resistance to fusarium head blight of wheat. **Plant Breeding**. v. 114, n. 5, p. 337-386, 1995.

MESTERHAZY, A.; BARTOK, T. Control of Fusarium head blight of wheat by fungicides and its effect on the toxin contamination of the grains. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**. v. 49, p. 191-198, 1996.

MESTERHAZY, A. Breeding of resistance to Fusarium head blight of wheat. *In*: Dubin, H.J, Gilchrist, L., Reeves, J. & Mcnab, A. (Eds.). **Fusarium Head Blight**. Mexico. CIMMYT, p.79-85. 1997.

MIEDANER, T.; WILDE, F.; STEINER, B.; BUERSTMAYR, H.; KORZUN, V.; EBMEYER, E. Stacking quantitative trait loci (QTL) for Fusarium head blight resistance from nonadapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 112, n. 3, p. 562–569, 2006.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998a. 141p.

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.

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.; 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. de. Genética e novas biotecnologias no melhoramento de trigo Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 4p.html. (Embrapa Trigo. Documentos Online 4). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do04.htm>. Acesso em: Out. 2007.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. de; 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.

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.

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.

MUNDSTOCK, C. M. **Cultivo dos cereais de estação fria: trigo, cevada, aveia, centeio, alpiste e triticale**. 1.ed. Porto Alegre: NBS, 1983. 265p.

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.

PANISSON, E., REIS, E. M. & BOLLER, W. Quantificação de danos causados pela giberela em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, n. 2, p.189-192, 2003.

PARRY, D.W., JENKINSON, P. & MCLEOD, L. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review. **Plant Pathology**. v. 44, n. 2, p. 207-238, 1995.

PATERSON, A. H.; LIN, Y. R.; LI, S.; SCHERTZ, F.; DOEBLEY, J. F.; PINSON S. R. M.; LIU, S. C.; STANSEL, J. W.; IRVINE, J. E. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. **Science**. v.269, n. 5231, p. 1714–1717, 1995.

PATNAIK, D.; KHURANA, P. Wheat Biotechnology: a minireview. **Electronic Journal. Biotechnology**. v.4, n.15, p.1–29, 2001.

PICININI, E.C. & FERNANDES, J.M.C. Efeito da época de pulverização com fungicidas sobre o controle de *Gibberella zeae* em trigo. Comunicado Técnico, Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2001.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 36., 2004, Passo Fundo. **Atas e resumos da...** Passo Fundo: COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 2004. 36 p. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do38.htm> Acesso em: Novembro de 2007.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 35, 2003, Passo Fundo. **Indicações técnicas da comissão sul-brasileira de pesquisa de trigo-2003**. Passo Fundo, EMBRAPA TRIGO,2003. 120 p.

ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M. C.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; IGLESIAS, C.; TOHME, J. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**. v. 87, n. 11, p. 1647–1655, 2000.

RÖDER, M. S.; PLASCHKE, J.; KONIG, S. U.; BÖRNER, A.; SORRELLS, M. E.; TANKSLEY, S. D.; GANAL, M. W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. **Molecular and General Genetics**. v. 246, n. 3, p. 327–333, 1995.

RUDD, J. C.; HORSLEY, R. D.; MCKENDRY, A. L.; ELIAS, E. M. Host plant resistance genes for Fusarium head blight: sources, mechanisms and utility in conventional breeding systems. **Crop Science**. v. 41, n. 3, p.620–627, 2001.

SAHA, M. C.; MIAN, M. A. R.; EUJAYL, I.; ZWONITZER, J. C.; WANG, L.; MAY, G. D. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 109, n. 4, p. 783–791, 2004.

SAHA, M. C.; COOPER J. D.; ROUF MIAN, M. A.; CHEKHOVSKIY, K.; MAY, G. D. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. **Theoretical and Applied Genetics**. v 113, n. 8, p. 1449-1458, 2006.

SCHEEREN, P.L. **Informações sobre o trigo (*Triticum spp.*)**. Passo Fundo: EMBRAPA – CNPT, 1986. 34p.

SCHAAFSMA, A. W.; TAMBURINC-ILLINCIC, L.; MILLER, J. D.; HOOKER, D. C. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 23, n. 3, p. 279-285, 2001.

SCHMOLKE, M.; ZIMMERMANN, G.; BUERSTMAYR, H.; SCHWEIZER G.; MIEDANER, T.; KORZUN, V.; EBMEYER, E.; HARTL, L. Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 111, n. 4, p. 747–756, 2005.

SHEN, X.; FRANCKI, M. G.; OHM, W. HERBERT. A resistance-like gene identified by EST mapping and its association with a QTL controlling *Fusarium* head blight infection on wheat chromosome 3BS. **Genome**. v.49, n. 6, p. 631-635, 2006.

SORRELLS, M. E.; LA ROTA, M.; BERMUDEZ-KANDIANIS, C. E.; GREENE, R. A.; KANTETY, R. V.; MUNKVOLD, J. D.; MIFTAHUDIN.; MAHMOUD, A.; MA, X.; GUSTAFSON, P. J.; QI, L. L.; ECHALIER, B.; GILL, B. S.; MATTHEWS, D. E.; LAZO, G. R.; CHAO, S.; ANDERSON, O. D.; EDWARDS, H.; LINKIEWICZ, A. M.; DUBCOVSKY, J.; AKHUNOV, E. D.; DVORAK, J.; ZHANG, D.; NGUYEN, H. T.; PENG, J.; LAPITAN, N. L. V.; GONZALEZ-HERNANDEZ, J. L.; ANDERSON, J. A.; HOSSAIN, K.; KALAVACHARLA, V.; KIANIAN, S. F.; CHOI, D. W.; CLOSE, T. J.; DILBIRLIGI, M.; GILL, K. S.; STEBER, C.; WALKER-SIMMONS, M. K.; MCGUIRE, P. E.; QUALSET, C. O. Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. **Genome Research**. v. 13, n. 8, p.1818–27, 2003.

STEINER, B.; LEMMENS, M.; GRIESSER, M.; SCHOLZ, U.; SCHONDELMAIER, J.; BUERSTMAYR, H. Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 109, n. 1, p. 215–224, 2004.

TANG, J. F.; GAO, L. F.; CAO, Y. S.; JIA, J. Z. Homologous analysis of SSR-ESTs and transferability of wheat SSR-EST markers across barley, rice and maize. **Euphytica**. v. 151, n. 1, p. 87-93, 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence

alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

VARSHNEY, R.; SIGMUND, R.; BÖRNER, A.; KORZUN, V.; STEIN, N.; SORRELS, M. E.; LANGRIDGE, P.; GRANER, A. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. **Plant Science**. v. 168, n. 1, p.195–202, 2005.

WILCOXSON, R. D.; BUSCH, R. H.; OZMON, E. A. Fusarium head blight resistance in spring wheat cultivars. **Plant Disease**. v. 76, n. 7, p. 658-661, 1992.

WILDE, F.; KORZUN, V.; EBMEYER, E.; GEIGER, H. H ; MIEDANER, T.; Comparison of phenotypic and marker-based selection for Fusarium head blight resistance and DON content in spring wheat. **Molecular Breeding**. v. 19, n. 4, p. 357–370, 2007.

YANG, Z. P.; GILBERT, J.; SOMERS, D. J.; FEDAK, G.; PROCUNIER, J.D.; MCKENZIE, R. Marker-assisted selection of Fusarium head blight resistance genes in two doubled-haploid populations of wheat. **Molecular Breeding**. v. 12, n. 4, p.309–317, 2003.

YANG, J.; BAI, G. H.; SHANER, G. E. Novel quantitative trait loci (QTL) for Fusarium head blight resistance in wheat cultivar Chokwang. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 111, n. 8, p.1571–1579, 2005.

YU J. K.; DAKE, TM, SINGH, S.; BENSCHER, D.; LI, W. L.; GILL, B.; SORRELLS, M. E. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. **Genome**. v. 47, n. 5, p. 805–818, 2004.

ZHANG, L.Y.; BERNARD, M.; LEROY P.; FEUILLET, C.; SOURDILLE, P. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 111, n. 4, p. 677–687, 2005.

ZHOU, W. C.; KOLB, F. L.; BAI, G. H.; SHANER, G.E.; DOMIER, L. L. Genetic analysis of scab resistance QTL in wheat with microsatellite and AFLP markers. **Genome**. v. 45, n. 4, p.719–727, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)