

**FRANCISCO DE ASSIS FRANCO**

**ESTUDO DA TOLERÂNCIA À GERMINAÇÃO NA PRÉ-COLHEITA E  
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À  
DORMÊNCIA EM SEMENTES DE TRIGO  
(*Triticum aestivum* L.)**

**MARINGÁ  
PARANÁ-BRASIL  
FEVEREIRO – 2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**FRANCISCO DE ASSIS FRANCO**

**ESTUDO DA TOLERÂNCIA À GERMINAÇÃO NA PRÉ-COLHEITA E  
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À  
DORMÊNCIA EM SEMENTES DE TRIGO  
(*Triticum aestivum* L.)**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, na área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ  
PARANÁ-BRASIL  
FEVEREIRO – 2008**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

F825e Franco, Francisco de Assis  
Estudo da tolerância à germinação na pré-colheita e identificação de marcadores moleculares associados à dormência em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) / Francisco de Assis Franco. -- Maringá : [s.n.], 2008.  
105 f. : il., figs.

Orientador : Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim.  
Co-orientador : Prof. Dr. Ronald José Barth Pinto e Prof. Dr. Ivan Schuster.

Tese(doutorado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, 2008.

1. Trigo. 2. Sementes. 3. Tolerância à germinação. 4. Germinação de pré-colheita. 5. Dormência. 6. Marcadores moleculares. 7. Herança. 8. Genes. 9. BSA. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. II. Título.

CDD 21.ed. 633.11

**FRANCISCO DE ASSIS FRANCO**

**ESTUDO DA TOLERÂNCIA À GERMINAÇÃO NA PRÉ-COLHEITA E  
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À  
DORMÊNCIA EM SEMENTES DE TRIGO  
(*Triticum aestivum* L.)**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, na área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2008.

---

Prof. Dr. **Alessandro de Lucca e  
Braccini**

---

Prof. Dr. **Ivan Schuster**

---

Dr. **Luiz Alberto Cogrossi Campos**

---

Prof. Dr. **Ronald José Barth Pinto**

---

Prof. Dr. **Carlos Alberto Scapim**  
(Orientador)

A construção de cada alicerce é feita pela soma de esforços de cada amigo e a obra é o resultado das mãos unidas para o objetivo comum. A todos, estes braços amigos dedico esta conquista que marca a minha vida.

A Deus, por iluminar este trabalho

A minha esposa, pelo amor e dedicação

Aos filhos, Grazielle, Alessandro e Eduardo, pela compreensão

A meus pais, Hipólito e Matilde, *in memoriam*, pela vida

Aos meus sogros, Adolfo e Selma, pelo apoio

*DEDICO.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (PGA) da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

À COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola - pela realização deste projeto de grande importância à triticultura nacional.

Ao Dr. Ivo Marcos Carraro, Diretor Executivo da COODETEC, pelo incentivo e por permitir dedicar parte do meu tempo na realização deste curso.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Scapim, pela amizade e disponibilidade na orientação durante o curso.

Ao professor Dr. Ronald José Barth Pinto, pela amizade e pela dedicação na orientação desse trabalho.

Ao Dr. Ivan Schuster, colega de trabalho, amigo, colaborador, orientador, pelo incentivo e apoio na realização deste trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós Graduação em Agronomia, pela amizade e incentivo na realização do trabalho.

À colega, Elisa Serra Negra e as colegas do Laboratório de Biotecnologia da COODETEC, pela colaboração na análise molecular das plantas das populações de trigo.

Ao colega e amigo Volmir Sergio Marchioro, pela amizade e pelo apoio na elaboração da tese.

Aos amigos e companheiros, Celso Gonçalves de Aguiar e Osmério Pupim Junior, pelo auxílio, motivação e pelas trocas de experiências nestes anos de estudos, viabilizados por meio das viagens para UEM em Maringá.

Aos colegas e amigos, Marco Antônio Roth de Oliveira, Dorival Vicente e Tatiane Della Nora, pelo incentivo na realização dos trabalhos.

Ao colega e amigo Ademar Alves Sobrinho, pelo apoio e incentivo na realização de cada etapa deste trabalho e o Fábio Júnior Alcântara Lima pelo auxílio na obtenção dos dados.

Aos auxiliares de pesquisa do programa de trigo, Carlos Silveira de Oliveira, Paulo Luiz Cordeiro, Ronaldo Ferreira Santos, Paulino Ricardo Ribeiro

dos Santos, Thiago Rafael Sodré e Valdemar Vaz, pelo apoio na obtenção dos dados experimentais.

A Crisleine Thomann Predebon e Joselaine Vigano, pelo auxílio na obtenção dos resultados de germinação.

Aos colegas e amigos de Palotina, Adriel Evangelista e Deuzeni Vassoler, pelo apoio na obtenção dos resultados.

Aos Pesquisadores Dr. Manoel Carlos Bassoi da EMBRAPA Soja e o M.Sc. Lauro Akio Okuyama do IAPAR, pelas sugestões e apoio no desenvolvimento dos trabalhos.

À minha esposa, Isolde Stokmann Franco, pela dedicação aos filhos, abnegação e compreensão neste longo período de noites, feriados e finais de semanas envolvidos nos estudos.

Aos meus filhos Grazielle, Alessandro e Eduardo pelo carinho, apoio e compreensão.

A minha sogra, Selma e ao sogro Adolfo Stokmann, pelo apoio na realização do curso.

Aos meus irmãos e irmãs, por incentivarem e torcerem pela realização do curso.

À cunhada Janete e ao concunhado, Otávio, pelo apoio à família durante o período de estudos.

A todos que de alguma forma, contribuíram positivamente para tornar realidade este trabalho.

A Deus, meu agradecimento maior, pela proteção, pela inspiração, pela força para transpor as dificuldades e pela novas amizades proporcionadas durante a realização do curso.

## BIOGRAFIA

FRANCISCO DE ASSIS FRANCO, filho de Hipólito Franco e Matilde Forgiarini Franco, nasceu em Catuípe, Estado do Rio Grande do Sul, em 04 de outubro de 1951.

Graduou-se em Agronomia, em dezembro de 1976, pela Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, RS.

Em 1977 e 1978, trabalhou com Assistência Técnica por meio da AGROPLAN, nas Regiões próximas à localidade de Catuípe-RS.

A partir de 1979, passou a fazer parte do quadro de funcionários do Departamento de Pesquisa da OCEPAR, trabalhando na Rede de Experimentação e Melhoramento genético de trigo.

Em março de 1983, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, na Área de Concentração Fitotecnia, Setor Plantas de Lavoura, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. A conclusão foi em junho de 1985, com a apresentação da dissertação “Estimativa do progresso genético no rendimento de grãos de trigo e sua associação com diferentes caracteres sob o efeito de variações de ambiente”, orientada pelo Prof. Dr. Fernando Irajá Felix de Carvalho.

Em 1991, assumiu a responsabilidade de coordenar o Programa de Melhoramento de Trigo, em cuja função continuou, após a transformação do Departamento de Pesquisa da OCEPAR em COODETEC-Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, recebendo, a partir de 2005, a responsabilidade de Gerente de Pesquisa de Trigo

Em março de 2004, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá – UEM, concluindo em fevereiro de 2008 com a apresentação da tese “Estudo da tolerância à germinação na pré-colheita e identificação de marcadores moleculares associados à dormência em sementes trigo (*Triticum aestivum* L.)”, sob orientação do professor Dr. Carlos Alberto Scapim.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL</b> .....	<b>3</b>
2.1 Germinação na pré-colheita em trigo .....	3
2.1.1 Regiões com problemas de germinação na espiga .....	3
2.1.2 Germinação na espiga .....	3
2.1.3 Dormência em sementes de trigo .....	5
2.1.4 Controle hormonal da germinação .....	7
2.2 Marcadores moleculares para tolerância à germinação na pré-colheita .....	10
2.2.1 Tipos de marcadores moleculares .....	10
2.2.2 Cor de grão como caráter de tolerância .....	14
2.2.3 Gene de nanismo Rht e a tolerância .....	16
2.2.4 Herança quantitativa da tolerância à germinação .....	17
2.2.5 Locus controladores de caracteres quantitativos (QTLs) envolvidos com tolerância à germinação na espiga .....	18
2.2.6 Marcadores moleculares para dormência .....	19
<b>CAPÍTULO I - Germinação de sementes de 12 cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) colhidas na maturação fisiológica em duas localidades, utilizando o pré- esfriamento para superação da dormência</b> .....	<b>23</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>24</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>25</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 Experimentos .....	29
2.2 Teste de germinação .....	29
2.3 Análise de dados .....	32

<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO II - Identificação de tolerância à germinação na pré-colheita em cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) colhidas na maturação fisiológica em duas localidades.....</b>	<b>45</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>46</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>47</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
2.1 Caracterização de cultivares de trigo quanto à dormência das sementes .....	51
2.2 Simulação de chuva na pré-colheita .....	51
2.3 Análise de dados .....	54
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO III – Avaliação da herança e de marcadores moleculares para a resistência à germinação na pré-colheita em trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) .....</b>	<b>65</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>66</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>67</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
2.1 Material genético .....	70
2.2 Análise fenotípica .....	71
2.3 Purificação de DNA e análise com marcadores moleculares .....	73
2.4 Análise de dados .....	76
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>
<b>6 ANEXOS .....</b>	<b>102</b>

## RESUMO

FRANCO, Francisco de Assis, D.S. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro 2008. **Estudo da tolerância à germinação na pré-colheita e identificação de marcadores moleculares associados à dormência em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.)**. Professor Orientador: Dr Carlos Alberto Scapim. Professores Conselheiros: Dr Ronald José Barth Pinto e Dr Ivan Schuster.

A germinação, na pré-colheita em cultivares de trigo, tem causado acentuadas perdas de produção e de qualidade da farinha para a indústria de produtos alimentícios. Para avaliar as diferenças de tolerância à germinação, foi programado um experimento em Palotina e outro em Cascavel (PR), com 12 cultivares de trigo. Na identificação de marcadores moleculares, foi programado um experimento com as populações  $F_{2:3}$ , oriundas dos cruzamentos Frontana/OCEPAR 18 e Frontana/CD 105 e os genitores. As espigas para as avaliações foram colhidas quando as plantas estavam em maturação fisiológica. As sementes de espigas debulhadas foram utilizadas para os testes de potencial de germinação com e sem tratamento de pré-esfriamento para a superação da dormência. Para os testes em um sistema de chuva artificial, foram utilizadas amostras de 10 espigas. Após encerrado o período de molhamento, foram realizadas leituras pela escala de notas de 1 a 11 para a avaliação de cultivares e populações segregantes. As sementes que não germinaram foram submetidas ao teste de tetrazólio para confirmar a existência de dormência. As cultivares Frontana e IAPAR 53 apresentaram o menor percentual de sementes germinadas e um maior número de sementes dormentes. Nas avaliações em espigas, as cultivares Frontana, IAPAR 53, ONIX, CD 108 e IPR 85 apresentaram o melhor nível de tolerância. Na análise geral de todas as características avaliadas, o 'Frontana' aparece com o melhor mecanismo de dormência para ser utilizado no melhoramento genético. A utilização de notas visuais de germinação na espiga mostrou ser critério eficiente, ao permitir a realização das avaliações em um expressivo número de cultivares com rapidez, sem comprometer os resultados de seleção dos

genótipos mais tolerantes. As avaliações das populações segregantes revelaram a existência de um gene recessivo, com efeito epistático sobre dois genes dominantes com ação duplicada, envolvidos com o controle da dormência na pré-colheita em trigo. As avaliações dos marcadores moleculares possibilitaram identificar a associação do marcador Xbarc170 com o gene recessivo de dormência de sementes. Este marcador molecular poderá ser utilizado em um programa de melhoramento para eliminar as plantas suscetíveis e aumentar a probabilidade de obtenção tolerância à germinação na pré-colheita em trigo. Novos estudos deverão ser programados para identificar os outros dois genes dominantes envolvidos com a tolerância à germinação.

**Palavras-chave:** trigo, sementes, germinação de pré-colheita, tolerância à germinação, dormência, herança, genes, BSA e marcadores moleculares.

## ABSTRACT

FRANCO, Francisco de Assis, D.S. Universidade Estadual de Maringá, february 2008. **Study of pre-harvest sprouting tolerance and identification of molecular markers associated to seed dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.)**. Adviser: Dr. Carlos Alberto Scapim. Co-adviser: Dr. Ronald José Barth Pinto e Dr Ivan Schuster.

The pre-harvest sprouting in wheat cultivars have done great losses in the production end in the brand quality for aliment industries products. In order to evaluate the pre-harvest sprouting tolerance of twelve wheat cultivars, two experiments were carried out, one in Palotina and another in Cascavel (State of Paraná, Brazil). And to identify molecular markers for pre-harvest sprouting tolerance was carried out one experiment in Cascavel with F<sub>2:3</sub> populations derived from two crosses (Frontana/OCEPAR 18 and Frontana/CD 105) and parental lines. Analyzed ears were harvested from plants in physiological maturation. Seeds of threshed ears were used to test the sprouting potencial with and without precooling used to surpass dormancy. For the tests on the system of artificial rain ten samples of ears were used. After closing the wet period, in the evaluation of the cultivars and the segregating populations, were realized reads on a 1-11 scale notes were applied. The seeds that didn't sprout were subjected to a tetrazolium test to confirm the existence of dormancy. The Frontana and IAPAR 53 cultivars showed the smallest sprouted seeds percentage and a higher number of seeds dormancy. The Frontana, IAPAR 53, ONIX, CD 108 and IPR 85 cultivars, on the spike evaluation were the ones with best level of tolerance. In general analysis of all the evaluated features, Frontana is the cultivar with the best dormancy mechanism to be used in the genetic breeding. The grades criteria of sprouting in the ears permitted valuations in many cultivars and it could be done very fast, without affecting the results of more tolerant genotypes selection. The evaluation of the segregating populations revealed the existence of one recessive gene with epistatic effect over two dominant genes with duplicate action, involved with pre-harvest

dormancy control. The evaluation of molecular markers possibiled the identification of marker Xbarc170 associated with the recessive gene of seed dormancy. This molecular marker could be used on the genetic breeding program to eliminate the susceptible plants and increase the probability of obtention of the pre-harvest sprouting tolerance in wheat. Other work could be planned to identify the others two dominant genes envolved with sprouting tolerance.

**Keywords:** wheat, seeds, pre-harvested sprouting, sprouting tolerance, dormancy, inheritance, genes, BSA and molecular markers.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A importância do trigo na alimentação humana levou as instituições brasileiras de pesquisa a direcionarem seus programas de melhoramento na busca de maior potencial de produtividade, qualidade industrial, resistência às doenças e tolerância à germinação na espiga. Muitas tecnologias foram geradas e possibilitaram marcantes avanços na triticultura. Contudo, no período de maturação do trigo, as condições ambientais favoráveis à germinação na espiga têm causado acentuadas perdas na produção da farinha a ser utilizada para a obtenção dos diferentes produtos usados na alimentação.

A germinação na espiga causa diminuição do peso hectolítrico e reduz o rendimento de grãos. Pode ainda causar danos à qualidade da farinha, pelo desencadeamento de reações enzimáticas iniciais do processo de germinação. Além das perdas em produção, a germinação no campo origina um produto de baixo valor industrial e de difícil comercialização.

A germinação na espiga é mais freqüente em anos nos quais a maturação do trigo coincide com períodos quentes e chuvosos, provocando a germinação dos grãos antes da colheita. O problema é ainda mais grave porque a suscetibilidade à germinação na espiga encontra-se presente em muitas cultivares em cultivo no Brasil, e está relacionada à base genética, utilizada nos programas de melhoramento.

A necessidade de ser obtida mais de uma geração por ano, para acelerar o processo de melhoramento, contribuiu para que as cultivares com problemas de germinação na espiga não fossem descartadas ao longo do tempo. O melhoramento genético direcionado para incorporar a tolerância à germinação teve poucos avanços desde a década de 1990. Os mecanismos introduzidos para formar barreiras à germinação não foram suficientemente fortes para manter a tolerância e evitar os problemas com a produção e comercialização do trigo.

Nos anos em que as condições ambientais de temperatura e umidade são propícias à germinação na espiga em trigo, ocorrem perdas significativas

de rendimentos de grãos e de qualidade do trigo. Isso obrigou os programas de melhoramento genético a buscar outras fontes que possam aumentar os níveis de tolerância. Entre os trabalhos desenvolvidos, aparece a dormência como destaque entre as fontes de maior importância para incrementar a tolerância à germinação na espiga dos novos cultivares. Este caráter foi detectado em algumas cultivares de trigo e devido a sua herança relativamente simples, a localização dos genes que controlam a dormência pode ser identificada com auxílio de marcadores moleculares, os quais podem ser posteriormente utilizados em programas de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Alguns locos de marcadores moleculares já foram relatados por estarem proximamente ligados às regiões do cromossomo que controla a dormência.

Este trabalho teve, como objetivo, a identificação de fontes de resistência à germinação na pré-colheita em trigo, analisar populações segregantes de trigo para a tolerância à germinação na espiga, em que a fonte de resistência apresenta dormência das sementes, e mapear ou validar marcadores moleculares ligados aos genes de tolerância à germinação na espiga ou dormência, visando a sua utilização no melhoramento genético.

Por meio deste trabalho, serão testadas as hipóteses:

- a) a dormência é um caráter que confere boa tolerância à germinação na pré-colheita;
- b) existe um QTL de maior efeito para dormência localizado no cromossomo 4AL;
- c) existem marcadores associados à dormência, que podem ser utilizados para seleção assistida por marcadores moleculares.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL**

### **2.1 Germinação na pré-colheita em trigo**

#### **2.1.1 Regiões com problemas de germinação na espiga**

A germinação, na pré-colheita em trigo, atinge áreas de várias partes de regiões produtoras no mundo, principalmente, Norte e Oeste da Europa, Noroeste dos Estados Unidos da América, Norte da Austrália, Oeste da Nova Zelândia, Canadá, África do Sul, Chile, Argentina e Brasil (CUNHA et al., 2004). Na Austrália, em que se produzem somente trigos de cor branca, por possibilitar extração de maior quantidade de farinha, ocorrem grandes perdas por germinação na pré-colheita (DERERA, 1980; FLINTHAM, 2000). No Reino Unido, a germinação na pré-colheita é a principal fonte de danos nas culturas comerciais, com visível germinação dos grãos, sob condições adversas de tempo, durante o período de maturação do trigo (LUNN et al., 2001). Bassoi (2004) ressaltou que, em regiões marítimas, com verão chuvoso, onde cereais de inverno são cultivados, e em regiões subtropicais no sul, onde o trigo de primavera é cultivado durante o inverno, como algumas partes do Brasil, existe alta probabilidade de ocorrência de chuvas, antes e durante a colheita, trazendo como conseqüência a germinação dos grãos na pré-colheita.

#### **2.1.2 Germinação na espiga**

A germinação na pré-colheita é a condição em que a germinação dos grãos na espiga ocorre antes da colheita. Os períodos de chuvas e alta umidade contribuem para a germinação prematura dos grãos. Os danos de germinação na espiga estão diretamente relacionados à temperatura, chuva na colheita, seca no período de maturação dos grãos e interação entre estes com fatores fisiológicos e genéticos (FLINTHAM, 2000; BASSOI, 2004).

A multiplicidade dos componentes envolvidos com a germinação inclui atributos da morfologia das espigas, diferentes riscos fisiológicos inerentes a base genética (FLINTHAM et al., 1999) e diferentes componentes dos grãos (FLINTHAM, 2000). Segundo Bassoi (2002) a germinação na espiga pode ser dividida em fatores físicos e fisiológicos. Os fatores físicos estão relacionado à taxa de infiltração de água no grão, que depende dos componentes constituintes do grão, como conteúdo de fibra, espessura da testa, dureza do grão e conteúdo de proteínas, e a estrutura da planta, como a posição da espiga, glumas que cobrem os grãos, presença de aristas e a forma da espiga. Os fatores fisiológicos que contribuem para a expressão da germinação na pré-colheita estão relacionados a um controle genético. A maioria destes está subordinada a controle genético, que determina a morfologia das espigas, sensibilidade hormonal e inibidores de alfa-amilase (GATFORD, 2004; BERNARD et al., 2005).

Ao analisar tolerância das cultivares de trigo à germinação na espiga, Linhares et al. (1979) concluíram que as amostras das cultivares cultivadas no estado do Paraná apresentaram elevada percentagem de germinação na espiga, confirmando resultados de anos anteriores. Kettlewell e Cooper (1991), em estudos de campo, avaliaram a atividade de alfa-amilase, nos grãos de trigo, na ausência de germinação, e observaram que há relação desta com a taxa de secagem dos grãos e com aplicação do fertilizante nitrogênio. A atividade de alfa-amilase aumentou linearmente com a taxa de secagem de grãos, durante os 3 anos de testes nos campos comerciais. Noda et al. (1994) relataram que a embebição em baixas temperaturas condiciona as células e tecidos do embrião para a germinação e síntese de alfa amilase, superando os efeitos do ácido abscísico (ABA) na dormência.

As avaliações de tolerância à germinação foram realizadas com cultivares de trigo, em diferentes regiões do Brasil, por meio da determinação de grãos germinados e não germinados (REIS e CARVALHO, 1989; FRANCO et al., 1996; TONON, 2001; ROSA, 1999; BASSOI, 2002) e do índice de queda ou *falling number*, que mede a atividade de alfa-amilase (TONON, 2001; ROSA, 1999; BASSOI, 2002), possibilitaram caracterizar diferenças acentuadas entre as bases genéticas de cultivares dos programas de melhoramento regionais.

### **2.1.3. Dormência em sementes de trigo**

Entre os diferentes mecanismos controladores de germinação, podem ser considerados os sistemas de dormência, sistemas de controle de entrada de água no interior da semente, sistemas de controle do desenvolvimento do eixo embrionário e o sistema de controle do equilíbrio entre substâncias promotoras e inibidoras de crescimento. A expressão da dormência nos cereais ocorre quando as sementes, morfológicamente maduras e sadias, não germinam quando colocadas sob condições adequadas de umidade, temperatura, luz e oxigênio (BEWLEY e BLACK, 1985; POPINIGS, 1985; HILHORST, 1995; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; CASTRO et al., 2004). A dormência é geneticamente programada para desenvolver junto à semente, como parte integrante da maturação, concomitante com o desenvolvimento de outros processos, especialmente, com o aumento da matéria seca e redução do teor de água (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; CASTRO et al., 2004).

As glumas do trigo podem representar mecanismos relacionados com a tolerância, por conter inibidores que podem afetar o processo germinativo (DERERA et al., 1977; SIMPSON, 1990; KIGEL e GALILI, 1995; HIMI et al., 2005; GATFORD, 2004) ou por dificultarem a passagem de água para o grão (MARES, 1983a; LIU et al., 1996; KING e WETTSTEIN, 2000; GATFORD, 2004). A dormência das sementes pode ser causada por bloqueios físicos, representados pelo tegumento resistente e a impermeabilidade, que impede a absorção de água e oxigenação do embrião (KIGEL e GALILI, 1995; CASTRO et al., 2004; GATFORD, 2004). Mas, a ausência de dormência pode resultar na germinação prematura das sementes, quando expostas à alta umidade próxima ao período de maturação fisiológica (PATERSON e SORRELS, 1990; SIMPSON, 1990; KIGEL e GALILI, 1995; HILHORST, 1995).

As sementes recém-colhidas, ainda úmidas, apresentam capacidade de germinação inferior as que exibem quando submetidas previamente à secagem. Provavelmente, durante o período de perda de água, ocorrem processos essenciais à germinação (BEWLEY e BLACK, 1985). Khan (1971) atribuiu às citocininas o equilíbrio hormonal, com a função de anular o efeito dos inibidores, permitindo as giberilinas exercerem os efeitos estimuladores.

Para Castro et al. (2004), a quebra da dormência está relacionada a fatores internos e externos à semente. Se forem adotadas todas as condições necessárias à germinação, e mesmo assim esta não ocorre, existe forte possibilidade de haver algum tipo de bloqueio. Segundo Popinigs (1985), os principais métodos para superar a dormência de sementes de gramíneas, são: o rompimento da cariopse, tratamento com nitrato de potássio, exposição à luz, emprego de temperaturas alternadas, aplicação de pré-esfriamento, aumento da tensão de oxigênio e tratamento com hormônios (giberilinas e citocininas).

A temperatura é um fator que tem influência na expressão da dormência nas sementes de trigo, durante o enchimento dos grãos e após a maturação. Em trabalho desenvolvido para avaliação da dormência, Belderock (1976) encontrou correlação positiva entre a baixa dormência e a alta temperatura após a maturação. A dormência das sementes é induzida pela baixa temperatura, durante o período de enchimento de grão, porém a baixa temperatura também é efetiva para romper a dormência na maturação (REDDY et al., 1985). Yanagisawa et al. (2005) destacaram que temperaturas abaixo de 15<sup>o</sup>C, combinadas com chuva antes da colheita, aceleram os danos de germinação na pré-colheita. Estes autores conseguiram sucesso por meio do melhoramento para à dormência mais acentuada; pois, mesmo com contínuo tratamento com chuva e temperatura abaixo de 15<sup>o</sup>C, os novos genótipos expressaram baixa atividade de alfa amilase, mantendo o índice de queda acima de 300 segundos.

Várias metodologias foram desenvolvidas para caracterizar geneticamente a germinação na espiga. Entre estas, as que merecem destaque são germinadores com alta umidade relativa (WEILENMANN, 1976), simuladores de chuva (McMASTER e DERERA, 1976; REIS e CARVALHO, 1989; OKUYAMA, 2003; BASSOI e FLINTHAM, 2005), com posterior permanência em câmaras (CLARKE, 1983; CLARKE et al., 1984) e imersão das espigas em água alternada com períodos de exposição ao ar e seguido de colocação das espigas envoltas em papel toalha em germinadores com temperatura definida (REIS e CARVALHO, 1989; TONON, 2001; ROSA, 1999; BASSOI, 2002). Para avaliar o nível de germinação, pode ser utilizada a escala de notas (McMASTER e DERERA, 1976; REIS e CARVALHO, 1989;

OKUYAMA, 2003), a determinação de grãos germinados e não germinados (McMASTER e DERERA, 1976; FRANCO et al., 1996; ROSA, 1999; TONON, 2001; BASSOI, 2002), medidas diretas e indiretas da atividade da enzima alfa-amilase por meio de espectrofotometria (MARES, 1983a e 1996) e índice de queda (ROSA, 1999; TONON, 2001; BASSOI, 2002).

Sodkiewicz (2002), ao analisar linhas do trigo diplóide *Triticum monococcum* var. *Monococcum* ( $A^m A^m$ ), detectou altos índices de resistência à germinação na espiga, o que possibilitou incrementos na tolerância de linhas de triticales oriundas do cruzamento interespecífico entre estas espécies. Andreoli et al. (2006), ao analisarem o controle genético da dormência e da germinação precoce do trigo em população  $F_2$ , concluíram que a dormência parece ser recessiva, havendo o envolvimento de dois genes, controlando a dormência da semente de trigo. Osa et al (2003) constataram que o principal componente da variação genética da germinação na pré-colheita de trigo parece ser o grau de dormência, que necessita ser avaliado como mecanismo de possível transferência, por meio de marcadores moleculares, para outras cultivares.

#### **2.1.4 Controle hormonal da germinação**

O controle da germinação está relacionado ao nível endógeno de ácido giberélico (GA), regulador de desenvolvimento de planta, e do inibidor ácido abscísico (ABA). King (1989) constatou que todos os efeitos de ABA, na dormência têm sido completados antes da maturação. De acordo com Jacobsen e Beach (1985), o controle da síntese da alfa-amilase tem sido atribuído ao ABA, sendo capaz de inibir os efeitos da giberilina, em nível de transcrição gênica, e afetar a estabilidade de mRNAs de alfa-amilase, reduzindo a produção desta enzima.

Segundo Simmons (1987), o nível de ABA embriônico foi similar nas cultivares suscetíveis, mas tendo, aproximadamente, 25% a menos do que as cultivares resistentes à germinação. Grandes diferenças foram encontradas em sensibilidade ao ABA, medida como capacidade de bloquear à germinação embriônica, inibindo mais eficientemente a germinação nas cultivares

resistentes à germinação. O nível da ABA foi duas a três vezes maior no embrião, do que no restante das partes do grão de trigo, até a maturação. Segundo Hilhorst (1995), a ação do ABA na regulação da dormência não é restrita ao embrião, mas também aos tecidos do endosperma e às paredes das células. A maior taxa de ABA foi encontrada no máximo peso de grãos e decresceu, rapidamente, a medida que os grãos começaram a secar e reduzir o peso úmido. Ocorreu uma coincidência dos eventos de desenvolvimento dos grãos, de maturação e redução da umidade, com a expressão da dormência.

Para Zentella et al.(2002), o ABA induz a formação de uma proteína quinase, a *PKABA<sub>1</sub>*, que inibe a transcrição gênica das enzimas hidrolíticas e paralisa o processo de degradação. Em cereais, observou-se a presença de proteínas inibidoras de alfa-amilase, sendo ativas principalmente contra enzimas endógenas, para evitar a degradação precoce e inapropriada das reservas de amido (SIMPSON, 1990; KIGEL e GALILI, 1995; CASTRO et al., 2004).

O crescimento e desenvolvimento vegetal são processos regulados por vários tipos de hormônios. Lenton e Appleford (1991) demonstraram um modelo da origem da produção de GA<sub>1</sub> e GA<sub>2</sub> no embrião e sua difusão no endosperma. O acréscimo de GA, durante a germinação, estava associado com a iniciação da transcrição do gene de alfa amilase no escutelo e no endosperma, como estímulo do desenvolvimento do embrião para a remobilização das reservas.

Para Taiz e Zeiger (2000), o grupo de hormônios caracterizados como giberilinas (GAs), desempenha importantes funções em vários fenômenos fisiológicos. A biossíntese de giberilina está sob controle genético e tem função na regulação de vários processos fisiológicos, incluindo a germinação de sementes e a mobilização das reservas do endosperma. Castro et al. (2004) relataram que as reservas do endosperma, depositadas em células mortas, exigem a colaboração de tecidos adjacentes para mobilização do amido, pela ausência das enzimas necessárias para a degradação, por não estarem presentes, inativas ou ligadas aos grânulos de amido.

Durante a germinação, são produzidas enzimas alfa amilases em tecidos, por células vivas, secretadas para o endosperma pelo escutelo e

camadas de aleurona. A indução da síntese de enzimas alfa-amilase está relacionada, principalmente, com a disponibilidade do ácido giberélico(GA), produzido pelo eixo embrionário e difundido até o escutelo e a camada de aleurona, onde atua como ativador primário (KIGEL e GALILI, 1995; TAIZ e ZEIGER, 2000; CASTRO et al., 2004). Pode haver também outros controles que precisam ser considerados e que podem ser relevantes no processo de catabolismo de reserva.

Vários processos fisiológicos estão envolvidos com o início da germinação, que podem contribuir para a diferença na embebição de água pela semente e na expressão da germinação. Zanetti et al.(2000) relataram que o índice de queda (FN) e a atividade de alfa-amilase (AA) são indicadores de degradação de amido, antes do aparecimento dos sintomas visíveis da germinação. As giberelinas promovem a produção de várias enzimas hidrolíticas envolvidas na solubilização das reservas do endosperma, sendo a principal a alfa-amilase. Segundo Taiz e Zeiger (2000), as giberelinas são sintetizadas pelo embrião e liberadas no endosperma amiláceo, por meio do escutelo. Difundem-se para a camada de aleurona, cujas células são induzidas a sintetizar e a secretar alfa-amilase e outras hidrolases no endosperma. O amido e outras macromoléculas são degradados a moléculas menores, transformando-se em solutos do endosperma, que são absorvidos pelo escutelo e transportados para o embrião em crescimento.

Lunn et al.(2001) estudaram a freqüência e os mecanismos de quatro modos de acúmulo de alfa-amilase em trigo, no campo e em laboratório, no Reino Unido. A freqüência da atividade de alfa-amilase, da maior para a menor, ocorreu para a germinação após maturação (PoMS), atividade na pré-maturação (PMAA), germinação na pré-maturação (PrMS) e alfa-amilase retida no pericarpo (RPAA). Segundo os autores, o desenvolvimento dos grãos de trigo expressou duas principais famílias de isoenzimas alfa-amilase, denominadas de *alfa-Amy-1* e *alfa-Amy-2*. A *alfa-Amy-2* é encontrada em alta concentração no pericarpo de grãos verdes, progressivamente degradada no desenvolvimento dos grãos e detectada em baixo nível no pericarpo, na maturação, embora também possam ser produzidas pelo embrião nos processos de germinação.

Tjin Wong Joe et al. (2005) identificaram várias amostras da cultivar de trigo de inverno Rialto com alta atividade de  $\alpha$ -amilase, na ausência aparente de germinação na espiga, e concluíram que este genótipo é suscetível na pré-maturação. Os autores sugeriram a utilização de avaliação visual e química para identificar cultivares que tenham problemas de germinação nos grãos ou de alta atividade de  $\alpha$ -amilase. A transdução de sinal da giberelina, em célula de aleurona, parece envolver proteínas como intermediários na rota de transdução de sinal da giberelina, levando a produção do fator que induz a transcrição do gene de alfa-amilase, responsável pela degradação das reservas para a germinação (TAIZ e ZEIGER, 2000).

Felício et al. (2002) determinaram redução de rendimento de grãos e aumento dos teores de alfa-amilase, na terceira época de colheita, em virtude da degradação dos grãos expostos ao tempo. Os genótipos mais resistentes à germinação na espiga apresentaram baixa atividade de alfa-amilase. Entre as enzimas envolvidas na germinação, as *alfa-Amy-1*, também denominadas de malte ou enzimas de germinação, são produtos primários da germinação e da pré-colheita, mas podem ser formadas sem visível germinação (KIGEL e GALILI, 1995; LUNN et al., 2001). O excesso de atividade de alfa-amilase interfere na qualidade dos produtos derivados da farinha de trigo, por haver hidrólise enzimática do amido durante o processo de fabricação, gerando como resultado um produto indesejável para consumo.

De acordo com vários trabalhos (SIMPSON, 1990; KIGEL e GALILI, 1995; TAIZ e ZEIGER, 2000; BASSOI e FLINTHAM, 2002; BASSOI, 2004; MRVA et al., 2006), diferentes taxas de secagem, influenciadas pela temperatura, tempo e umidade relativa, promovem diferenças na produção de alfa-amilase e germinação do embrião. Os outros inibidores que podem ter efeitos durante enchimento dos grãos, como o componente albuminas, catequininas e taninos, citocininas e auxinas, têm pouca importância na elucidação dos fenômenos envolvidos com a germinação.

## **2.2 Marcadores moleculares para tolerância à germinação na pré-colheita**

### **2.2.1 Tipos de marcadores moleculares**

Os primeiros trabalhos realizados para identificar a presença de genes estavam baseados na associação destes com caracteres morfológicos, de fácil identificação visual, mas com número reduzido de marcadores fenotípicos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Segundo Sakiyama (1993), o termo marcador é utilizado para designar fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos, passíveis de serem identificados, que permitem o estudo comparativo de genótipos e de suas progênes. Marcadores moleculares são polimorfismos na seqüência nucleotídica do DNA existentes entre indivíduos. Quando localizados próximos a genes de interesse, a presença de tais polimorfismos pode ser utilizada para inferir sobre os genes através de estudos de co-segregação (SCHUSTER e CRUZ, 2004). Segundo Dudley (1993), o sucesso do uso da tecnologia de marcadores moleculares é dependente da disponibilidade de um grande número de marcadores altamente polimórficos e de uma estreita relação de ligação entre o loco marcador e o caráter de interesse. Um marcador ideal deve ser polimórfico entre os parentais e apresentar segregação mendeliana para essa população.

Segundo citado por Caixeta et al. (2006), os primeiros marcadores foram as isoenzimas. Posteriormente, foram desenvolvidos o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTSTEIN et al., 1980; GRODZICKER et al., 1974; VSOLOMON e BODMER, 1979), o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), os microssatélites (LITT e LUTY, 1979; TAUTZ, 1989; WEBER e MAY 1989) e o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (VOS et al., 1995).

As variações genéticas entre cultivares podem ser medidas por diferentes alelos em um loco, que determina a existência de variante genética, referida como um polimorfismo. O grande desafio dos geneticistas moleculares é detectar e marcar as variações presentes nas fitas de DNA. No início dos anos 70, surgiu o primeiro tipo de marcador molecular, que permitiu detectar as diferenças entre indivíduos diretamente no DNA (GRODZICKER, 1974). Esses marcadores, denominados de RFLP, segundo citado por Caixeta et al. (2006), surgiram após a descoberta das enzimas de restrição por Linn e Arber (1968) e Melson e Yuan (1968). A técnica de RFLP para detectar variações entre indivíduos ou polimorfismo está baseada na criação ou eliminação de sítios de restrição, devido à substituição, modificação de pares de bases ou rearranjo de

segmentos de DNA. Para Caixeta et al. (2006), as principais vantagens dos marcadores RFLP são a sua expressão co-dominante, que possibilita distinguir os indivíduos homozigotos dos heterozigotos, a possibilidade de extrair o DNA de qualquer tecido e apresentar resultados estáveis e reproduzíveis entre laboratórios. Os fatores que restringem o uso desta técnica são o processo caro e laborioso, que requer investimentos de equipamentos químicos e cuidados com sondas radioativas.

O pesquisador Kery Mullis descobriu a reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR), que é um processo simples de multiplicar em escala exponencial a quantidade de DNA (MULLIS et al., 1986). Esta técnica é automatizada pelo uso de termociclador e de uma enzima Taq DNA polimerase, programada para executar ciclos com temperaturas alternadas, envolvendo ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. O fragmento deve apresentar dois sítios complementares aos *primers* presentes em fitas opostas do DNA, gerando ampliações em progressão geométrica. É necessário encontrar *primers* específicos para que a seqüência alvo, obtida por clonagem e seqüenciamento, ocorra apenas no gene desejado. Os trabalhos de aplicação da PCR com *primers* específicos foram relatados para a diagnose molecular de doenças causadas por vírus e bactéria (GONÇALVES e ROSATO, 2002), fungos e nematóide (KONSTANTINOVA et al., 2002). A PCR específica pode ser utilizada em análise de pureza de sementes, detecção de transgênicos e detecção de genes específicos (MILACH, 1998; SCHUSTER e OLIVEIRA, 2006).

Williams et al. (1990), através da técnica da RAPD (*Randon Arbitrarily Primed*), propuseram a utilização de uma seqüência arbitrária para os *primers*, o que elimina a necessidade do conhecimento prévio dos fragmentos. As fontes moleculares do polimorfismo, geradas por estes marcadores, podem ser mutações de ponto de sítio de pareamento de *primers*, deleções e inserções entre dois sítios de pareamento de *primers*. Os marcadores RAPD não permitem distinguir indivíduos heterozigotos. Neste caso, a ausência de banda no gel é atribuída ao genótipo recessivo, enquanto que a presença da banda é atribuída aos genótipos homozigoto dominante e o heterozigoto. As vantagens são rapidez na obtenção dos dados, a simplicidade, custo reduzido e a aplicabilidade a qualquer tipo de indivíduo. A baixa confiabilidade nos

marcadores RAPD está relacionada à dificuldade de reprodutividade dos resultados e por requerer certa experiência por ser bastante sensível a pequenas modificações nas concentrações dos componentes da reação.

Segundo Caixeta et al. (2006), os marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*) são DNA de seqüência curta, 200 a 500 pares de bases, e de cópia única, que podem ser identificados mediante amplificação via PCR ou hibridização. Os SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) são seqüências de DNA genômico localizados em um loco definido geneticamente, que são identificados por amplificações via PCR, utilizando um par de *primers* específico. O STS é a conversão de RFLP em marcadores baseado em PCR. As extremidades das sondas, para detectar fragmentos RFLP, são seqüenciadas amplificando os fragmentos polimórficos de interesse e as informações utilizadas para desenhar pares de *primers* específicos, complementares a essa seqüência (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 2006). Estes marcadores podem também ser desenvolvidos a partir de seqüências derivadas de bibliotecas de DNA, depositadas em bancos de dados. Os marcadores STS utilizam oligonucleotídeos que se baseiam em alto grau de conhecimento de seqüência, com a grande vantagem de distinguir homozigotos de heterozigoto. Estes são mais reproduzíveis que RAPDs, por utilizar *primers* de seqüências mais longas. Contudo, é necessário o desenvolvimento de pares de *primers* específicos para cada loco.

O procedimento para desenvolver os marcadores STS e SCAR é basicamente o mesmo. Baseia-se no isolamento e clonagem do fragmento de interesse em um vetor, em geral um plasmídeo. Estes pares de *primers* devem passar por testes de validação em reações de PCR, para verificar se amplificam DNAs genômicos da espécie para a qual foram desenvolvidos.

Segundo Caixeta et al., (2006), os genomas dos eucarióticos são densamente povoados por seqüências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. As regiões densamente povoadas no genoma por seqüências simples repetidas de um a seis nucleotídeos são denominadas de microssatélites SSR (*Simple Sequence repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos

de uma mesma espécie. Um microsatélite, quando é amplificado, quase sempre apresenta extensivo polimorfismo para tamanho de bandas.

O polimorfismo na seqüência que flanqueia o microsatélite revelado por alguns pares de *primers* desenvolvidos em feijão, segundo Caixeta et al., (2006), pode ser explicado por deleções e inserções de uma única base ou mesmo de fragmentos longos de DNA em regiões flanqueadoras como fonte de variações dos microsatélites. Cada microsatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo, que combinando com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR, que faz desses marcadores uma eficiente ferramenta.

Os microsatélites são amplamente distribuídos no genoma das plantas superiores. Cardle et al. (2000), analisando seqüências disponíveis de DNA genômico e de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de diferentes espécies de plantas, demonstraram que no genoma é encontrado um microsatélite a cada 6-7 kb. A classe mais abundante e o número de nucleotídeos na unidade repetitiva variam de acordo com a região onde se encontra o microsatélite.

A seleção de plantas com a característica desejada, baseada na identificação direta do genótipo da planta, poderá contribuir para avanço rápido do melhoramento. Os marcadores moleculares foram desenvolvidos para garantir essa segurança na obtenção da característica desejada. Segundo Borém (2006), os marcadores são fragmentos de DNA que permitem a separação de plantas geneticamente diferentes, através de polimorfismo de tamanho de fragmentos de DNA ou pela reação em cadeia da polimerase (PCR). De acordo com o autor, os marcadores moleculares, aliados às técnicas de engenharia genética e de seqüenciamento de genomas, podem revolucionar o melhoramento na obtenção de genótipos superiores.

A seleção assistida por marcadores moleculares e a seleção fenotípica deverão ser utilizadas concomitantemente para obter maior eficiência nos programas de melhoramento (GUIMARÃES et al., 2006). A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) poderá contribuir para o acúmulo de efeitos aditivos de QTLs, permitindo a seleção precoce para diminuir o número de plantas, possibilitando a avaliação de um número maior de progênies.

### **2.2.2 Cor de grão como caráter de tolerância**

Através de análises citogenéticas, Allan e Vogel (1965) e Metzger e Silbough(1970) identificaram no trigo hexaplóide que cada um dos cromossomos 3A, 3B e 3D, funcionalmente equivalentes, apresentava um simples loco R responsável pela cor vermelha do tegumento do grão de trigo, e que a cor vermelha do tegumento é determinada pela presença de apenas um ou mais alelos. Segundo Flintham e Gale (1996), os três locos R foram mapeados geneticamente com marcadores de DNA na região distal, do braço longo do cromossomo 3, nos genomas A, B, D e H. Estas regiões genômicas apresentam extensiva homeologia, carregando um conjunto de genes com similar arranjo das ligações para trigo e cevada.

A resistência à germinação é demonstrada, por Flintham e Gale (1996), nos testes de dormência em linhas isogênicas de trigo de grãos vermelhos e de brancos. Nos testes de germinação, com uma semana após a colheita na maturação, a cultivar NS 67 apresentou mais de 50% de grãos germinados em 4 dias, enquanto a sua linha isogênica, de grão vermelho, apresentou apenas 5%.

O primeiro caso de efeito de gene principal, com herança mendeliana para a dormência, foi detectado por Flintham e Gale (1996), associado à coloração vermelha do grão, controlado pelo fator R triplicado, localizado no braço longo dos cromossomos homeólogos do grupo 3. A dormência é obtida com um simples alelo R dominante, que determina o pigmento de cor vermelha para o grão, mesmo estando na condição de heterozigoto. A obtenção do valor máximo da dormência vai depender do mecanismo genético de acúmulo de múltiplos dominantes, com pequenos efeitos individuais, ou da predominância de um pequeno número de genes com maior efeito. Os resultados de Himi et al. (2002) indicaram que o efeito do gene R não representa a germinação do embrião, mas pode estar estreitamente ligado ao gene que impede a germinação do embrião na maturação. Bassoi e Flintham (2005) utilizaram dados de germinação em espigas maduras, obtidas sob condições artificiais, em um simulador de chuva em três anos. De acordo com os resultados, o efeito da cor do grão teve uma relação forte e significativa com a expressão da tolerância a Phs e, menos acentuadamente, à dosagem dos alelos dominantes.

A variação genotípica residual mostrou que a germinação, na pré-colheita, é também controlada por outros genes.

### **2.2.3 Gene de nanismo Rht e a tolerância**

Em trigo, existe informação de localização de componentes de resistência à germinação, no mapa genético, mas com poucos marcadores morfológicos. Ellis et al. (2002) usaram PCR, baseados em marcadores desenvolvidos, para detectar o ponto de mutações responsáveis por dois dos principais genes de nanismo Rht1 (Rht-B1b e Rht-D1b) em trigo. Estes foram corretamente genotipados, com Rht-B1b e Rht-D1b, com primers específicos, assim como, com marcadores específicos para os alelos das cultivares altas rht-B1a e rht-D1a, para auxiliar a discriminar o mutante. Os marcadores foram mapeados para as regiões esperadas dos cromossomos 4B e 4D, relatadas por Mrva e Mares (1996a) e Flintham et al.(1997). Os dois marcadores estavam fortemente correlacionados com a redução de estatura de planta, explicando 23 a 41% da variância fenotípica da população avaliada, respectivamente, para Rht-B1b e Rht-D1b.

Börner e Worland (2002) também comprovaram a presença dos dois alelos Rht-B1b e Rht-D1b insensíveis ao ácido giberélico que estavam localizados nos cromossomos 4B e 4D. Mrva e Mares (1996a), na caracterização de quatro linhas isogênicas, carregando os alelos Rht, constataram que o efeito mais forte sobre a altura de planta foi para o gene Rht3, que inibiu acentuadamente nova síntese de alfa amilase durante o estágio mais tardio de maturação dos grãos. Taiz e Zeiger (2000) relataram que este gene de nanismo de trigo anão, insensível à giberelina, é capaz de inibir a síntese induzida por giberelina, ocorrendo a produção de pouca alfa amilase, em resposta à giberelina.

Flintham e Gale (1982) relataram que o gene de nanismo Rht3 reduziu 77% o nível de alfa-amilase no campo, indicando uma possibilidade de aumentar resistência à germinação com a utilização deste mecanismo. Entretanto, em outros trabalhos desenvolvidos mais tarde, constataram que os alelos dos genes de nanismo Rht atuam como redutores de atividade de alfa-amilase, sem afetar a germinação (FLINTHAM e GALE, 1996). Kato et

al.(2001), ao analisarem linhas de trigo obtidas de duplo-hapóide, encontraram percentual de germinação de 27 a 100%, mas não detectaram efeito significativo para dormência de semente relacionada ao gene Rht-B1.

#### **2.2.4 Herança quantitativa da tolerância à germinação**

A tolerância à germinação na pré-colheita (Phs) é considerada como caráter quantitativo, dependente da base genética da cultivar, das condições de colheita, secagem e armazenagem, região de cultivo e das interações dos cultivares com ambiente (HAGEMANN e CIHA, 1987; KING, 1993a). Anderson et al. (1993a) mostraram que a tolerância a Phs é expressa como caráter quantitativo, que é influenciada pelas interações genótipo ambiente, caracterizando oito regiões, no genoma de trigo, associadas à resistência. Esta tolerância em trigo é controlada pela interação entre fatores ambientais e genes em múltiplos locos (FLINTHAM, 2000; BASSOI et al., 2006).

Basso (2002) relatou que a herdabilidade do caráter pode possibilitar o melhoramento da resistência à germinação, por ter detectado valores altos, que corresponderam a 69, 74 e 75 %, respectivamente, para as populações derivadas de três cruzamentos entre cultivares trigos nacionais, PG9337/OCEPAR 18, Frontana/OCEPAR 18 e IAPAR 53/OCEPAR 18, envolvendo a base genética da dormência da cultivar Frontana.

Por outro lado, Barnard et al. (2005) citaram que a seleção, para tolerância à germinação na pré-colheita, é difícil devido à baixa herdabilidade do caráter e a tendência de expressar de forma quantitativa. A herança complexa, dependente de condições ambientais e da natureza do fenótipo, causa particular dificuldade para seleção contra a germinação antes da colheita. Contudo, atribuíram também à dormência, citada por Flintham (2000), como excelente mecanismo para seleção com auxílio de marcadores genéticos.

Segundo Flintham et al. (2002), a resistência total aos danos de germinação resulta da combinação de múltiplos fatores, controlando a absorção de água pela espiga, perda de umidade, dormência dos grãos e a taxa de degradação dos componentes durante a germinação. Destes

componentes de resistência, existe mapa genético com a localização dos poucos marcadores morfológicos associados à dormência das sementes. Twardowska et al. (2005), constataram que o acúmulo, em um genótipo, de genes associados marcadores para tolerância a germinação e atividade de alfa-amilase, apresentou substancial acréscimo na resistência à germinação.

### **2.2.5 Locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs) envolvidos com tolerância à germinação na espiga**

A maioria dos QTLs relacionados com tolerância à germinação, na pré-colheita, exercem um controle genético sobre características que determinam a morfologia das espigas, sensibilidade hormonal e inibidores de alfa-amilase (BERNARD et al., 2005). Thomas et al. (1996), ao analisarem o índice de queda de 59 linhas de duplo-haplóide de cevada, conduzidas em um local, encontraram 2 QTLs para este caráter. Zanetti et al. (2000), com avaliações em quatro ambientes, detectaram 12 QTL para índice de queda e 13 para atividade de alfa-amilase (AA). Estes 2 caracteres explicaram mais de 75% da variância fenotípica e revelaram estar extremamente correlacionados ( $r=-0,91$ ). De acordo com o mapa genético obtido na população analisada, o gene de *alfa-amilase-3* está próximo ao QTL de tolerância Phs.

Flintham et al. (1999) argumentaram que o grupo de cromossomo 6 é o mais significativo para o índice de queda, reforçando os resultados de Mather et al. (1997), que detectaram 1 QTL para AA no cromossomo 6H, com a prova de *alfa amylase-1* como marcador, concordando com Anderson et al. (1993b), que encontraram uma região genômica no cromossomo 6BL, associada a Phs em uma das duas populações de trigo analisadas. Flintham (2000) e Warner et al. (2000) detectaram efeitos pleiotrópicos para a cor vermelha de grão e aumento de dormência, sendo a mesma diminuída nos mutantes de grãos brancos, contribuindo para aumentar a dificuldade de obtenção de resistência a germinação para trigos de grãos brancos.

Zanetti et al (2000) detectaram 16 regiões genômicas, que estavam envolvidas na expressão fenotípica da resistência a Phs. Seis QTLs foram encontrados com maior impacto na germinação, sendo que ocorreu uma coincidência do QTL para tolerância Phs com gene candidato envolvido com

dormência . A atividade alfa-amilase é citada como o principal parâmetro envolvido no Phs. Os QTLs, nos cromossomos 3B, 6A e 7B, aumentaram a resistência a Phs, sem efeito da morfologia da espiga. Nos cromossomos 6D e 6B, foram detectados 2 QTLs para Phs, que correspondem ao local dos genes de alfa-amilase 1 (*alfa-Amy-1*) e alfa-amilase 2 (*alfa-Amy-2*), respectivamente. Varshney et al.(2001) realizaram o mapeamento físico de todos os locos conhecidos, localizados nos cromossomos 2DL, 6BS e 7DL, relacionados com conteúdo de proteína e resistência à germinação. Os autores constaram que os locos marcadores foram similares e integraram mapas físicos com 27 marcadores de locos no cromossomo 2DL, 42 no cromossomo 6BS e 54 locos marcadores no cromossomo 7DL, que serão úteis para estudos futuros. E as análises de Kulwal et al. (2005) revelaram que, em 20 dos cromossomos de trigo, foram identificados QTLs, que representavam genes associados à tolerância à germinação na pré-colheita, sendo apenas no cromossomo 1D, não foram identificados genes ligado a este caráter.

### **2.2.6 Marcadores moleculares para dormência**

Muitos genes afetam resistência à germinação, mas a dormência pode estar relacionada a um ou poucos genes. O fator mais importante para obter resistência à germinação na espiga, é a dormência. Cultivares com dormência podem não germinar na espiga, mesmo que ocorram ótimas condições de umidade e temperatura. Marcadores de DNA, ligados a genes envolvidos com dormência, considerado caráter insensível a fatores ambientais, podem ser ferramentas extremamente importantes para o melhoramento de trigo. O progresso alcançado com estudos moleculares, envolvendo marcadores de DNA, possibilitou identificar fatores genéticos, controlando o caráter dormência de semente, sendo que, alguns genes ou regiões nos cromossomos, têm sido identificados no controle da dormência em trigo por estes marcadores moleculares (ANDERSON et al. 1993a; FLINTHAM et al., 1999; ROY et al., 1999; ZANETTI et al., 2000; KATO et al., 2001; MARES et al., 2002).

Anderson et al. (1993b) encontraram 4 regiões genômicas relacionadas a danos de germinação na pré-colheita, em cada uma das duas populações de trigo, de 78 e 138 linhas puras, cultivadas em três locais em dois anos. Miura et

al. (2002) detectaram que a variação genética para tolerância a Phs estava associada à dormência. O maior efeito na variação de dormência de semente estava associada com o cromossomo 3A e seguida pelos cromossomos do grupo 4.

Osa et al. (2003) identificaram dois QTLs para dormência de semente de trigo, no braço curto e longo, no cromossomo 3A, sendo que o QPhs.ocs-1 explicou 23 a 38% da variação fenotípica do caráter, possuindo efeito de manutenção de dormência para este alelo do trigo Zen. A alta dormência associada ao cromossomo 3A de Zen é atribuída a este QTL, no braço curto, sem a contribuição do taVp1 ou R-A1, loco que representa o código do fator de transcrição relacionada à dormência. Kulwal et al.(2004) também identificaram importantes QTLs no cromossomo 3BL e 3DL, mas nenhum foi encontrado no cromossomo 3AL. As análises citogenéticas, de Mares (1996), apontam 2 locos no cromossomo 3D, envolvido no controle da dormência, no trigo de grão branco AUS 1408. Um destes genes parece operar no embrião, através do efeito de sensibilidade ao ácido abscísico, e o segundo através da casca da semente, sem afetar a cor do grão.

Kulwal et al. (2005) desenvolveram mapa do principal QTL para tolerância a germinação antes da colheita, no cromossomo 3A em trigo, que é conhecido por conter QTLs para vários outros caracteres importantes. Os resultados mostraram que a cor vermelha dos grãos do genitor tolerante não estava associada com o QTL para tolerância a germinação na pré-colheita, nem representa efeito pleiotrópico de um gene R. Estes autores detectaram que o principal QTL no cromossomo 3A explicou 78,03 % da variação da tolerância, mostrando efeito nos 6 ambientes avaliados.

Os cromossomos 3A, 3B, 3D e 4A são considerados de maior importância que outros cromossomos para estudo de tolerância a germinação (FLINTHAM e GALE, 1996; ZANETTI et al., 2000; KATO, et al., 2001; FLINTHAM et al., 2002; OSA et al., 2003; KULWAL et al., 2004; MORI et al., 2005; BASSOI e FLINTHAM, 2005).

A tolerância a Phs, controlada por um gene, é citada por Sharma et al.(1994) e Mares e Ellison, 1990. Flintham e Gale (1996) ressaltaram a existência de um efeito de gene principal, com herança mendeliana, para o caráter dormência de semente em trigo de grãos vermelhos. Flintham et al.

(2000), através do cruzamento de trigos de grão vermelho, provenientes de diferentes origens, constaram que a dormência é controlada por um gene, que exerce seu efeito através do controle genético do embrião, independente do alelo R que determina a dormência pela cor do tegumento. Genótipos de grãos brancos foram dormentes, similares aos genótipos de grãos vermelhos, com triplo dominante, sugerindo que a dormência era devida à gene independente dos que determinam a cor. Estes autores detectaram um novo gene, que determina dormência, que denominaram de Phs (germinação de pré-colheita), com maior efeito de dormência em trigo do que o grão vermelho e com segregação monogênica dentro dos recombinantes de cor vermelha. Este loco pode corresponder aos QTLs identificados por Anderson et al. (1993b), em trigo de grão branco. Este mecanismo zigótico de dormência pode operar independentemente da presença do pigmento de coloração vermelha.

Na população obtida pelo cruzamento das cultivares de trigo brasileiras, PG9337 com OCEPAR 18, Bassoi (2002), mapeou 3 QTLs. Dois QTLs estavam localizados no cromossomo 4A e um estava no 2D. O grande resultado foi o forte efeito detectado através de estudo para o QTL no cromossomo 4AL, identificado por Flintham (2000). O autor sugeriu que futuros estudos deveriam confirmar esta hipótese, para poder usar marcadores no programa de melhoramento para resistência a germinação na espiga.

Kato et al. (2001), utilizando duplo haplóides, detectaram um QTL principal, para dormência, no braço longo do cromossomo 4AL, explicando mais de 77% do efeito. O principal QTL, chamado de QPhs.ocs-4AL, foi identificado em uma região próxima ao braço longo do cromossomo 4A, e mais dois, de menor efeito, na região terminal. Estes três QTLs representaram mais de 80% da variância fenotípica total da dormência da semente, para as avaliações de campo e casa-de-vegetação.

Flinthan et al. (2002), no mapa genômico de localização dos QTLs de resistência à germinação, identificaram que o braço longo do grupo 3 e do cromossomo 4A, como locais dos principais genes relacionados à dormência. Estes autores localizaram QTLs em população de grão branco que, provavelmente, representam genes adicionais de dormência, próximos ao loco R de cor de grão e o QTL no cromossomo 3DL que pode ser alelo do gene viviparous taVp1-D. Os QTLs, incluindo genótipos de grão branco, estão

associados com o loco de Phs no cromossomo 4AL. Esta região, segundo Kato et al. (2001), é de possível homeologia com SD4, onde localizaram o QTL de dormência em cevada, no braço do cromossomo 4HS.

Torada et al. (2005) ao fazerem estudo de mapeamento e validação de PCR, baseado em marcadores de microssatélite associados com o principal QTL de dormência de trigo, identificaram este principal loco de dormência de semente, no braço longo do cromossomo de trigo 4AL, usando como base linhagens de duplo haplóide de uma cruz de cultivar resistente à germinação e outro suscetível. Tan et al. (2006), ao avaliar a base genética da dormência em trigo de grão branco, também detectaram o efeito de um QTL no cromossomo 4AL associado com este caráter, que foi consistente nos 3 anos de testes. Os autores sugeriram a utilização desse QTL, através do uso de marcadores moleculares, para aumentar a tolerância das novas linhas e reduzir os vários anos de avaliações.

O QTL de maior efeito para dormência, localizado no cromossomo 4AL, detectado no estudo conduzido por Bassoi (2002) e validado por Torada et al. (2005), pode ser o alelo do principal gene de tolerância a germinação na pré-colheita, identificado anteriormente por Flintham (2000), Kato et al. (2001) e por Flintham et al. (2002). Esta consistência de resultados na identificação da dormência é um forte argumento para continuar as pesquisas em outras populações. Portanto, novas avaliações precisam confirmar esta hipótese da dormência ser controlada por um gene, identificável com marcadores moleculares, para poder usar nos programas de melhoramento genéticos para obtenção de tolerância à germinação na espiga.

## CAPÍTULO I

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE 12 CULTIVARES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) COLHIDAS NA MATURAÇÃO FISIOLÓGICA EM DUAS LOCALIDADES, UTILIZANDO O PRÉ-ESFRIAMENTO PARA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA**

## RESUMO

O melhoramento genético de trigo tem gerado um grande número de cultivares que diferem em potencial de germinação na espiga. Para avaliar estas diferenças, foi programado um experimento em Palotina-PR e outro em Cascavel-PR, com 12 cultivares de trigo. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições. As sementes dos cultivares para o teste de germinação foram colhidas na maturação fisiológica, sendo uma das amostras submetida a tratamento de pré-esfriamento para a superação da dormência e a outra, como testemunha, submetida a um teste sem o pré-esfriamento. As sementes que não germinaram foram submetidas ao teste de tetrazólio para confirmar a presença de dormência. Os resultados das avaliações de germinação foram submetidos à determinação do desvio padrão, para obtenção dos valores do intervalo de confiança, utilizando probabilidade de 5%. A análise dos resultados permitiu verificar que, nas duas localidades, o percentual de germinação de Frontana e IAPAR 53, colhidas na maturação fisiológica, atingiu valores muito baixos. Estas cultivares de trigo apresentaram o menor percentual de sementes germinadas e um maior número de sementes dormentes. O método de superação de dormência para amostras provenientes de Palotina, não foi eficiente para propiciar a completa germinação das sementes. Por outro lado, o método aplicado em amostras de Cascavel permitiu a germinação das sementes para todas as cultivares. O mecanismo de dormência, detectado nestas cultivares, foi eficiente para impedir a germinação na espiga, quando colhidos na maturação fisiológica.

**Palavras- chave:** germinação, dormência, tetrazólio.

## ABSTRACT

The wheat genetic improvement has been developed a great number of cultivars that differ sprouting potential in the spike. To evaluate these differences it was planned one trial in Palotina-PR, and other in Cascavel-PR, with 12 wheat cultivars. The experimental design was in random blocks with four replicates. The cultivars seeds for the sprouting tests, were harvested in the physiological maturation, so that one of the samples was subjected to precooling to surpass dormancy and the other, as test, was subjected to one test without precooling. The seeds that didn't sprout were subjected to a tetrazolium test to confirm the existence of dormancy. The sprouting evaluations results were subjected to standard deviation determination, to get the confidence interval values, using 5% probability. The analysis of the results made possible verifying that, in both localities Frontana and IAPAR 53, harvested in physiological maturity, sprouting percentage reached very low values. These wheat cultivars showed the smallest sprouted seeds percentage and a bigger number of seeds dormancy. The test to surpass dormancy to the samples in Palotina wasn't efficient to favor complete seeds sprouting. On the other hand, the test applied in Cascavel allowed perfect sprouting for all cultivars. The dormancy mechanism detected in these cultivars was efficient to prevent sprouting in ear when harvested in the physiological maturation.

**Keywords:** germination, dormancy, tetrazolium.

## 1 INTRODUÇÃO

O problema de germinação na pré-colheita em trigo atinge áreas de várias partes de regiões produtoras no mundo, principalmente, Norte e Oeste da Europa, Noroeste dos Estados Unidos da América, Norte da Austrália, Oeste da Nova Zelândia, Canadá, África do Sul, Chile, Argentina e Brasil (CUNHA et al., 2004). Na Austrália, em que se produz somente trigo branco, por possibilitar extração de maior quantidade de farinha, ocorrem grandes perdas por germinação na pré-colheita (DERERA, 1980; FLINTHAM, 2000). No Reino Unido, a germinação na pré-colheita é a principal fonte de danos nas culturas comerciais, com visível germinação dos grãos, sob condições adversas de tempo, durante o período de maturação do trigo (LUNN et al., 2001). Bassoi (2004) ressaltou que, em regiões marítimas, com verão chuvoso, onde cereais de inverno são cultivados, e em regiões subtropicais, onde o trigo de primavera é cultivado durante o inverno, como algumas partes do Brasil, existe alta probabilidade de ocorrência de chuvas, antes e durante a colheita, trazendo como consequência a germinação dos grãos na pré-colheita.

A tolerância à germinação na pré-colheita (Phs) é dependente da base genética da cultivar, das condições de colheita, secagem e armazenagem, região de cultivo e das interações das cultivares com o ambiente (HAGEMANN e CIHA, 1987; KING, 1993a; SIMPSON, 1990; KIGEL e GALILI, 1995; TAIZ e ZEIGER, 2000; CASTRO et al., 2004). A tolerância à germinação na pré-colheita, está relacionada a características que determinam a morfologia das espigas, sensibilidade hormonal e inibidores de alfa-amilase (BARNARD et al., 2005).

Sementes recém-colhidas, ainda úmidas, apresentam capacidade de germinação inferior a que exibem quando submetidas previamente à secagem, provavelmente por ocorrerem processos essenciais à germinação durante o período de perda de água (BEWLEY e BLACK, 1985). Khan (1971) atribuiu as citocininas o equilíbrio hormonal, com a função de anular o efeito dos inibidores, permitindo as giberilinas exercerem os efeitos estimuladores. Em

cereais, tem sido observada a presença de proteínas inibidoras de alfa-amilase, sendo ativas principalmente contra enzimas endógenas, para evitar a degradação precoce e inapropriada das reservas de amido (SIMPSON, 1990; KIGEL e GALILI, 1995). A indução da síntese de enzimas alfa-amilase está relacionada principalmente com a disponibilidade do ácido giberélico (GA), produzido pelo eixo embrionário e difundido até o escutelo e a camada de aleurona, onde atua como ativador primário (KIGEL e GALILI, 1995; TAIZ e ZEIGER, 2000; CASTRO et al., 2004).

A temperatura é um fator que tem influência na expressão da dormência nas sementes de trigo, durante o enchimento dos grãos e após a maturação. Em trabalho desenvolvido para avaliação da dormência, Belderock (1976) encontrou correlação positiva entre a baixa dormência e a alta temperatura após a maturação. A dormência das sementes é induzida pela baixa temperatura, durante o período de enchimento de grão, porém a baixa temperatura também é efetiva para superar a dormência na maturação (REDDY et al., 1985). A expressão da dormência nos cereais ocorre quando as sementes, morfológicamente maduras e sadias, não germinam quando colocadas sob condições adequadas de umidade, temperatura, luz e oxigênio (BEWLEY e BLACK, 1985; POPINIGS, 1985; HILHORST, 2000; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; CASTRO et al., 2004).

Segundo Castro et al. (2004), a quebra da dormência está relacionada a fatores internos e externos à semente. Popinigs (1985) indicou vários métodos para superar a dormência de sementes de gramíneas. Os principais são o rompimento da cariopse, tratamento com nitrato de potássio, exposição à luz, emprego de temperaturas alternadas, aplicação de pré-esfriamento, aumento da tensão de oxigênio e tratamento com hormônios (giberilinas e citocininas).

O teste, para avaliar as diferenças de expressão de germinação entre cultivares, é a determinação de grãos germinados e não germinados (McMASTER e DERERA, 1976; FRANCO et al., 1996; TONON, 2001; ROSA, 1999; BASSOI, 2002). Diversos estudos comprovaram o progresso alcançado para identificar fatores genéticos, controlando o caráter dormência de semente, sendo que alguns genes ou regiões nos cromossomos têm sido identificados no controle da dormência em trigo (ANDERSON et al., 1993a; FLINTHAM et

al., 1999; ROY et al., 1999; ZANETTI et al., 2000; KATO et al., 2001; MIURA et al., 2002).

A resistência à germinação é demonstrada, por Flintham e Gale (1996), nos testes de dormência em linhas isogênicas de trigo de grãos vermelhos e de brancos. O principal componente da variação genética da germinação na pré-colheita de trigo parece ser o grau de dormência, que necessita ser avaliado como mecanismo de possível transferência para outros cultivares (FLINTHAM, 2000; BASSOI, 2002; MIURA et al., 2002; OSA et al., 2003). Assim, a identificação de cultivares tolerante à germinação na espiga pode ser uma importante ferramenta na seleção de genótipos para os programas de melhoramento genético em trigo.

Portanto, o objetivo desse experimento foi caracterizar a presença de dormência e as diferenças na expressão de germinação em cultivares de trigo nacional em duas localidades.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

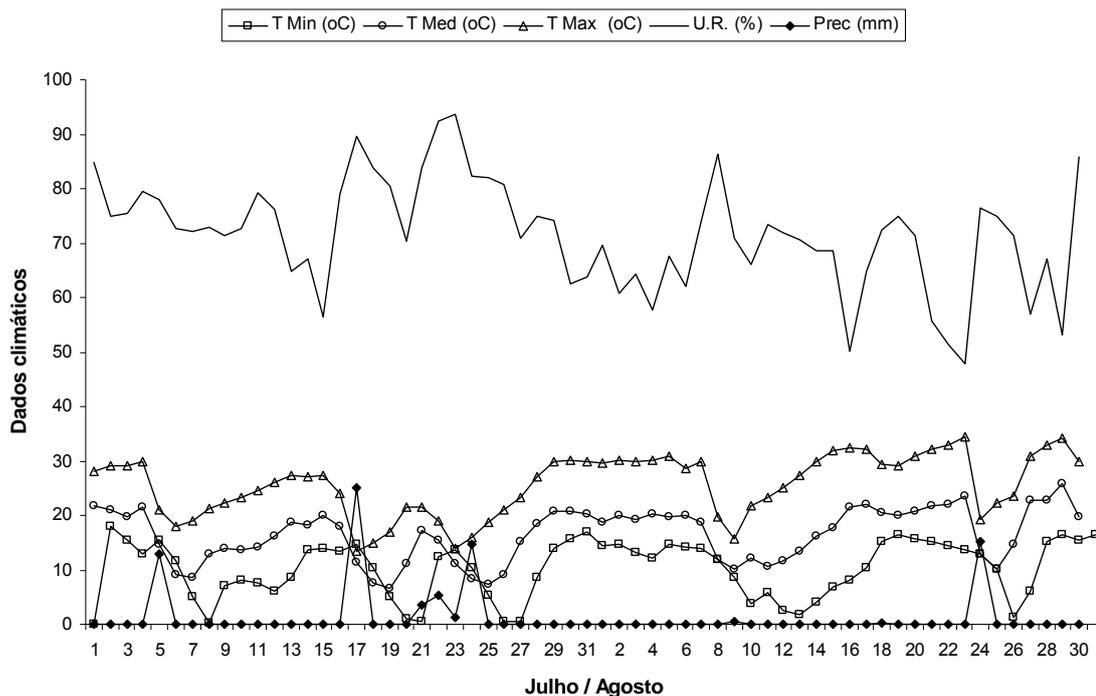
### **2.1 Experimentos**

Os experimentos foram programado com 12 cultivares de trigo (1-BRS 177, 2-BRS 208, 3-BRS 210, 4-CD 104, 5-CD 105, 6-CD 108, 7-Frontana, 8-IAPAR 53, 9-IPR 85, 10-OCEPAR 18, 11-ÔNIX, 12-BRS 18-Terena), que representam uma grande amplitude de variação dos cultivares recomendadas no estado do Paraná. Um experimento foi semeado no dia 22 de abril de 2005, no Centro de Pesquisa da Coodetec em Palotina-PR (Latitude 24° 17' 02" e altitude 333 m), localizado na PR 364, imóvel 5000 e outro dia 14 de maio, no Centro de Pesquisa da Coodetec em Cascavel-PR (Latitude 24° 47' 21" e altitude 781 m), localizado na BR 467, km 98. O delineamento experimental foi em blocos completos com quatro repetições, utilizando as cultivares como tratamentos sorteados em cada bloco.

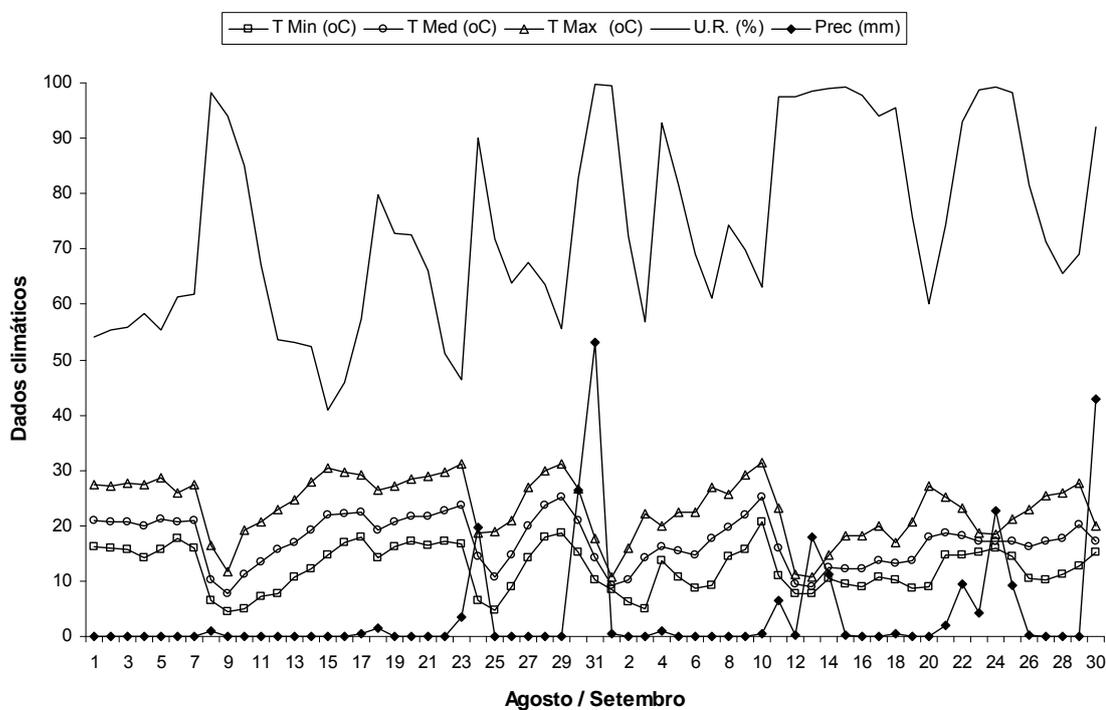
No período de desenvolvimento da cultura até a fase de enchimento de grãos, foram controladas as doenças, conforme recomendações técnicas para a cultura do trigo (IAPAR, 2003), mais uma aplicação no final de enchimento de grãos para o controle de fungos. A colheita foi realizada quando as plantas atingiram a maturação fisiológica, conforme descrito por Hanft e Wych (1982), isto é, quando as espigas perderem a coloração verde, mas os nós dos colmos ainda estavam verdes. Após a colheita de 50 espigas de cada repetição, estas foram secas em temperatura ambiente, em um telado coberto, por um período de 20 dias, até atingirem, aproximadamente 13% de umidade nos grãos.

Os dados climáticos de temperatura mínima, temperatura média e temperatura máxima (°C), umidade relativa (%) e precipitação (mm), durante o enchimento de grãos, estão registrados nas Figuras 1 e 2.

### **2.2 Teste de germinação**



**Figura 1** – Dados de temperatura mínima, média e máxima (°C), umidade relativa (%) e precipitação (mm), nos meses de formação de sementes julho e agosto em Palotina, 2005.

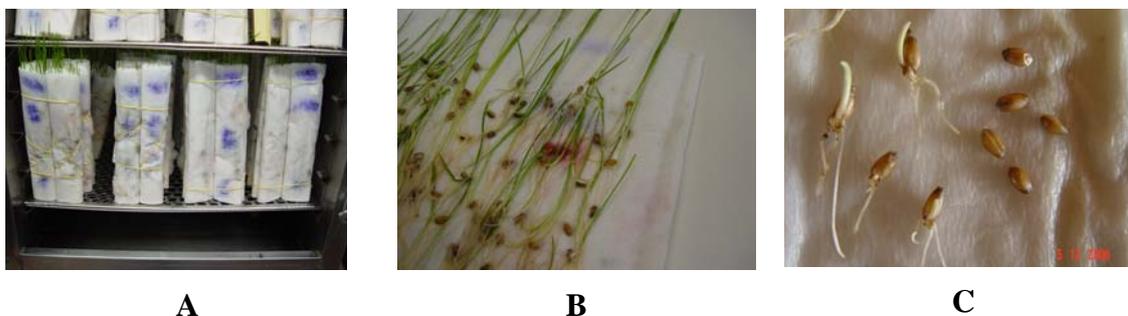


**Figura 2** – Dados de temperatura mínima, média e máxima (°C), umidade relativa (%) e precipitação (mm), nos meses de formação de sementes julho e agosto em Palotina, 2005.

No laboratório, foram debulhadas as sementes de espigas colhidas na maturação fisiológica, para cada cultivar em todas as repetições. O teste de germinação realizado no laboratório de sementes da Coodetec, foi conduzido em 4 repetições de 100 sementes. As sementes foram distribuídas em 10 linhas, com número de 10 sementes por linha, em duas folhas de papel toalha umedecidas com 2 vezes a sua massa em água destilada, e depois recobertas com mais duas folhas.

Em uma das amostras para avaliação da germinação, as sementes foram previamente submetidas a tratamento de pré-esfriamento, para a superação da dormência, em uma câmara de germinação tipo B.O.D., com temperatura de  $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , permanecendo por um período de 5 dias (BRASIL, 1992). Os rolos de papel usados para o pré-esfriamento, foram cobertos com saco plástico para manter a umidade, sendo retirado no momento da realização teste de germinação. A outra amostra de sementes, utilizada como testemunha, foi submetida a um teste de germinação sem o pré-esfriamento.

As contagens das plântulas normais e anormais, sementes mortas e dormentes, foram realizadas 5 dias após o teste, no germinador do laboratório de sementes da Coodetec, a uma temperatura de aproximadamente de  $28^{\circ}\text{C}$  (Figura 1), com pequena modificação em relação a Brasil (1992). As sementes que não germinaram foram submetidas ao teste de tetrazólio para confirmar a presença de dormência, em 4 amostras de 50 sementes. Nesse teste, as sementes foram colocadas, entre as folhas de papel-toalha umedecidos, durante a noite e no outro dia foram seccionadas longitudinalmente. A melhor parte,



**Figura 3-** (A) Germinador de sementes, (B) plântulas normais e (C) presença de sementes dormentes no teste de germinação.

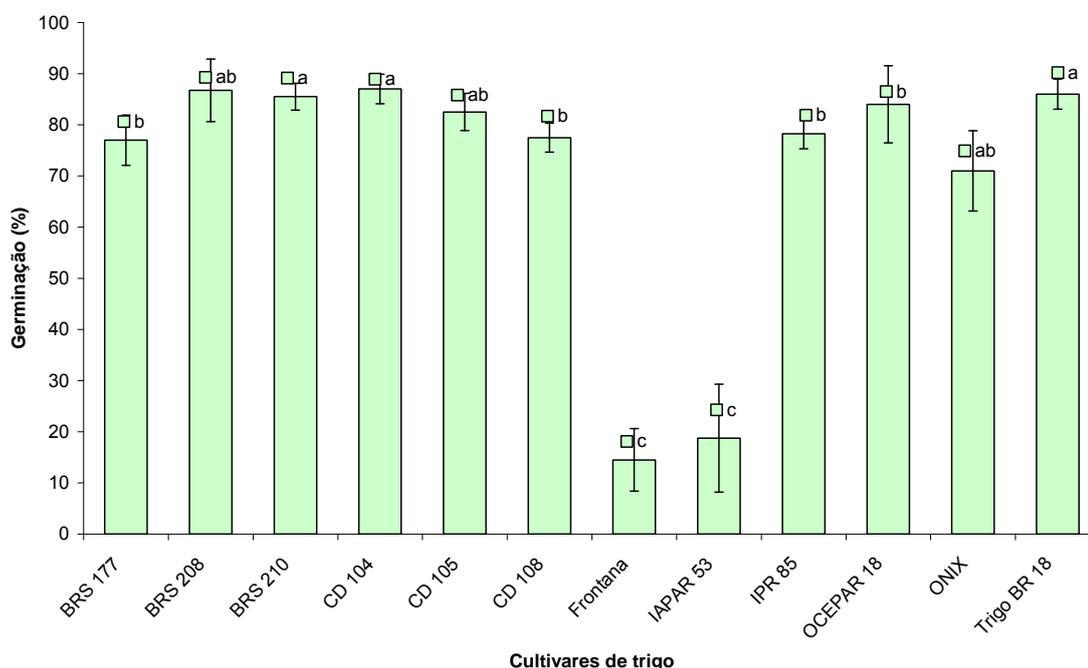
para visualizar o embrião de cada semente, foi colocada em uma solução de tetrazólio (2,3,5 - trifenil cloreto de tetrazólio), em uma concentração de 0,1%, por um período de 2 horas no escuro, na câmara de germinação do tipo B.O.D., em uma temperatura de 35°C (BRASIL, 1976). Após o tratamento, as sementes foram lavadas para determinar as sementes viáveis e as mortas.

### **2.3 Análise**

Para cada cultivar avaliada, foi obtido o intervalo de confiança a 5% de probabilidade para a estimativa da média de germinação ou dormência. Médias, cujos intervalos de confiança apresentaram sobreposição, foram consideradas iguais a 5% de probabilidade.

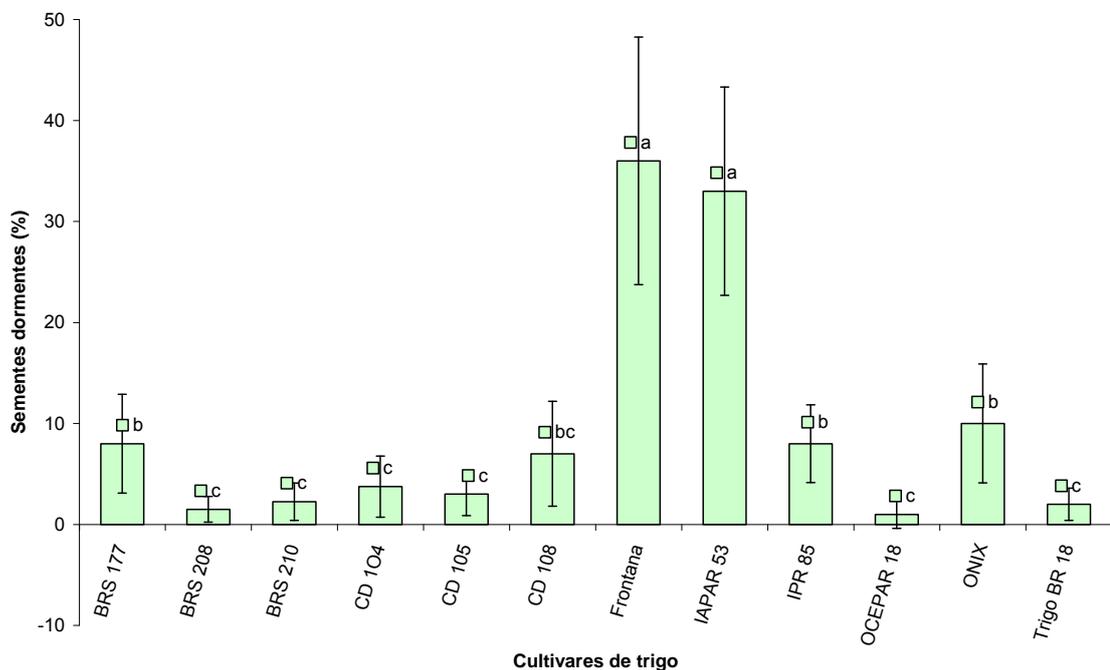
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A colheita das espigas na maturação fisiológica teve com objetivo manter as principais propriedades das sementes obtidas nas condições de ambientes de cada localidade. Por meio do teste de germinação realizado em laboratório, das sementes oriundas de espigas colhidas no período de maturação, as cultivares Frontana e IAPAR 53 apresentaram menor percentual de germinação em Palotina (Figura 4). Os cultivares que apresentaram a maior percentagem de germinação foram BRS 210, CD 104, Trigo BRS 18, mas não diferiram de BRS 208, CD 105 e OCEPAR 18. Entretanto, a percentagem máxima de germinação de sementes foi inferior a 90%. Os resultados obtidos no teste de germinação para as cultivares Frontana e IAPAR 53 revelaram,



**Figura 4** - Percentagem de plântulas normais do teste de germinação de doze cultivares de trigo, colhidas no estágio de maturação fisiológica, em Palotina-PR no ano de 2005. Barra em cada coluna representa o intervalo de confiança a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula não se diferenciam, considerando a sobreposição dos intervalos de confiança para a média.

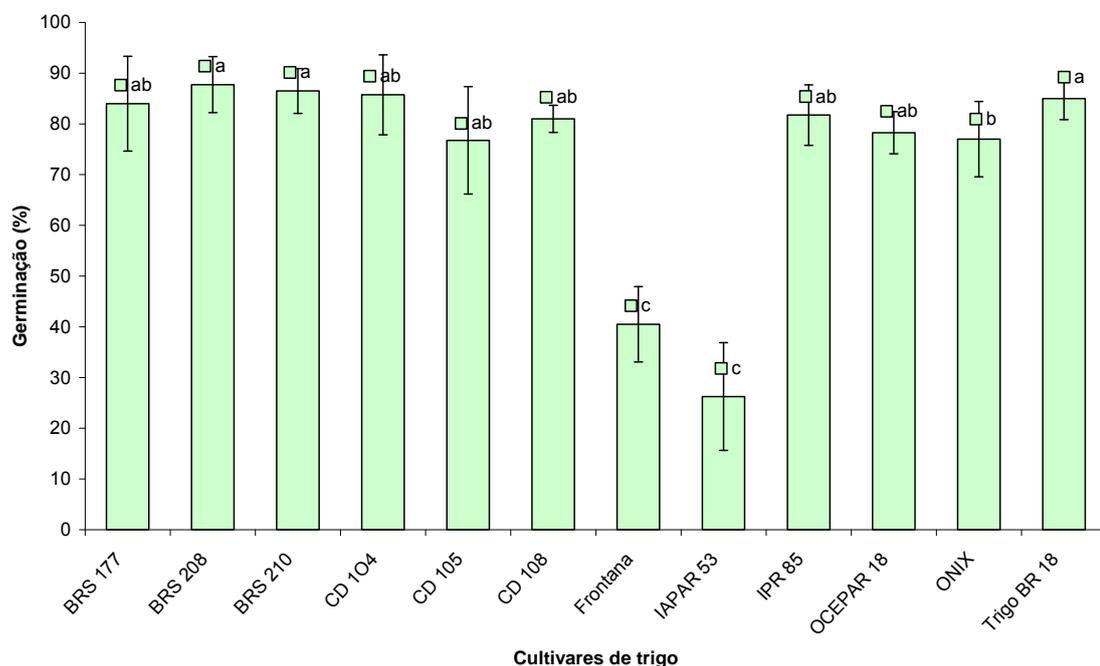
também, o maior número de sementes dormentes, confirmada pelo teste de tetrazólio (Figura 5). O teste de tetrazólio revelou que as sementes manifestaram maior percentagem de dormência, provavelmente, por terem ocorrido condições de ambiente favoráveis para esta característica no período de aumento de massa, que corresponde ao final da fase de enchimento de grãos. As cultivares, com menor percentagem de germinação, podem ter atingido o pico máximo de dormência nesta fase de maturação. À medida que a fase de formação das sementes atingem a maturação fisiológica, há uma progressiva redução do ácido giberélico(GA) e um incremento do ácido abscísico (ABA), responsável pela determinação da dormência, em que atinge a máxima concentração (TAIZ e ZEIGER, 2004). Segundo Hilhorst (1995), a maior taxa de ABA é encontrada no máximo peso de grãos, e decresce rapidamente à medida que os grãos começam a secar e reduzir o peso úmido. Neste momento, ocorre uma coincidência dos eventos de desenvolvimento dos grãos, de maturação e redução da umidade, com a expressão da dormência. Esta



**Figura 5** - Percentagem de sementes dormentes no teste de tetrazólio de doze cultivares de trigo, colhidas no estágio de maturação fisiológica em Palotina-PR, no ano de 2005. Barra em cada coluna representa o intervalo de confiança a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula não se diferenciam, considerando a sobreposição dos intervalos de confiança para a média.

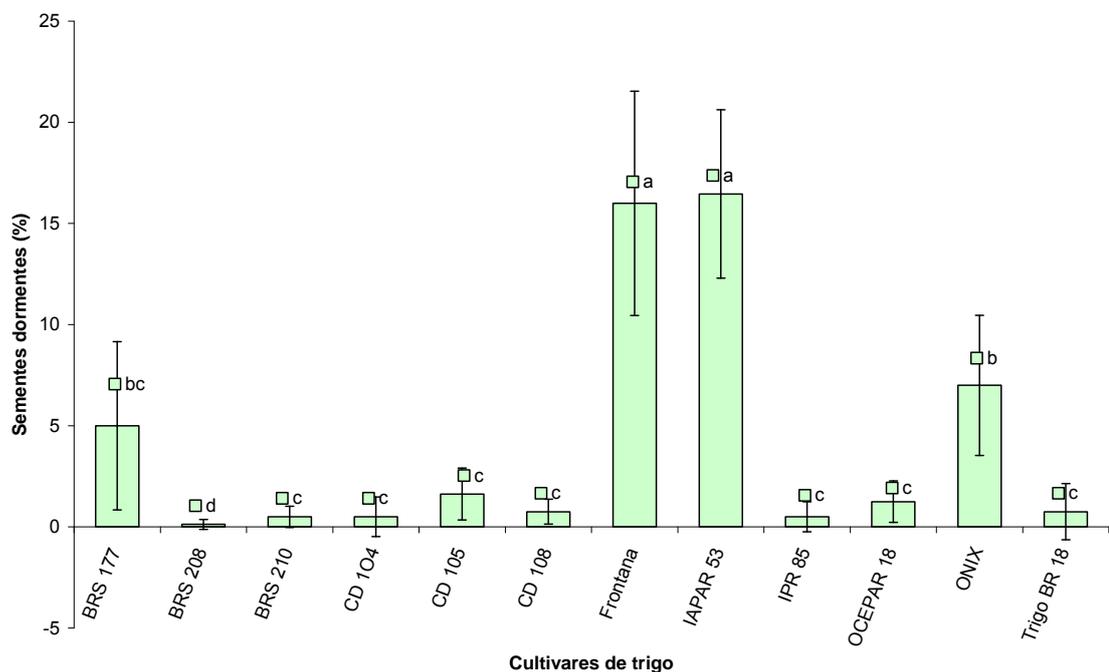
fase coincide com o período de desligamento das sementes da planta mãe, com a subsequente redução de umidade do grão e pode estar relacionada à alta concentração de ABA que, impediu determinadas sementes de desencadear o processo de germinação.

O tratamento a frio para a superação da dormência não foi suficiente para superar a barreira fisiológica imposta pelas sementes das cultivares Frontana e IAPAR 53 (Figura 6). Estas duas cultivares apresentaram um baixo percentual de germinação, mesmo após o tratamento a frio de 5 dias. Neste teste, eram esperados resultados similares entre as cultivares quanto à percentagem de germinação de sementes. Entretanto, a presença de sementes dormentes nas duas cultivares reduziu os valores de percentagem de germinação (Figura 7). Pela análise dos resultados, a cultivar Frontana e a IAPAR 53 expressaram a maior percentagem de sementes dormentes, confirmando que o menor percentual de germinação foi devido às sementes, que estavam em estado de dormência, provavelmente, pela alta concentração



**Figura 6** - Percentagem de plântulas normais no teste de germinação, com superação de dormência por pré-esfriamento, de doze cultivares de trigo colhidas no estágio de maturação fisiológica em Palotina-PR no ano de 2005. Barra em cada coluna representa o intervalo de confiança a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula não se diferenciam, considerando a sobreposição dos intervalos de confiança para a média

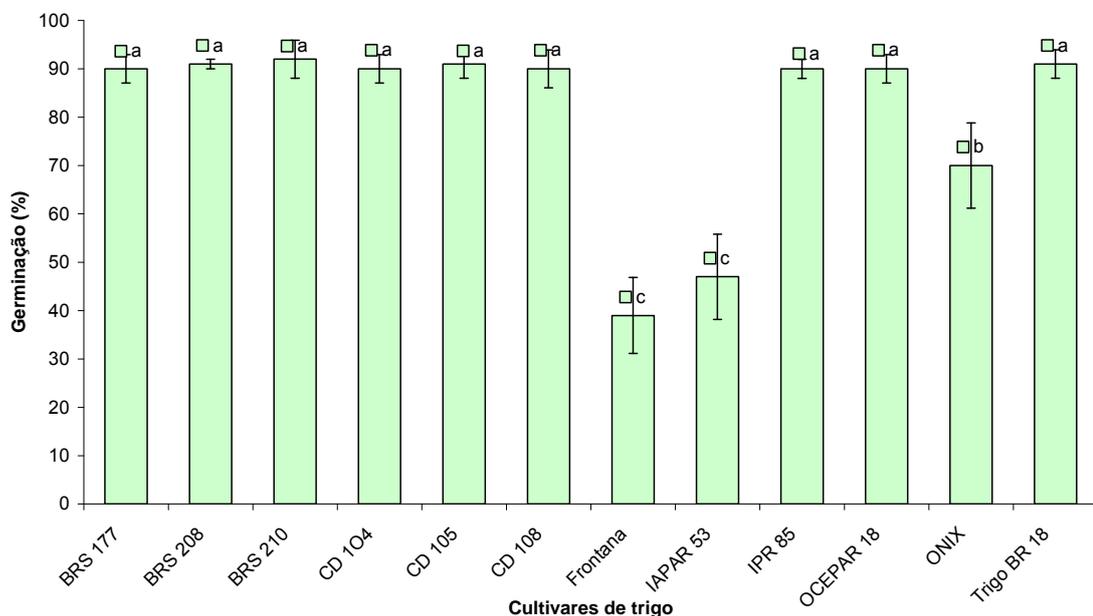
de ABA, que atua bloqueando o processo de germinação, conforme citaram Taiz e Zeiger (2004). Este procedimento de laboratório nas sementes, com quebra de dormência a frio, não foi suficiente para romper as barreiras genéticas, formadas nas sementes, como proteção a uma possível perda do potencial de gerar uma planta, no momento adequado de plantio. Por meio do melhoramento genético, ao longo de várias décadas, este mecanismo de dormência foi sendo eliminado, pela necessidade de avançar etapas, utilizando mais de uma geração no ano, por isso, a maioria dos cultivares avaliados, praticamente, não expressaram sementes dormentes. É a atuação do melhoramento, na mudança de uma característica em benefício da rapidez de buscar soluções para os problemas da triticultura e incrementar o potencial de produção de grãos. Estes resultados realçam a necessidade de reavaliar o processo de melhoramento, para explorar da melhor forma esta fonte de dormência, para melhorar a tolerância à germinação na espiga e garantir, no final, um produto adequado para uso na panificação.



**Figura 7** - Percentagem de sementes dormentes no teste de tetrazólio, com superação de dormência por pré-esfriamento, de doze cultivares de trigo colhidos no estágio de maturação fisiológica, em Palotina-PR no ano de 2005. Barra em cada coluna representa o intervalo de confiança a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula não se diferenciam, considerando a sobreposição dos intervalos de confiança para a média

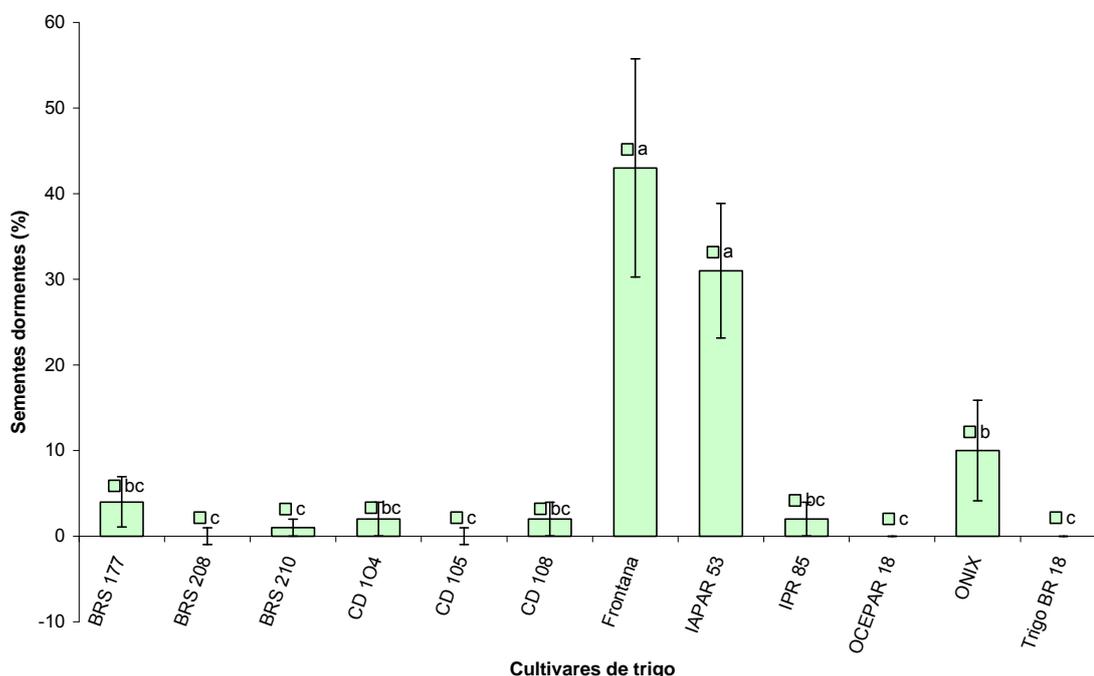
As condições de ambiente, onde são cultivados trigos no Brasil, favorecem a ocorrência de chuvas no momento da colheita (BASSOI, 2002; CUNHA et al., 2004), podendo causar, para maior parte dos cultivares, uma acentuada perda de potencial de germinação e de qualidade industrial. Por esta razão, são inviabilizadas muitas áreas destinadas para produção de sementes e, também, gerando um produto com alta atividade de alfa-amilase, enzima produzida durante o desencadeamento do processo germinativo. Este produto tem pouca ou nenhuma possibilidade de utilização pela indústria de alimentos derivados de trigo. Este ajuste na definição do melhor mecanismo, para a produção de sementes de trigo, tem que ser revisto, para manter padrões de qualidade fisiológica de sementes, bem como garantir uma boa qualidade da farinha, para potencializar e estabilizar a produção de grãos.

Nos testes de germinação, das sementes colhidas em Cascavel, as cultivares Frontana e o IAPAR 53 expressaram menor percentagem de germinação (Figura 8), com valores muito abaixo do índice indicado para co-



**Figura 8** - Percentagem de plântulas normais do teste de germinação de doze cultivares de trigo, colhidas no estágio de maturação fisiológica, em Cascavel-PR no ano de 2005. Barra em cada coluna representa o intervalo de confiança a 5% de probabilidade. Medias seguidas de mesma letra minúscula não se diferenciam, considerando a sobreposição dos intervalos de confiança para a média.

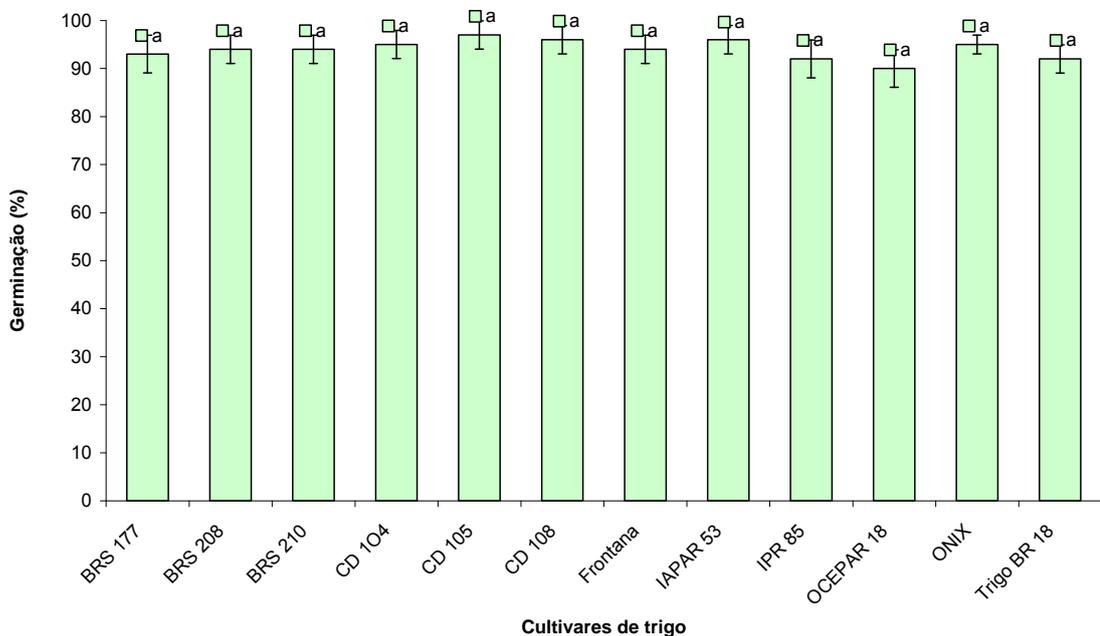
mercionalização de sementes. Por meio da análise de sementes no laboratório, estas cultivares tiveram maior percentagem de sementes dormentes (Figura 9), provavelmente, por terem ocorrido condições de ambiente favoráveis à determinação deste mecanismo de proteção da semente em cultivares com melhor tolerância à germinação na espiga. Estes resultados, similares aos dados das avaliações de Palotina, contribuem para reforçar a hipótese de que estes cultivares possuem dormência suficientemente expressiva para manter maior resistência a germinação, apesar de condições favoráveis. Para as regiões produtoras de trigo no Brasil, que favorecem a germinação na espiga antes da colheita, este mecanismo de manutenção das propriedades das sementes poderá ser de grande importância para a produção dos diferentes derivados de farinha de trigo. Além disso, ser expresso na maior parte das áreas com cultivo de trigo e ser a característica de grande impacto no melhora-



**Figura 9** - Percentagem de sementes dormentes no teste de tetrazólio de doze cultivares de trigo, colhidas no estágio de maturação fisiológica, em Cascavel-PR no ano de 2005. Barra em cada coluna representa o intervalo de confiança a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula não se diferenciam, considerando a sobreposição dos intervalos de confiança para a média.

mento, para ser transferida à base genética dos trigos cultivados no país.

Nas sementes colhidas na localidade de Cascavel, que foram submetidas à superação de dormência, ocorreu uma germinação uniforme para todas as cultivares, dentro dos melhores padrões utilizados na comercialização (Figura 10). Os cultivares Frontana e IAPAR 53, neste teste, expressaram valores similares aos outros cultivares. Estes resultados comprovaram que o procedimento do laboratório, para a superação de dormência de sementes de trigo, esteve perfeitamente ajustado aos padrões estabelecidos. As condições de ambiente desta localidade devem ter favorecido a superação do mecanismo de dormência, expressado por estas cultivares, quando foram produzidas em Palotina. Quando forem utilizadas colheitas antecipadas, este teste de superação de dormência deve ser revisto, especialmente, para o caso da necessidade de se obterem resultados logo após a colheita, pois o tempo de armazenamento até o período do próximo plantio é suficiente para quebra de



**Figura 10** - Percentagem de germinação de plântulas normais do teste de germinação, com superação de dormência, de doze cultivares de trigo colhidas no estágio de maturação fisiológica, em Cascavel-PR no ano de 2005. Barra em cada coluna representa o intervalo de confiança a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula não se diferenciam, considerando a sobreposição dos intervalos de confiança para a média.

dormência em trigo.

A superação da dormência está relacionada a fatores internos e externos à semente. Entre os reguladores de crescimento, as giberilinas (geralmente o ácido giberélico, GA<sub>3</sub>, mas também GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub>), as citocininas (principalmente a cinetina e a leuziladenina) e o etileno são os compostos mais relacionados à quebra de dormência (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Existem inibidores endógenos, cuja concentração diminui após o choque de luz e temperatura, concomitantemente, com o aumento significativo do teor de giberelinas nas sementes.

Para Carvalho e Nakagawa (2000), a colheita deve ser realizada quando as sementes atingem a maturidade fisiológica, isto é, quando as sementes se desligam da planta mãe, ponto a partir do qual ocorre rápida desidratação. Contudo, a colheita neste momento é difícil de ser operada, pois as plantas apresentam, ainda, quantidade relativamente grande de partes de colmos, nós e raquis, com alto grau de umidade. O elevado teor de água, no ponto máximo de matéria seca, dificulta a colheita e a semente fica mais suscetível à injúria mecânica e por danos durante o período de armazenamento. Este tipo de dano nas sementes, por não ser visível nem modificar sensivelmente as características físicas, impossibilita a eliminação dessas sementes durante o processo de beneficiamento.

As cultivares Frontana e IAPAR 53 revelaram baixa percentagem de sementes germinadas, possivelmente, pela ação do ABA, que deve ter interferido no bloqueio do processo de germinação. A cultivar Frontana é citada como a cultivar de trigo com um dos percentuais mais baixos de germinação, por apresentar mecanismo de dormência, considerado como a principal base genética da tolerância à germinação do trigo nacional (LINHARES, 1979; REIS e CARVALHO, 1989; ROSA, 1999; TONON, 2001; BASSOI, 2002). A cultivar IAPAR 53 é descendente de cruzamento com Sulino, cultivar com base genética da Frontana, podendo, neste caso, estarem os mesmos genes interferindo na baixa resposta a germinação. A escolha da época de colheita foi para identificar o momento mais importante, para manter a qualidade da semente e garantir a mais alta capacidade de germinação. Este procedimento tem grande importância, na definição do momento de colheita, especialmente, nos dias atuais, em que existem informações confiáveis de probabilidade de

ocorrências de chuvas. Esta alternativa em garantir a integridade da semente poderia ser uma estratégia a ser adotada na produção de sementes, assim como, seria importante para manutenção da qualidade para indústria.

As cultivares Frontana e IAPAR 53 apresentaram uma elevada porcentagem de sementes dormentes quando foram submetidas ao teste de germinação. O baixo número de sementes germinadas demonstra que estas cultivares apresentam um mecanismo de dormência muito forte, que pode garantir a manutenção da qualidade de semente em condições de atraso de colheita seguido por chuvas neste período. Os trabalhos desenvolvidos para a avaliação da tolerância à germinação na espiga (LINHARES,1979; REIS e CARVALHO, 1989; ROSA, 1999; TONON, 2001; BASSOI, 2002 e 2004) foram consistentes quando detectaram baixa germinação na cultivar Frontana. Entre as cultivares avaliadas, 'Frontana' é citada como referência, quando a comparação foi relacionada com resistência à germinação, por apresentar os menores valores de sementes germinadas. Este genótipo tem um mecanismo de dormência que garante a resistência, mesmo sendo submetido a condições extremamente favoráveis à germinação.

Efeitos de tratamentos térmicos, utilizados experimentalmente na quebra da dormência, também podem ocorrer de forma natural no ambiente onde as sementes estão no processo final de maturação. Nesta fase, a ocorrência de chuvas induz novamente a absorção de água e os efeitos de temperatura favorecem a germinação. As células das sementes apresentam membranas semipermeáveis, seletivas, separando os diversos compartimentos, formados por proteínas, gerando canais que permitem a passagem de água, mas impedem a passagem dos solutos (CASTRO et al., 2004). Isto gera gradientes de potencial hídrico, entre o meio externo e interno à membrana, que proporcionam o movimento de água do potencial hídrico mais elevado para o mais baixo. Esta absorção de água funciona como um estimulador para desencadear o processo de germinação, antes de as sementes serem colhidas. As condições de ambiente onde é cultivado o trigo envolvem a ocorrência de chuvas, associadas às altas e baixas temperaturas, no período de maturação, provocando a redução da qualidade e inviabilizando para utilização como semente, por provocar germinação prematura das mesmas.

O conhecimento dos fatores que interferem na tolerância de germinação poderá auxiliar na definição do potencial de aceitação de cada cultivar. Um esquema de melhoramento que possibilite a transferência da dormência para os novos cultivares, que impeça a germinação das sementes antes da colheita, mesmo em condições de ambiente que favoreçam a germinação, pode possibilitar obtenção de maiores produtividades e para garantir um produto com os padrões necessários a indústria, tanto de sementes quanto de farinha.

Após a maturação e o enchimento dos grãos, as sementes colhidas são armazenadas visando à semeadura no próximo ciclo. Estas sementes correspondem ao potencial de reserva para o desenvolvimento da nova plântula. O processo de mobilização de reservas, que compreende a capacidade de desenvolver uma plântula com alto vigor, está relacionado ao mecanismo de controle hormonal, genético e bioquímico. Castro et al. (2004) descrevem que, para a realização de todos os processos de hidratação, reparo de tecidos e desenvolvimento, a plântula necessita de muita energia, que será suprida pelos oligossacarídeos que, provavelmente, estejam armazenados nos vacúolos de todas as células. Na maioria das sementes, o embrião apresenta estruturas pré-formadas, de radícula rudimentar e foliar (plúmula). Durante o desenvolvimento da plântula, o alongamento da radícula e a expansão das folhas são sustentadas pela mobilização das reservas acumuladas nas sementes. A mobilização inicia a partir da produção de giberilinas pelo embrião, envolvendo níveis de controle internos das sementes e de transporte de hormônios, carboidratos e compostos nitrogenados (SIMPSON, 1990, KIGEL e GALILI, 1995; HILHORST, 1995; TAIZ e ZEIGER, 2000). O metabolismo dos compostos de reserva gera uma grande quantidade de sacarose e aminoácidos no tecido de reserva, que são transportados para os tecidos do embrião em crescimento. Estas diferentes etapas precisam ser vencidas, durante o desenvolvimento do embrião, e as sementes necessitam apresentar um potencial adequado de energia para cumprir cada fase, sem comprometer a realização de todo o processo e, no final, garantir o desenvolvimento uma plântula normal. Esta comparação entre as cultivares, procurando determinar a capacidade de germinação de cada uma, em condições de ambientes similares, poderá contribuir na montagem de estratégia para utilizar

semeaduras de campo mais propícias para cada cultivar manter um potencial favorável de qualidade de sementes e alta produtividade de grãos. É preciso contornar as condições de ambiente que podem interferir na resposta dos cultivares, na produção de sementes de alta qualidade, em função de manipular os fatores que interferem nos processos de formação de sementes, expressão da dormência, perdas de água, colheita e armazenamento.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados do teste de germinação das sementes permitiram verificar que, nas duas localidades, os percentuais de germinação foram muito baixos para Frontana e IAPAR 53.

O teste de pré-esfriamento para a superação da dormência para amostras de Palotina não foi eficiente para propiciar a completa germinação das sementes. Para as amostras colhidas em Cascavel, o tratamento a frio foi eficiente para completa superação da dormência.

O mecanismo de dormência detectado nestes cultivares foi suficientemente forte e eficiente para impedir a germinação das sementes colhidas na maturação fisiológica.

As demais cultivares avaliadas não apresentaram dormência nas sementes. Isso indica que, em condições de ambiente que favoreçam a germinação na pré-colheita, estas cultivares apresentarão germinação na espiga.

## CAPÍTULO II

**TOLERÂNCIA À GERMINAÇÃO NA PRÉ-COLHEITA EM CULTIVARES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) COLHIDAS NA MATURAÇÃO FISIOLÓGICA EM DUAS LOCALIDADES**

## RESUMO

Para identificar as diferenças de tolerância à germinação na pré-colheita em 12 cultivares de trigo, foi programado um experimento em Palotina e outro em Cascavel. Quando os cultivares atingiram a maturação fisiológica, foram colhidas espigas e depois secas em temperatura ambiente por um período de 20 dias. Foram utilizadas 10 espigas por cultivar e submetidas a um sistema de chuva artificial. Após encerrar o período de molhamento, foram realizadas leituras pela escala de notas de 1 a 11 de McMaster e Derera (1976). Estas espigas foram debulhadas e submetidas à contagem de grãos germinados e não germinados. As sementes que não germinaram foram submetidas ao teste de tetrazólio para confirmar a existência de dormência. Os resultados de menor número de grãos germinados e maior número de grão não germinados possibilitaram identificar as cultivares Frontana, IAPAR 53, ONIX, CD 108 e IPR 85 como os de melhor nível de tolerância. Na análise geral de todas as características avaliadas, 'Frontana' aparece como a cultivar com o melhor mecanismo para utilizar no melhoramento genético, pela constância de baixos valores, que corresponderam a 0,3% de grãos germinados em Cascavel e Palotina e com notas 1,1 e 1,0, respectivamente. Os critérios de notas visuais de germinação na espiga permitiram fazer avaliações em um grande número de cultivares, com grande rapidez, sem comprometer os resultados de seleção dos genótipos mais tolerantes. Este procedimento contribuiu para confirmar que a escala de notas pode ser utilizada no melhoramento genético, visando à seleção de cultivares com maior tolerância à germinação na pré-colheita.

**Palavras-chave:** trigo, germinação na pré-colheita, tolerância à germinação, dormência.

## ABSTRACT

To identify the differences of pre-harvest sprouting tolerance in 12 wheat cultivars it was planned one experiment in Palotina and other in Cascavel. When the cultivars reached the physiological maturation, ears were harvested and dried at ambient temperature for 20 days. Ten ears per cultivar were used and subjected to artificial rain. After closing the wet period were realized reads of the 1-11 scale notes. These spikes were threshed and subjected to counting of sprouted and non-sprouted seeds. The seeds that didn't sprout were subjected the tetrazolium test to confirm the existence of dormancy. The results of smaller number of sprouted seeds and higher number of non-sprouted ones possibleted to identify Frontana, IAPAR 53, ONIX, CD 108 and IPR 85 cultivars, as the ones with best level of tolerance. In general analysis of all the evaluated characteristic Frontana appear with the best cultivar mechanism to apply in genetic breeding programs because the constant low values that corresponded the 0,3% of germinated seeds in Cascavel and in Palotina, with visual grades 1.1 and 1.0, respectively. The visual grades criteria of sprouting in the spikes permitted evaluations in many cultivars and it could be done very fast, without affecting the results of more tolerant genotypes selection. This procedure contributed to confirm that the scale can be used on genetic breeding programs aiming to the selection of cultivars with higher tolerance to pre-harvest sprouting.

**Keywords:** wheat, pre-harvest sprouting, tolerance to germination, dormancy.

## 1 INTRODUÇÃO

Várias partes de regiões produtoras no mundo, principalmente, Norte e Oeste da Europa, Noroeste dos Estados Unidos da América, Norte da Austrália, Oeste da Nova Zelândia, Canadá, Áfricas do Sul, Chile, Argentina e Brasil, são referidas por apresentar problemas por germinação na pré-colheita em trigo (CUNHA et al., 2004). Na Austrália, ocorrem grandes perdas por germinação na pré-colheita (DERERA, 1980; FLINTHAM, 2000). No Reino Unido, a germinação na pré-colheita é a principal fonte de danos nas culturas comerciais (LUNN et al., 2001). No Brasil a ocorrência de chuvas antes e durante a colheita provoca grandes perdas por germinação (BASSOI, 2004).

A temperatura é um dos fatores que contribui para a expressão da germinação na pré-colheita. Os efeitos de temperatura no período de enchimento de grãos até a fase de colheita interferem na determinação do grau de dormência (SIMPSON, 1990; KIGEL e GALILI, 1995; HILHORST, 1995; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; CASTRO et al., 2004). Após a maturação, ocorre uma correlação positiva entre a baixa dormência e a alta temperatura (BELDEROCK, 1976; HILHORST, 1995), mas a temperatura baixa pode contribuir para aumentar a dormência durante o período de enchimento de grãos e reduzir a dormência na maturação (REDDY et al., 1985).

As glumas do trigo podem representar mecanismos relacionados com a tolerância à germinação na pré-colheita, por conter inibidores que podem afetar o processo germinativo (SIMPSON, 1990; KIGEL e GALILI, 1995; HIMI et al., 2002; GATFORD, 2004) ou por dificultarem a embebição das sementes (MARES, 1983a; LIU et al., 1996; KING e WETTSTEIN, 2000; GATFORD, 2004). A tolerância pode ser atribuída à dormência das sementes de trigo causada por bloqueios físicos, representados pelo tegumento resistente e a impermeabilidade, que impede a absorção de água e oxigenação do embrião (KIGEL e GALILI, 1995; CASTRO et al., 2004; GATFORD, 2004).

A expressão da dormência nos cereais ocorre quando as sementes, morfológicamente maduras e sadias, não germinam quando colocadas sob condições adequadas de umidade, temperatura, luz e oxigênio (BEWLEY e BLACK, 1985; POPNIGS, 1985; HILHORST, 1995; CARVALHO e

NAKAGAWA, 2000; CASTRO et al., 2004). Mas a ausência de dormência pode resultar na germinação prematura das sementes, quando expostas à alta umidade próxima ao período de maturação fisiológica (PATERSON e SORRELS, 1990; SIMPSON, 1990; KIGEL e GALILI, 1995; HILHORST, 1995).

Entre as metodologias desenvolvidas para determinação de germinação na espiga, são referidas as câmaras de germinação com alta umidade relativa (WEILENMANN, 1976) e simuladores de chuva (McMASTER e DERERA, 1976; SVENSSON, 1976; LINHARES, 1979; HAGEMANN e CIHA, 1984; REIS e CARVALHO, 1989; OKUYAMA, 2003; BASSOI, 2002 e BASSOI e FLINTHAM, 2005). Para avaliar o grau de germinação das espigas, após serem submetidas aos testes, pode ser utilizada uma escala de notas (McMASTER e DERERA, 1976; REIS e CARVALHO, 1989; OKUYAMA, 2003), e, também, pode ser determinado o número de grãos germinados e não germinados (McMASTER e DERERA, 1976; FRANCO et al., 1996; TONON, 2001; ROSA, 1999; BASSOI, 2002).

Segundo Taiz e Zeiger (2000), um grupo de hormônios, caracterizados como giberilinas (GAs), desempenham importantes funções em vários fenômenos fisiológicos da germinação. A indução da síntese de enzimas alfa-amilase está relacionada, principalmente, com a disponibilidade do ácido giberélico (GA), produzido pelo eixo embrionário e difundido até o escutelo e a camada de aleurona, onde atua como ativador primário (KIGEL e GALILI, 1995; TAIZ e ZEIGER, 2000; CASTRO et al., 2004). Lenton e Appleford (1991) demonstraram um modelo da origem da produção de GA<sub>1</sub> e GA<sub>2</sub> no embrião e sua difusão no endosperma para promoção da germinação.

A resistência à germinação é demonstrada por Flintham e Gale (1996), nos testes de dormência, em linhas isogênicas de trigo de grãos vermelhos e de brancos. A tolerância em trigo é controlada pela interação entre fatores ambientais e genes em múltiplos locos (ANDERSON et al. 1993a, FLINTHAM, 2000; BASSOI et al., 2006). Bassoi e Flintham (2005) obtiveram dados de germinação em espigas maduras durante três anos, obtidas sob condições artificiais, em um simulador de chuva. Kato et al. (2001), utilizando duplo haplóides, detectaram um QTL principal, para dormência, no braço longo do cromossomo 4AL, explicando mais de 77% do efeito.

As avaliações foram programadas para detectar as diferenças de tolerância à germinação na espiga, que poderão propiciar a identificação de cultivares de trigo com melhor mecanismo de dormência para futuros estudos visando às transferências para outras cultivares de importância para cultivo, em regiões com problemas de germinação na espiga.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização de cultivares de trigo quanto à dormência das sementes**

Para os experimentos de campo, foram utilizadas 12 cultivares de trigo: 1-BRS 177; 2-BRS 208; 3-BRS 210; 4-CD 104; 5-CD 105; 6-CD 108; 7-Frontana; 8-IAPAR 53; 9-IPR 85, 10-OCEPAR 18, 11-ÔNIX; 12-BRS 18-Terena. Estas cultivares representam uma grande amplitude de variação das cultivares indicadas para diferentes estados no Brasil. Um experimento foi semeado no dia 22 de abril de 2005, no Centro de Pesquisa da Coodetec em Palotina-PR (Latitude 24° 17' 02" e altitude 333 m), localizado na PR 364, imóvel 5000 e outro dia 14 de maio, no Centro de Pesquisa da Coodetec em Cascavel-PR (Latitude 24° 47' 21" e altitude 781 m), localizado na BR 467, km 98. O tipo de solo de Palotina é latossolo roxo eutrófico e em Cascavel é latossolo roxo dioxtrófico. O delineamento experimental foi em blocos casualizados completos com quatro repetições. No período de desenvolvimento da cultura até a fase de enchimento de grãos, foram controladas as doenças, conforme recomendações técnicas para a cultura do trigo (IAPAR. Circular, 126), mais uma aplicação no final de enchimento de grãos para o controle de fungos. A colheita foi realizada quando as plantas atingiram a maturação fisiológica, conforme descrito por Hanft e Wych (1982), isto é, quando as espigas perderem a coloração verde, mas os nós dos colmos ainda estavam verdes. Após a colheita de 50 espigas de cada repetição, estas foram secas em temperatura ambiente, em um telado coberto, por um período de 20 dias, até atingirem aproximadamente 13% de umidade.

### **2.2 Simulação de chuva na pré-colheita**

Afim de simular a condição de chuva na pré-colheita do trigo, foi construído um simulador de chuva, programado para promover uma condição

ideal à ocorrência de germinação na espiga de trigo. O simulador de chuva constou de uma casa de vegetação, com dimensionamento de 72,6m<sup>2</sup>, com 24 bicos de micro-aspersão, do tipo micronaan-dan, de bocal roxo e rotor de médio alcance, utilizados a uma altura de 1,70m acima da mesa preparada para alocar as espigas, promovendo um alcance de 4,40m de diâmetro, quando expostos a uma pressão de 2,70 bar. Os bicos foram distribuídos homogeneamente nos 72,6m<sup>2</sup>, com um raio de distância de 2,20m, um do outro, provocando uma sobreposição similar e promovendo chuva de 19 mm/h. A pressão do equipamento foi exercida com o auxílio de uma motobomba SCHNEIDER BC-92, com potência de 1 CV, e a regulagem realizada por meio do manômetro. Para manter a pressão de água constante, foi utilizado um reservatório, tipo caixa, com capacidade de 1000 L. Este modelo corresponde a uma versão do simulador usado por Okuyama et al. (2002), método que foi idealizado para simplificar ao máximo e ao mesmo tempo possibilitar a avaliação de um grande número de genótipos. O suporte para a base do modelo foi obtido de McMaster e Derera (1976), Svensson (1976) e Hagemann e Ciha (1984).

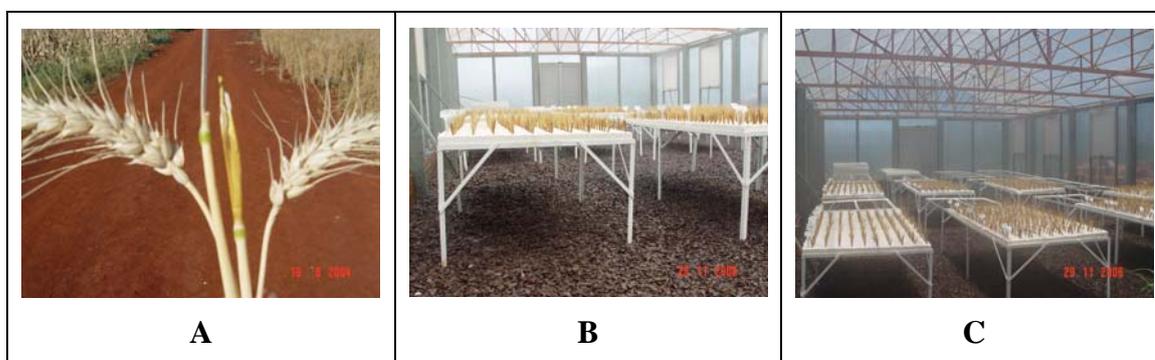
Para distribuir as espigas em mesas, simulando a condição de campo, foram colocados isopores de 6 cm de espessura, com perfuração equidistantes de 5cm, na horizontal e na vertical. As espigas de trigo foram colocadas, com pedúnculos cortados a 4 cm da base, inseridas 2 cm de profundidade no isopor, para manter a espiga em pé e deixando-a a 2 cm, para evitar o seu contato direto com a umidade do isopor. O sistema de chuva, artificial na estufa, com gotículas pequenas, era ligado por uma hora com interrupção de 15 minutos, em um período de dois dias e meio. A quantidade de chuva programada, durante o período total, foi de aproximadamente 993 mm. A temperatura e a umidade relativa foram registradas durante todo o período.

Na caracterização dos genótipos, quanto à germinação na espiga foram preparadas 10 espigas por repetição e por tratamento (Figura 1), e após encerrar o período de molhamento, foram realizadas leituras pela escala de notas de 1 a 11 de McMaster e Derera (1976) (Tabela 1). Estas 10 espigas foram debulhadas manualmente, após secar, sendo submetidas à contagem de grãos germinados e não germinados. Estes números de grãos, obtidos da

média das 10 espigas, foram convertidos em percentual, em razão da variação do tamanho das espigas. As sementes que não germinaram foram submetidas a um teste de tetrazólio para confirmar a existência de dormência, em 4 amostras de 50 sementes. As sementes foram colocadas, entre as folhas de papel toalha com 3 vezes o peso com água, durante a noite e no outro dia foram seccionadas longitudinalmente. A parte melhor de cada semente foi colocada em uma solução de tetrazólio (2,3,5- trifenil cloreto de tetrazólio), em uma concentração de 0,1%, por um período de 2 horas no escuro, na câmara de germinação do tipo B.O.D., em uma temperatura de 35°C (BRASIL, 1976). Após o tratamento, as sementes foram lavadas para determinar as viáveis e as mortas.

**Tabela 1** - Escala de notas de 1 a 11 de McMaster e Derera (1976).

Escala	Classificação
1	Grãos sem germinação;
2	Emergência de radículas em 1 a 2 grãos por espiga;
3	Radículas com 1 a 2 mm em 3 a 4 grãos por espiga;
4	Radículas com 3 a 4 mm em 65 a 70 % dos grãos por espiga;
5	Radículas com 3 a 6 mm em todos os grãos;
6	Todos os grãos com radículas de 6-10 mm e 1-2 grãos por espiga com emergência de coleóptiles;
7	Todos os grãos com radículas de 1-2 cm e mais que 2 grãos por espiga com emergência de coleóptiles,
8	Todos os grãos com radículas de 2-4 cm e emergência de coleóptiles em todos os grãos das espigas com comprimento de 0-0,5 cm;
9	Todos os grãos com radículas maiores que 4 cm e coleóptiles em todos os grãos das espigas com comprimento de 1-2 cm;
10	Todos os grãos com radículas maiores que 4 cm e coleóptiles em todos os grãos das espigas com comprimento de 3-4 cm;
11	Todos os grãos com radículas maior que 4 cm e todos os grãos com folhas.



**Figura 1** - (A) Espigas e nó do colmo no momento da colheita, (B e C) câmara de germinação com distribuição equidistantes das espigas.

### **2.3 Análise de dados**

Os resultados de germinação dos experimentos de comparação entre as 12 cultivares nos locais de Palotina e Cascavel foram obtidos da converção em porcentagem, em função da variação do tamanho das espigas. Os caracteres, número de grãos, número de grãos germinados, grãos não-germinados, notas de germinação, foram submetidos aos testes de normalidade por meio do teste de Lilliefors e de homogeneidade de variâncias de Bartlett, utilizando o programa GENES (CRUZ, 2001). Ao verificar o comportamento da distribuição dos resíduos, por meio do teste de normalidade a 5% de probabilidade, é razoável supor que os dados apresentaram distribuição normal. O teste de homogeneidade de variâncias de Bartlett para todas as características estudadas revelou homogeneidade entre quadrados médios residuais das análises individuais. Após foi realizada a análise conjunta das duas localidades por meio do programa GENES (CRUZ, 2001). As comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. As médias das características analisadas foram submetidas a análise de correlação de Pearson.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2, são apresentadas as médias de número de grãos (N.Grãos), número de grãos germinados (GG) e grãos não-germinados (GNG), dos experimentos de Cascavel e Palotina. O maior número de grãos por espiga, detectado no CD 104, BRS 208 e Frontana, na localidade de Palotina, corresponde a um componente de grande associação com rendimento de grãos (FRANCO e CARVALHO, 1985). Talvez a base genética do trigo nacional, proveniente da Frontana tenha transmitido para a descendência este componente que pode ter contribuído no acréscimo de rendimento de grãos das novas cultivares. As cultivares CD 104 e BRS 208, com origem genética nas cultivares do programa de melhoramento do CIMMYT ocupam hoje uma área de, aproximadamente, 50% da área de cultivo do Paraná, sendo as duas cultivares mais cultivadas no estado. Este componente pode estar indicando

**Tabela 2** - Número médio de grãos (N.Grãos), grãos germinados (GG) e grãos não-germinados (GNG), por espiga, nas localidades de Cascavel (Cvel) e Palotina, 2005.

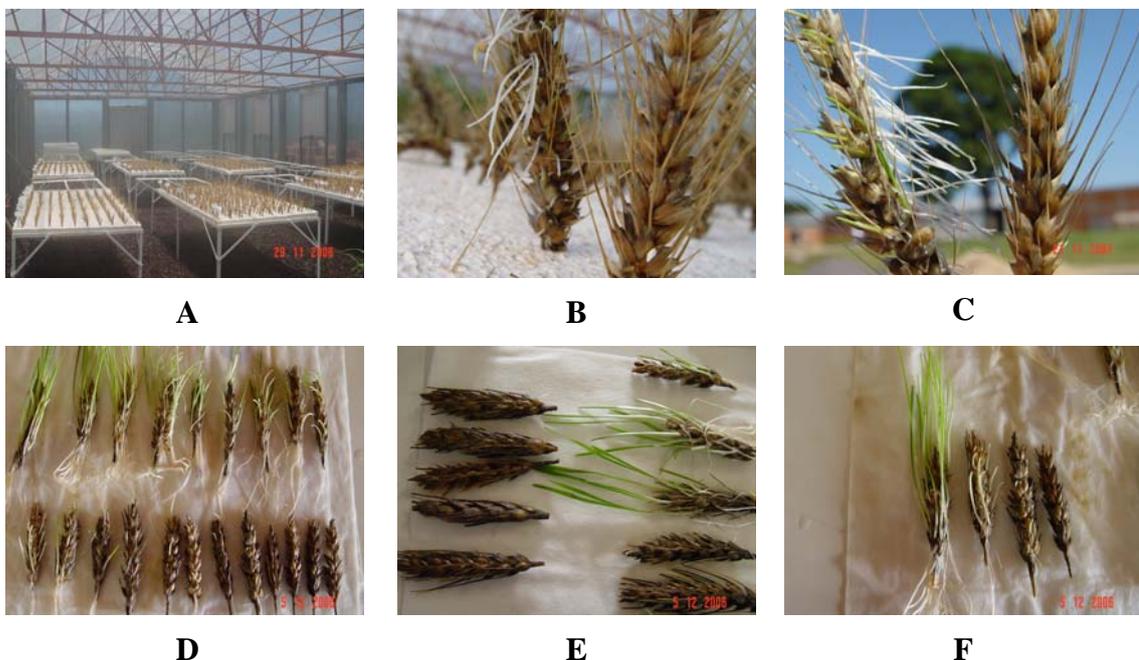
Tratamento	Cvel		Palotina		Cvel		Palotina		Cvel		Palotina	
	N.Grãos		N.Grãos		GG (%)		GG (%)		GNG (%)		GNG (%)	
1 BRS 177	43.5	aA	30.2	bB	30.0	dA	6.5	bB	70.0	cB	93.6	bA
2 BRS 208	41.9	aA	32.8	aB	39.2	cA	9.1	bB	60.8	dB	90.9	bA
3 BRS 210	47.8	aA	25.8	bB	35.7	cA	12.8	bB	64.3	dB	87.2	bA
4 CD 104	44.9	aA	35.2	aB	36.7	cA	6.5	bB	63.4	dB	93.5	bA
5 CD 105	43.3	aA	30.5	bB	39.0	cA	6.7	bB	61.0	dB	93.3	bA
6 CD 108	38.4	aA	26.3	bB	18.5	eA	1.8	cB	81.5	bB	98.2	aA
7 Frontana	39.3	aA	36.9	aA	0.3	fA	0.3	cA	99.7	aA	99.7	aA
8 IAPAR 53	36.9	aA	27.7	bB	4.9	fA	1.2	cA	95.1	aA	98.8	aA
9 IPR 85	40.7	aA	29.0	bB	34.1	dA	4.7	cB	65.9	cB	95.4	aA
10 OCEPAR18	37.8	aA	29.7	bB	60.2	aA	24.8	aB	39.8	fB	75.2	cA
11 ONIX	43.2	aA	30.0	bB	5.8	fA	1.8	cA	94.2	aA	98.2	aA
12 Trigo BR18	39.2	aA	24.7	bB	47.8	bA	22.8	aB	52.2	eB	77.2	cA
Média	41.4	A	29.9	B	29.34	A	8.25	B	70.7	B	91.8	A
CV												

Notas seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, para a mesma característica, não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade.

uma forte associação com os resultados de produtividade e pode estar determinando a preferência em relação a um grupo de mais de 40 cultivares indicadas para cultivo no Paraná.

Pelos resultados obtidos o componente número de grãos por espiga deve ser avaliado com maior atenção pelos programas de melhoramento, pois está presente em trigos que tiveram e tem grande expressão de cultivo. Este número de grãos pode ser obtido por maior número de espiguetas por espiga, maior número de grãos por espiguetas e por maior tamanho de espiga. São componentes que merecem estudo detalhado para identificar de onde vem a maior resposta que pode maximizar os avanços de incremento no rendimento de grãos. Este componente e o número de espigas por unidade área podem gerar oportunidade de poder somar efeitos para alcançar maior número de grãos por unidade de área. Isto poderá possibilitar maior sucesso com a cultura, por utilizar o rendimento como o fator que poderá contribuir com o diferencial para estabelecer a cultura no país, tornando opção de estabilidade para a produção de grãos.

A simulação de chuva em ambiente controlado foi eficiente para



**Figura 2** – (A) Câmara para germinação artificial, (B e C) espigas germinadas e não germinadas e (D, E e F) espigas representando a escala de McMaster e Derera.

promover a germinação na espiga, nas cultivares suscetíveis (Figura 2). O menor número de grãos germinados e maior número de grãos não germinados possibilitaram separar como mais tolerantes os cultivares Frontana, IAPAR 53, ONIX, CD 108 e IPR 85 (Tabela 2). Quando as condições de ambiente foram menos favoráveis para expressar a tolerância (ensaio de Cascavel), as três primeiras cultivares puderam ser separadas por terem menor possibilidade de serem influenciadas por condições favoráveis à germinação nas espigas.

Na análise geral de todas as características avaliadas para a identificação da cultivar com melhor mecanismo para utilizar no melhoramento genético, pode ser destacada a cultivar Frontana por ter apresentado valores insignificantes de germinação na espiga. A expressão da dormência, citada por Flintham et al. (2000), parece ser o mecanismo mais evidente, pois as notas de germinação revelaram que os menores valores estavam associados ao maior número de sementes dormentes avaliadas pelo teste de tetrazólio. O estudo comparativo entre os diferentes cultivares destacam 'Frontana' como uma cultivar diferencial, que permite separar do grupo pela constância de baixos valores, que correspondem a 0,3% de grãos germinados (Tabela 2) em Cascavel e Palotina e, notas 1,1 e 1,0 (Tabela 3), respectivamente, que corres-

**Tabela 3** – Médias de notas (NT) e notas visuais (NTV) de germinação nas espigas, nas localidades de Cascavel e Palotina, 2005

Tratamento	Cascavel		Palotina		Cascavel		Palotina	
	NT		NT		NTV		NTV	
1 BRS 177	3.6	cA	1.9	cB	2.7	dA	1.2	bB
2 BRS 208	4.7	bA	2.3	bB	3.9	cA	1.7	bB
3 BRS 210	4.0	cA	2.4	bB	3.7	cA	1.6	bB
4 CD 104	4.4	bA	1.8	cB	3.6	cA	1.4	bB
5 CD 105	5.0	bA	1.8	cB	4.6	bA	1.6	bB
6 CD 108	2.9	dA	1.3	dB	2.1	eA	1.3	cB
7 Frontana	1.1	fA	1.1	dA	1.0	gA	1.0	cA
8 IAPAR 53	1.9	eA	1.3	dB	1.4	fA	1.2	cA
9 IPR 85	4.1	cA	1.6	dB	2.7	dA	1.5	cB
10 OCEPAR18	6.5	aA	3.8	aB	6.5	aA	3.4	aB
11 ONIX	1.7	eA	1.4	dA	1.7	fA	1.2	cB
12 Trigo BR18	6.1	aA	3.8	aB	6.1	aA	3.5	aB
Média	3.8	A	2.0	B	3.3	A	1.7	B
CV								

Notas seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, para a mesma característica, não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade.

pondem a valores mínimos da escala. A capacidade de manter a dormência, mesmo submetidos às condições ótimas de germinação na espiga, destaca este mecanismo de impedimento de germinação nas espigas como o fator mais importante para o melhoramento da tolerância a germinação. Esta dormência, transferida para novos cultivares, poderá propiciar novo marco na produção de trigo, em regiões sujeitas a fatores climáticos que predisõem os grãos à germinação antes da colheita, propiciando um produto final de excelente potencial para comercialização.

O melhorando, visando à tolerância à germinação na espiga, poderá contribuir para aumentar a probabilidade de obter um produto conforme a necessidade da indústria. A obtenção de qualidade dentro de um padrão exigido pelo mercado, em quantidades que estejam próximas ao ideal, poderá garantir estabilidade nas regiões produtoras e tornar o país como um forte concorrente do mercado produtor, favorecendo a busca da auto-suficiência e aumentando a competição com os exportadores. A possibilidade de buscar a hegemonia da produção de trigo, poderá ocorrer quando a pesquisa disponibilizar cultivares mais produtivas e com melhor mecanismo de manutenção das características essenciais para os diferentes produtos derivados de trigo.

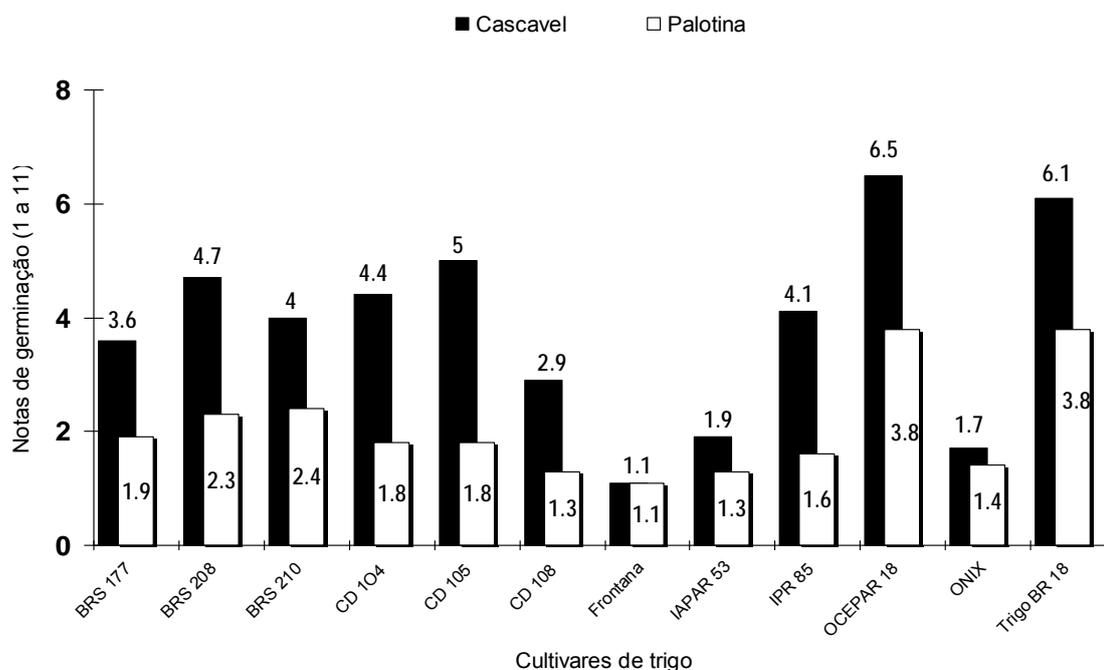
Na análise das correlações entre as características de germinação de grãos e notas de germinação, foram detectados valores que determinam uma estreita relação entre os parâmetros, o que permite a escolha da metodologia mais simples e rápida, para avaliação de tolerância à germinação na pré-colheita (Tabela 4).

Na Figura 3, as notas de germinação (NT) em duas localidades permitiu observar uma separação clara das cultivares com melhor nível tolerância. O mesmo resultado também foi observado por meio de nota visual de germinação (NTV), que não comprometeu a seleção dos genótipos mais tolerantes (Figura 4). Este procedimento possibilita a determinação da nota de germinação na primeira visão, logo após encerrar o período de molhamento, que permite fazer avaliações em um grande número de cultivares com rapidez. Os resultados com alta correlação comprovaram a utilidade deste critério de avaliação quando ocorrerem boas condições para germinação, com valores médios a altos de notas de cultivares suscetíveis.

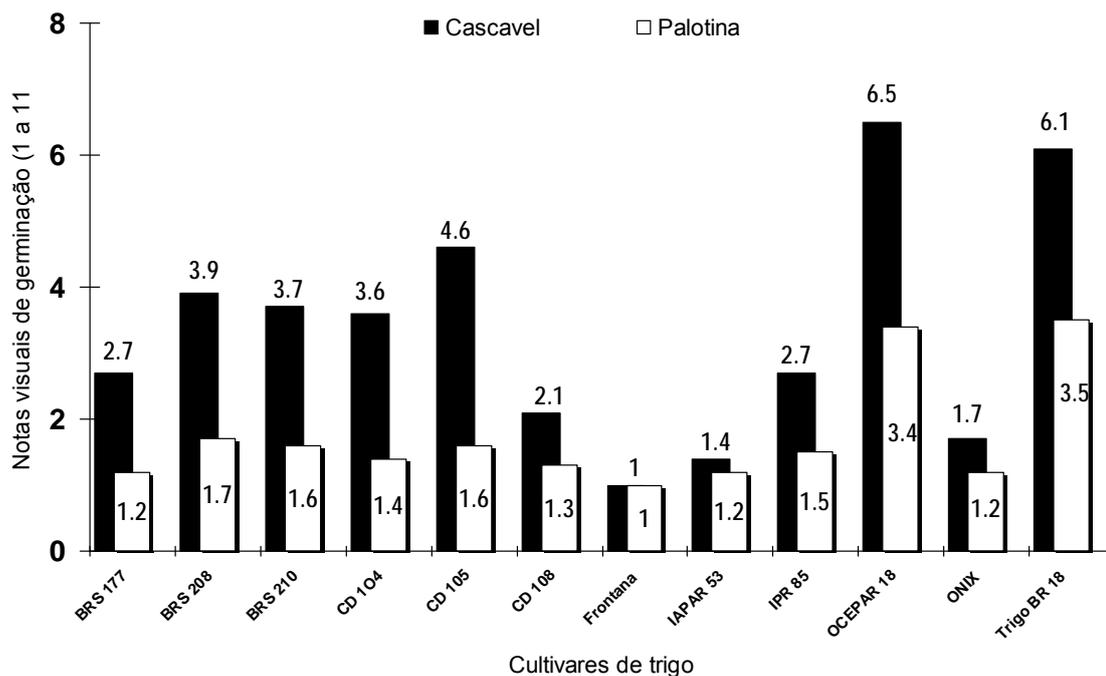
Quando as notas foram menos discriminatórias, não permitiu separar os cultivares de maior tolerância dos com tolerância parcial, mas permitiu selecionar os cultivares com maior suscetibilidade. Por meio da Figura 5, quando comparados os resultados obtidos entre as notas de germinação (NT) e notas visuais de germinação (NTV), foi possível perceber no gráfico de barras a alta correlação com notas visuais, que seguem uma distribuição perfeita. Qualquer uma das avaliações permite separar as diferentes classes de tolerância.

**Tabela 4** – Correlação das características de grãos germinados P (GGP) grãos não-germinados P (NGP), nota P (NTP) e nota visual P (NTVP) em Palotina, grãos germinados (GG), grãos não germinados (GNG), nota (NT) e nota visual (NTV) em Cascavel, 2005.

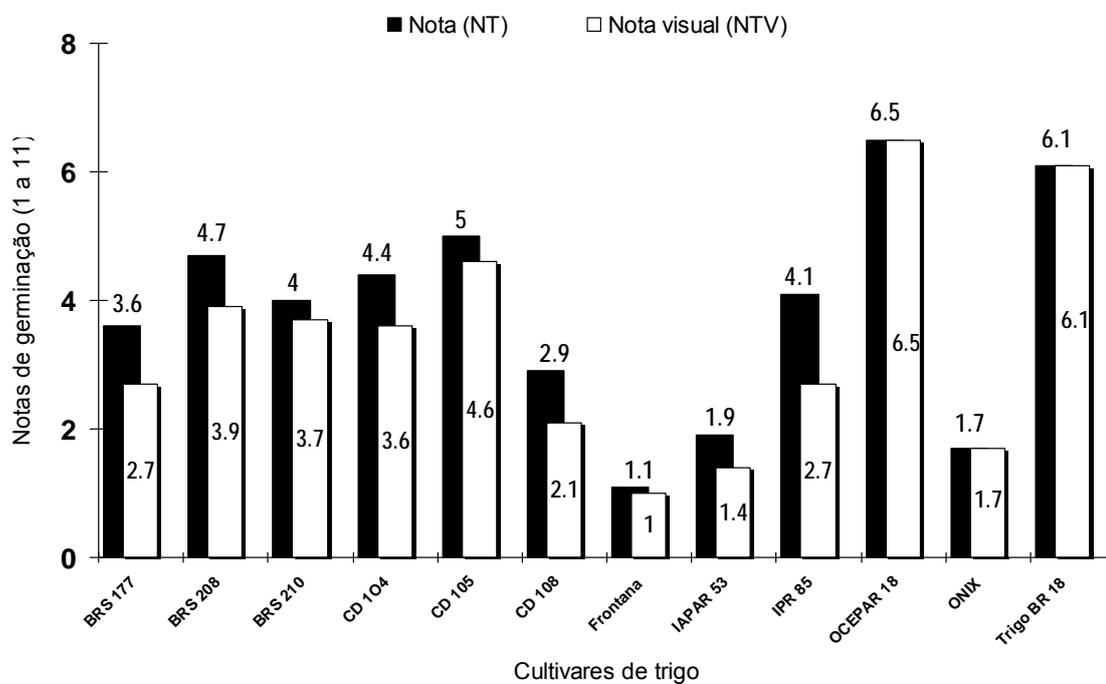
Característica	GGP	NGP	NTP	NTVP	GG	NG	NT	NTV
Grãos germinados P (GGP)	1							
Grãos não germinados P (NGP)	-1	1						
Nota P (NTP)	0.99	-0.99	1					
Nota visual P (NTVP)	0.96	-0.96	0.96	1				
Grãos germinados (GG)	0.85	-0.85	0.85	0.77	1			
Grãos não germinados (NG)	-0.85	0.85	-0.85	-0.77	-1	1		
Nota (NT)	0.87	-0.87	0.87	0.82	0.99	-0.99	1	
Nota visual (NTV)	0.93	-0.93	0.93	0.90	0.94	-0.94	0.97	1



**Figura 3** – Notas de germinação (NT) de 12 cultivares de trigo nas localidades de Cascavel e Palotina, 2005.



**Figura 4** – Notas visuais de germinação (NTV) de 12 cultivares de trigo em Cascavel e Palotina, 2005.

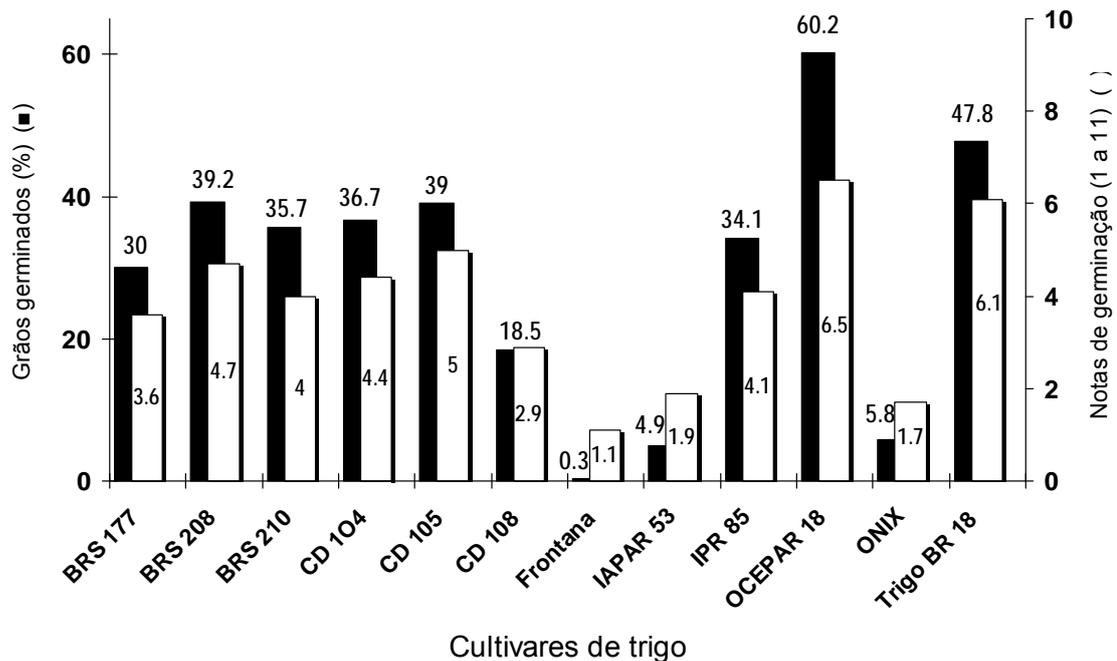


**Figura 5** – Notas de germinação (NT) e notas visuais de germinação (NTV) de 12 cultivares de trigo em Cascavel, 2005.

A metodologia de notas visuais poderá ser utilizada em um programa de melhoramento, como critério de seleção de cultivares com melhor tolerância a germinação na espiga, desde que seja adotado um maior período de tempo com chuva artificial para propiciar que ocorra a separação dos grupos com diferenças de tolerância germinação. A segurança na identificação pode ser obtida pela visualização dos resultados na Figura 5 e pela análise da correlação entre às variáveis, onde as notas de germinação visuais são semelhantes as notas determinadas com acurada checagem de emissão de radículas e coleóptilos. Este procedimento poderá possibilitar a seleção de cultivares com melhor tolerância à germinação na pré-colheita, de forma rápida e segura, uma vez que permite caracterizar as diferenças entre cultivares.

As cultivares selecionadas poderão ter vários mecanismos de restrição à germinação na espiga, como a cor vermelha de grãos, dureza de grãos, constituição dos grãos, menor atividade de alfa-amilase, maior resistência à absorção de água, maior proteção das glumas e dormência de semente. A combinação das diferentes características relacionadas com tolerância à germinação poderá propiciar a obtenção de cultivares com maior expressão da dormência, por representarem mecanismos que incrementam a resistência dos grãos à germinação no campo antes da colheita.

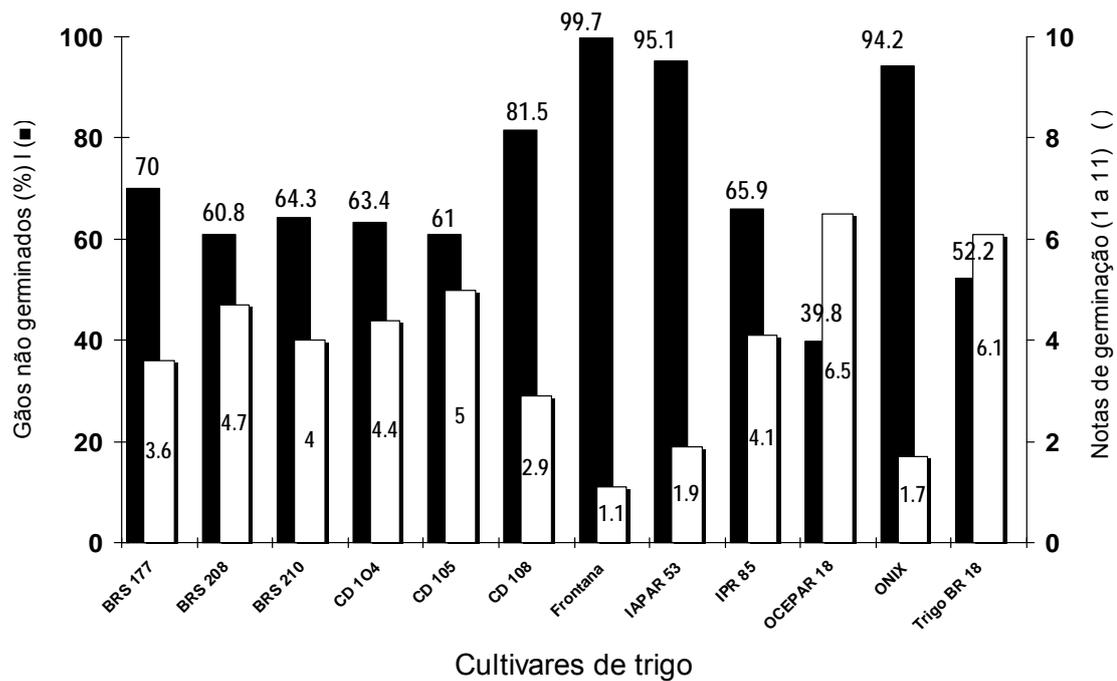
Na Figura 6, um comportamento similar também pode ser visualizado, onde a porcentagem de grãos germinados está perfeitamente ajustada aos valores de notas de germinação, isto é, o menor número de grãos germinados corresponde a menor nota de germinação. Desta forma, as notas podem substituir perfeitamente as avaliações demoradas de contagem de grãos germinados por espiga, que seriam realizadas em um período muito longo de tempo. O método da contagem de grãos germinados é muito demorado para possibilitar as avaliações com um grande número de cultivares. Por outro lado, as avaliações, através de notas de germinação, que são bastante rápidas, permitiram a determinação em um pequeno espaço de tempo em relação ao período de contagem. Na distribuição dos valores em um gráfico, ficou evidente que as duas metodologias caracterizaram os mesmos cultivares com níveis similares de tolerância. Para avaliações em grande quantidade de cultivares, as notas de germinação geram critérios extremamente rápidos e confiáveis, na



**Figura 6** – Percentagem de grãos germinados (GG) e notas de germinação (NT) de 12 cultivares de trigo em Cascavel, 2005.

separação das cultivares com melhores mecanismos para proteger os grãos de germinação no campo, antes da colheita.

Também pode ser observado na Figura 7 que ocorreu uma alta correlação negativa entre a nota visual e a percentagem de grãos não germinados, isto é, quanto maior o número de grãos sem germinação aparente menor o valor de nota de germinação. Estes valores, dispostos nos gráficos de barras com notas, favoreceram a identificação dos extremos, gerados pelas cultivares com melhor tolerância em relações aos suscetíveis. As cultivares que formaram o grupo intermediário podem ser facilmente identificadas por estarem mais próximas ao grupo tolerante ou por estarem próximas ao grupo gerado por cultivares com maior suscetibilidade. Este critério contribuiu para confirmar que a escala de notas pode ser utilizada no melhoramento genético, visando à seleção de cultivares com maior tolerância à germinação na espiga.



**Figura 7** – Percentagem de grãos não germinados (GNG) e notas de germinação (NT) de 12 cultivares de trigo em Cascavel, 2005.

## 4 CONCLUSÃO

As espigas das 12 cultivares de trigo colhidas na maturação fisiológica foram submetidas a um sistema de chuva artificial em câmara de germinação, que permitiu identificar diferenças significativas entre as cultivares.

Os resultados de menor número de grãos germinados e maior número de grãos não-germinados possibilitou identificar as cultivares Frontana, IAPAR 53, ONIX, CD 108 e IPR 85, como as de melhor nível de tolerância.

Na análise geral de todas as características avaliadas, a cultivar Frontana foi a que apresentou o melhor mecanismo de dormência, por ter expressado constantemente baixos valores de grãos germinados.

Os critérios de notas visuais de germinação na espiga permitiram fazer avaliações em um grande número de cultivares com rapidez, sem comprometer os resultados de seleção dos genótipos mais tolerantes. Este procedimento contribuiu para confirmar que a escala de notas pode ser utilizada no melhoramento genético, visando à seleção de cultivares com maior tolerância a germinação na espiga.

## CAPÍTULO III

**AVALIAÇÃO DE HERANÇA E DE MARCADORES MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA À GERMINAÇÃO NA PRÉ-COLHEITA EM TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

## RESUMO

Ao identificar marcadores moleculares para a tolerância a germinação na pré-colheita foram utilizadas as populações  $F_{2:3}$ , dos cruzamentos de Frontana/OCEPAR 18 e de Frontana/CD 105. As populações  $F_2$  e os genitores foram semeadas espaçadas para coleta das amostras de folhas, para posterior extração do DNA. Os genitores e as respectivas populações  $F_{2:3}$  foram semeados a campo, e na maturação fisiológica foram colhidas 20 espigas por tratamento. Dez espigas submeteram-se a um sistema de chuva artificial e realizadas leituras pela escala de notas de 1 a 11. As sementes não germinadas foram submetidas a um teste de tetrazólio para confirmar a existência de dormência. As populações de cada cruzamento foram separadas pelas notas e, devido a isso, determinou-se a proporção de tolerantes e suscetíveis. Dois *bulks* de plantas suscetíveis e dois de plantas resistentes usaram-se para obtenção do DNA para submeter as avaliações com os marcadores moleculares associados à dormência em trigo. As avaliações das populações segregantes revelaram a existência de um gene recessivo, com efeito epistático sobre dois genes dominantes com ação duplicada, envolvidos no controle da dormência na pré-colheita em trigo. As avaliações dos marcadores moleculares possibilitaram identificar o marcador Xbarc170 associado ao gene recessivo envolvido com a dormência de semente. Este marcador molecular poderá ser utilizado em um programa de melhoramento para eliminar as plantas suscetíveis e aumentar a probabilidade de obtenção de tolerância a germinação na pré-colheita em trigo. Novos estudos deverão ser programados para identificar os outros dois genes envolvidos com tolerância a germinação.

**Palavras-chave:** tetrazólio, dormência de sementes, marcadores moleculares, herança.

## ABSTRACT

To identify molecular markers for pre-harvest sprouting resistance  $F_{2:3}$  populations from crosses of Frontana/OCEPAR 18 and Frontana/CD 105 were used. The  $F_2$  populations and the parents were sown spaced for collecting leaf samples for DNA extraction. The parents, with respective populations  $F_{2:3}$ , were sown in the field and on the physiological maturity were harvested about 20 spikes per treatment. Ten ears were subjected to an artificial rain system and were realized reads on the 1-11 scale notes. The seeds that didn't sprout were subjected to a tetrazolium test to confirm the existence of dormancy. The populations of each cross were separated through the grades and the susceptible and tolerant proportion was determined. Two bulks of susceptible and two of resistant plants were formed to obtain DNA for subject the evaluations with molecular markers associated with dormancy in wheat. The evaluation of segregating population revealed the existence of the one recessive gene with epistatic effect over two dominant genes with duplicate action, to involved on the pré-harvested wheat dormancy control. The evaluation of molecular markers possibilited to identify the marker Xbarc170 associated with the recessive gene to involved with the seed dormancy. This molecular marker could be used in breeding programs to eliminate the susceptible plants and increase the probability for the obtention of the pre-harvest sprouting tolerance in wheat. News works must be planned to identify the others two dominant genes evolved with sprouting tolerance.

**Keywords:** tetrazolium, dormancy seeds, molecular markers, inheritance.

## 1 INTRODUÇÃO

A seleção fenotípica e seleção por marcadores moleculares devem ser utilizadas, concomitantemente, para obter maior eficiência nos programas de melhoramento. A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) poderá contribuir para o acúmulo de efeitos aditivos de QTLs, permitindo a seleção precoce para diminuir o número de plantas, possibilitando a avaliação de um número maior de progênes (GUIMARÃES, 2006). Entretanto, o marcador precisa ter estreita ligação com o QTL, ser polimórfico entre os parentais, e apresentar segregação mendeliana (DUDLEY, 1993).

Flintham e Gale (1996) relataram o primeiro caso de efeito de gene principal, com herança mendeliana para a dormência, relacionada à coloração vermelha do grão. A dormência era obtida com um simples alelo R dominante, que determinava o pigmento de cor vermelha para o grão, mesmo estando na condição de heterozigoto. O efeito da cor do grão tem importância por ter relação forte e significativa com a expressão da tolerância à germinação na pré-colheita (BASSOI e FLINTHAM, 2005).

Apesar de a tolerância à germinação na pré-colheita ser considerada como caráter quantitativo, dependente da base genética da cultivar, das condições de colheita, secagem e armazenagem, região de cultivo e das interações dos cultivares com ambiente (HAGEMANN e CIHA, 1987; KING, 1993a; ANDERSON et al. 1993a; FLINTHAM, 2000; FLINTHAM et al., 2002; BASSOI et al., 2006), Flintham (2000) indicou que a dormência pode ser excelente mecanismo para seleção com auxílio de marcadores genéticos.

Os cromossomos 3A, 3B, 3D e 4A, são considerados de maior importância que outros cromossomos para estudo de tolerância a germinação (FLINTHAM e GALE, 1996; ZANETTI et al., 2000; KATO, et al., 2001; FLINTHAM et al., 2002; OSA et al., 2003; KULWAL et al., 2004; MORI et al., 2005; BASSOI e FLINTHAM, 2005). O progresso alcançado com estudos moleculares, envolvendo marcadores de DNA, possibilitou identificar os fatores genéticos controlando o caráter dormência de semente. Através dos

marcadores moleculares, foi possível identificar e caracterizar alguns genes ou regiões nos cromossomos envolvidos com controle da dormência em trigo (ANDERSON et al. 1993a; FLINTHAM et al., 1999; ROY et al., 1999; ZANETTI et al., 2000; KATO et al., 2001).

Muitos genes afetam resistência à germinação, mas a dormência pode ser atribuída ao controle de um ou poucos genes. A tolerância à germinação na pré-colheita, controlada por um gene, é citada por Sharma et al. (1994) e Mares e Ellison (1990). Flintham e Gale (1996) ressaltaram a existência de um efeito de gene principal, com herança mendeliana, para o caráter dormência de semente em trigo de grãos vermelhos. Flintham (2000) constatou que a dormência à germinação na pré-colheita é controlada por um gene, que exerce seu efeito por meio do controle genético do embrião, independente do alelo R que determina a dormência pela cor do tegumento. Outros trabalhos têm demonstrado que a variação genética para tolerância a germinação na pré-colheita estava associada à dormência (MARES, 1996; FLINTHAM, 2000; MIURA et al., 2002; OSA et al., 2003; KULWAL et al., 2005).

Torada et al. (2005) confirmaram a existência de um QTL principal associado à dormência através de um estudo de mapeamento e validação de PCR, baseado em marcadores de microsátelite. Tan et al. (2006), ao avaliarem a base genética da dormência em trigo de grão branco, também detectaram o efeito de um QTL no cromossomo 4AL, associado com este caráter, que foi consistente nos 3 anos de testes.

O QTL de maior efeito para dormência, localizado no cromossomo 4AL, detectado no estudo conduzido por Bassoi (2002) e validado por Torada et al. (2005), pode ser o alelo do principal gene de tolerância à germinação na pré-colheita, identificado anteriormente por Flintham (2000), Kato et al. (2001) e por Flintham et al. (2002). Estas consistências de resultados na identificação da dormência geraram fortes argumentos para continuar as pesquisas em outras populações. Portanto, novas avaliações precisam confirmar esta hipótese da dormência ser controlada por um gene, identificável com marcadores moleculares, para poder usar em programas de melhoramento genéticos na obtenção de tolerância à germinação na espiga.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material genético

No período de julho de 2005, foram feitos os cruzamentos de Frontana com OCEPAR 18 e de Frontana com CD 105, na localidade de Palotina-PR, e as sementes obtidas foram colhidas em agosto. As sementes  $F_1$ , obtidas destes cruzamentos, foram semeadas em novembro, em vasos na casa de vegetação, no Centro de Pesquisa da Coodetec em Cascavel-PR (Latitude 24° 47' 21" e altitude 781 m), localizado na BR 467, km 98, para avanço de geração. Quando as plantas das populações  $F_1$  estavam com os grãos maduros, foram colhidas, trilhadas e preparadas para novo ciclo. As sementes  $F_2$  das populações dos cruzamentos de Frontana/OCEPAR 18 e de Frontana/CD 105 foram semeadas em vasos, na casa de vegetação, em fevereiro de 2006, para avanço de geração. Na fase de desenvolvimento, no início de emborrachamento, foi marcada, individualmente, cada planta. Após a identificação das plantas, coletaram-se as amostras de folhas de 250 plantas  $F_2$  por cruzamento. Os discos foliares das plantas  $F_2$ , devidamente identificados, foram congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior extração do DNA. Na fase de maturação, foram colhidas e trilhadas, individualmente, cada planta destas duas populações. Também colhidas e identificadas individualmente as outras plantas que não tiveram discos foliares coletados.

Em julho de 2006, os genitores, com respectivas plantas das populações  $F_{2:3}$ , foram semeados a campo, no Centro de Pesquisas Elói Gomes, da Coodetec, em Cascavel, em delineamento inteiramente casualizados. As parcelas foram compostas de 1 linha de 1m de comprimento, com espaçamento de 0,30m entre linhas. A semeadura realizou-se distribuindo-se 30 sementes por metro linear, para obter um mínimo de 20 plantas e propiciar espaçamento adequado entre as plantas e facilitar a colheita. As sementes receberam tratamento com inseticida imidacloprid (Gaúcho) e fungicida triadimenol (Baytan). Para toda a área, durante o período

de desenvolvimento da cultura até a fase de enchimento de grãos, fizeram-se 3 aplicações de fungicida Tebuconazole ( $750 \text{ ml há}^{-1}$ ) para o controle de doenças da parte aérea das plantas (IAPAR, 2003), mais uma aplicação na fase final para proteger as espigas de fungos. Os demais tratos culturais foram executados, conforme recomendações para a cultura do trigo.

A colheita realizou-se quando as plantas atingiram a maturação fisiológica (Figura 1). Foram colhidas ao acaso em torno de 20 espigas de plantas diferentes, de cada linha  $F_{2:3}$  e dos genitores, de tamanho e maturação semelhantes. As espigas foram secas em telado coberto, em temperatura ambiente, durante 19 dias para atingir umidade em torno de 13%.

## **2.2 Análise fenotípica**

Para as análises de teste de tolerância à germinação executou-se um experimento para avaliar as diferenças de germinação em casa de vegetação na Coodetec em Cascavel. Foi construído um simulador de chuva, programado para promover condição ideal para ocorrência de germinação na espiga de trigo. O simulador de chuva constou de uma casa de vegetação fechada com plástico, com dimensionamento de  $72,6\text{m}^2$ , com 24 bicos de micro-aspersão, do tipo micronaan-dan, de bocal roxo e rotor de médio alcance, utilizados a uma altura de 1,70m acima da mesa preparada para alocar as espigas, promovendo um alcance de 4,40m de diâmetro, quando expostos a uma pressão de 2,70bar. Os bicos distribuíram-se homogeneamente nos  $72,6\text{m}^2$ , com um raio de distância de 2,20m, um do outro, provocando uma sobreposição similar e promovendo uma chuva de 19 mm/h. A pressão do equipamento foi exercida com o auxílio de uma motobomba SCHNEIDER BC-92, com potência de 1CV, e a regulagem realizada por meio do manômetro. Para manter a pressão de água constante, utilizou-se um reservatório, tipo caixa, com capacidade de 1000 l. Este modelo corresponde a uma versão do simulador usado por Okuyama et al. (2002), método que foi idealizado para simplificar ao máximo e ao mesmo tempo possibilitar a avaliação de um grande número de genótipos. O suporte para a base do modelo foi obtido de MacMaster e Derera (1976), Svensson (1976) e Hagemann e Ciha (1984).

Para distribuir as espigas em mesas, simulando a condição de campo, foram colocados isopores de 6 cm de espessura, com perfuração eqüidistantes de 5cm, na horizontal e na vertical (Figura 1). As espigas de trigo foram colocadas, com pedúnculos cortados a 4 cm da base, inseridas 2 cm de profundidade no isopor, para manter a espiga em pé e deixando a mesma a 2 cm, para evitar contato direto da espiga com a umidade do isopor. O sistema de chuva, artificial na estufa, era ligado por uma hora, com interrupção de 15 minutos, em um período de dois dias e meio. A quantidade de chuva programada, durante o período total, foi de aproximadamente 993 mm para manter alta umidade nas espigas e no ambiente. A temperatura e a umidade relativa foram registradas durante todo o período.

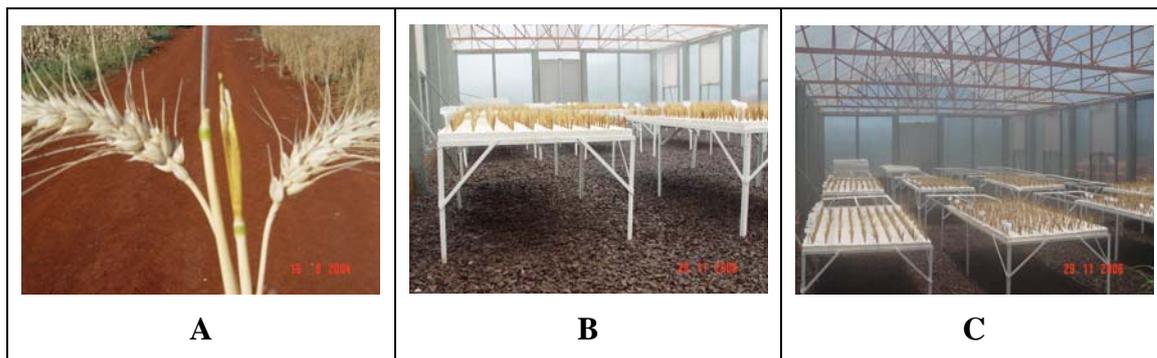
Foram utilizadas 10 espigas de cada família F<sub>2:3</sub>, e dos genitores, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado na mesa com isopor e submetidas à programação de chuva. A caracterização dos genótipos, quanto à germinação na espiga, foi realizada através de notas visual na escala de 1 a 11 de McMaster e Derera (1976). Os grãos que não germinaram submeteram-se a um teste de tetrazólio para confirmar a existência de dormência, em 4 amostras de 50 sementes. Estas foram colocadas, entre as folhas de papel toalha umedecido, durante a noite e no outro dia foram seccionadas longitudinalmente. A parte melhor de cada semente foi colocada em uma solução de tetrazólio

**Tabela 1-** Escala de notas de 1 a 11 de McMaster e Derera (1976).

---

1 - Grãos sem germinação;
2 - Emergência de radículas em 1 a 2 grãos por espiga;
3 - Radículas com 1 a 2 mm em 3 a 4 grãos por espiga;
4 - Radículas com 3 a 4 mm em 65 a 70 % dos grãos por espiga;
5 - Radículas com 3 a 6 mm em todos os grãos;
6 - Todos os grãos com radículas de 6-10 mm e 1-2 grãos por espiga com emergência de coleóptiles,
7 - Todos os grãos com radículas de 1-2 cm e mais que 2 grãos por espiga com emergência de coleóptiles,
8 - Todos os grãos com radículas de 2-4 cm e emergência de coleóptiles em todos os grãos das espigas com comprimento de 0-0,5 cm;
9 - Todos os grãos com radículas maior que 4 cm e coleóptiles em todos os grãos das espigas com comprimento de 1-2 cm;
10 - Todos os grãos com radículas maior que 4 cm e coleóptiles em todos os grãos das espigas com comprimento de 3-4 cm;
11 - Todos os grãos com radículas maior que 4 cm e todos os grãos com folhas.

---



**Figura 1-** (A) Espigas com perda da cor verde e nó do colmo verde no momento da colheita, (B e C) câmara de germinação com distribuição equidistante das espigas.

(2,3,5- trifenil cloreto de tetrazólio), em uma concentração de 0,1%, por um período de 2 horas no escuro, na câmara de germinação do tipo B.O.D., em uma temperatura de 35°C (BRASIL, 1976). Após o tratamento, as sementes foram lavadas para determinar as viáveis e as sementes mortas.

Para avaliar o potencial de germinação por população, algumas espigas foram debulhadas e os grãos utilizados para obter 4 repetições, de 100 sementes, em delineamento inteiramente casualizado, com tratamento a frio para superação da dormência. As sementes foram distribuídas em 10 linhas, com 10 sementes por linha, em duas folhas de papel-toalha umedecido com 2 vezes o peso com água destilada, e depois recobertas com mais duas folhas. As sementes foram submetidas a tratamento de pré-esfriamento, para a superação da dormência, com temperatura de 6°C, com variação de 1°C, permanecendo por um período de 5 dias (BRASIL, 1992). Os rolos de papel usados para o pré-esfriamento, foram cobertos com plástico para manter a umidade e só retirado no momento do teste de germinação na câmara de germinação do tipo B.O.D., com temperatura de 28°C. As contagens de sementes germinadas normais, anormais, mortas e dormentes, foram realizadas 5 dias após o teste.

### 2.3 Purificação de DNA e análise com marcadores moleculares

Durante a condução da população F<sub>2</sub>, foram identificadas as plantas e coletados discos foliares de 250 plantas F<sub>2</sub> de cada população, para a etapa de

mapeamento genético. Como as populações  $F_2$  eram maiores do que as 250 plantas, o restante das plantas, que não foram amostradas pela coleta de folhas, também colhidas individualmente, e incluídas na população  $F_{2:3}$ . Para estas plantas, a extração de DNA foi realizada em uma amostra de sementes  $F_3$ , após os testes de germinação, para que a mistura de sementes representassem o genótipo da planta  $F_2$ .

A extração do DNA de folhas de trigo realizou-se com base no protocolo descrito por Stein et al., (2001), com algumas modificações. Cerca de 200 a 300 mg de folhas foram maceradas na presença de  $N_2$  líquido, sendo o pó resultante transferido para tubos eppendorf. Após a adição de 1,2mL de tampão de extração [400mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 2% (p/v) CTAB, 1% (p/v) PVP e 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol], as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por uma hora. Em seguida, centrifugadas por 10 min a 12.000 rpm, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

As proteínas foram removidas pela extração com 800 $\mu$ L de clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1) por 15 minutos a 4°C, sob agitação constante, seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, transferiram-se 800 $\mu$ L do sobrenadante para novos tubos, e tratados com 5 $\mu$ L de RNase A por 15 minutos a 37°C. O DNA foi então precipitado pela adição de 560 $\mu$ L de isopropanol gelado, seguido de homogeneização e centrifugação por 20 minutos a 5.000 rpm. Após a eliminação do sobrenadante, o DNA precipitado foi lavado com 700 $\mu$ L de uma solução contendo 76% de etanol e 20% de acetato de sódio, seguida de uma segunda lavagem com uma solução contendo 76% de etanol e 10 mM de acetato de amônia. Depois de seco novamente, o DNA foi ressuscitado em 200  $\mu$ l de TE. Todas as etapas de centrifugação foram realizadas em centrífuga Eppendorf 5415C

A extração de DNA, a partir de sementes, realizou-se em uma amostra de 25 a 30 sementes de plantas  $F_{2:3}$ . A extração de DNA das sementes foi realizada com base no protocolo descrito por McDonald et al. (1994), com algumas modificações. Cerca de 50mg de sementes moídas foram colocados em tubos de microcentrífuga com 400 $\mu$ L de tampão de extração constituído de 50 $\mu$ M Tris-HCl (pH 8,0), 50mM EDTA (pH 8,0), 0,7M NaCl e 1% CTAB. Os

tubos foram levados a um grinder e agitados na velocidade de 7 ou 8 rpm, por um minuto. Em seguida, adicionaram-se mais 600 $\mu$ L de tampão de extração, homogeneizado em vortex por 30 segundos e centrifugado por 5 minutos à 13.200 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga, e centrifugado novamente por 4 minutos, e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrífuga.

As proteínas foram eliminadas pelo tratamento com 10  $\mu$ L de proteinase K (10mg/mL), deixando em banho-Maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 800 $\mu$ L de isopropanol gelado e deixado precipitar por 2 minutos e novamente centrifugado por 7 minutos à 13.200 rpm. O sobrenadante foi descartado.

Para a eliminação do RNA, acrescentaram-se 300 $\mu$ L de TE contendo 40 $\mu$ g/ $\mu$ L de RNase A, deixando-se por 30 minutos em banho-Maria a 37°C. Em seguida, adicionados 800 $\mu$ L de isopropanol gelado e deixado precipitar por 2 minutos e novamente centrifugado por 7 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante descartou-se novamente e, depois de seco, o DNA ressuspenso em 300  $\mu$ l de TE.

A concentração do DNA foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância a 260nm, sendo que cada unidade de absorbância corresponde à concentração de 50  $\mu$ g/ml de DNA fita dupla (SAMBROOK *et al.*, 1989). A integridade do DNA foi determinada em gel de agarose 0,8%, fotografado sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, Cedex 1 – France).

Os *bulks* de DNA foram formados pela mistura, em quantidades equimolares, de DNA de plantas com resultados extremos para a tolerância germinação na espiga. Foram formados dois *bulks* resistentes (contendo apenas plantas com nota 1 para a germinação na espiga) e dois *bulks* suscetíveis (contendo as notas máximas observadas para a tolerância à germinação). Cada *bulk* foi constituído de pela mistura do DNA de 5 plantas.

A amplificação dos locos de microssatélite realizou-se com as amostras de DNA em 20  $\mu$ L de solução contendo 12,5 mM de Tris-HCL (pH 8,3), 62,5 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 125  $\mu$ M de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4  $\mu$ M de cada *primer*, uma unidade da enzima

Taq DNA polimerase e 75ng de DNA. As condições de amplificação tiveram uma etapa inicial de 7 minutos a 72°C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C. Por fim, uma etapa de 7 minutos a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 7%. Depois de terminada a corrida, os géis foram submetidos à revelação com nitrato de prata e escaneados para armazenamento dos resultados.

## **2.4 Análise de dados**

As segregação das famílias  $F_{2:3}$  foi analisada pelo teste de qui-quadrado, testando-se as hipóteses genéticas para a herança do controle genético da dormência das sementes em trigo. A associação entre o marcador molecular e a dormência das sementes de trigo foi analisada pelo teste de qui-quadrado, utilizando-se uma tabela de contingência. Os dados foram analisados utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2001).

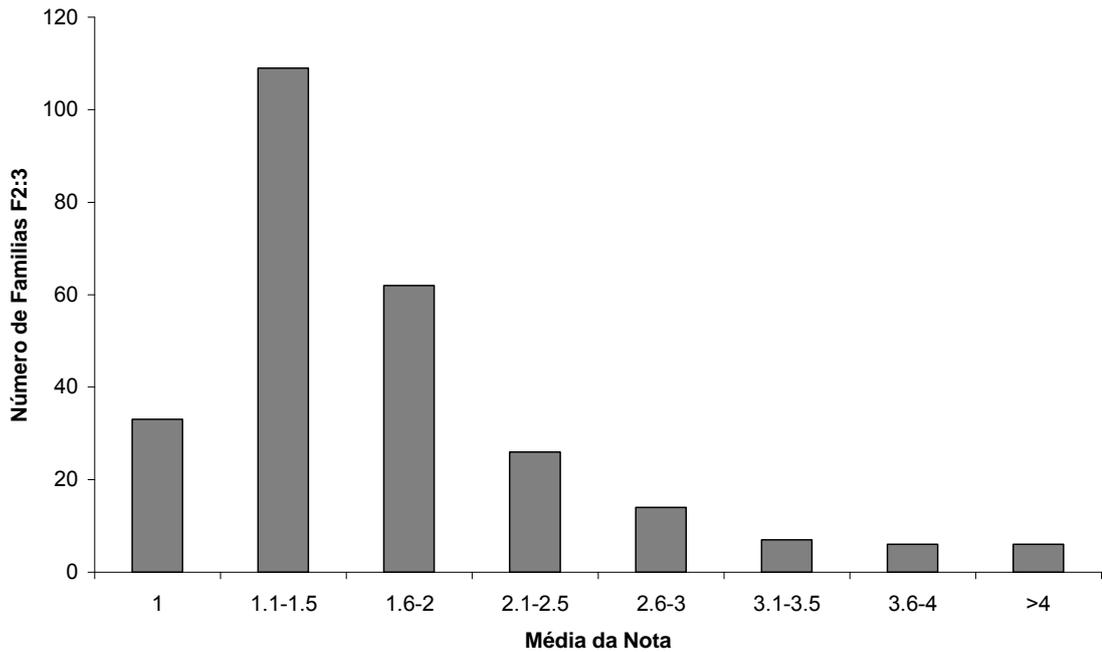
A eficiência de seleção foi obtida como o percentual de acerto na seleção com marcadores moleculares, em relação à seleção fenotípica, dividindo-se o número de plantas selecionadas corretamente pelo número total de plantas.

Para a análise das proporções genéticas e da eficiência de seleção, consideraram-se resistentes apenas as famílias  $F_{2:3}$  em que todas as plantas apresentaram nota 1. As famílias que apresentaram pelo menos uma planta com nota maior do que 1 consideraram-se suscetíveis ou segregantes.

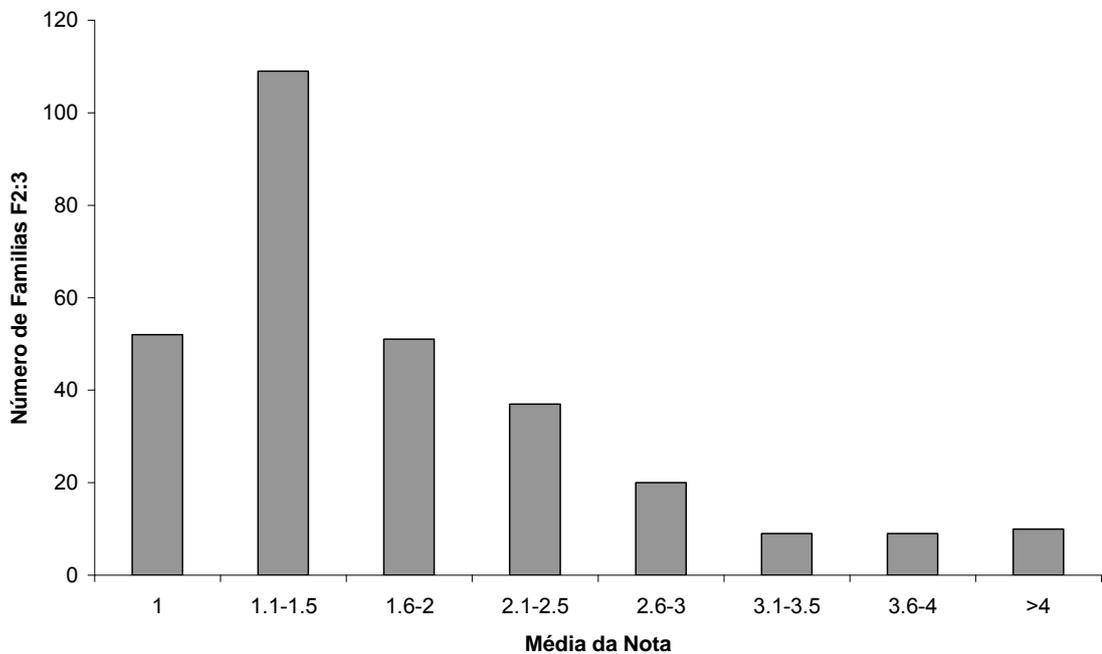
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos capítulos I e II permitiram gerar importantes informações para o desenvolvimento deste trabalho. Os testes de germinação de sementes no germinador, sem as partes das espigas, comprovou a existência de dormência na cultivar Frontana. Estes resultados confirmaram-se com a utilização das espigas nos testes de diferenciação de tolerância à germinação na pré-colheita. Os dois ambientes utilizados para caracterizar as diferenças de tolerância foram consistentes na identificação do melhor mecanismo e as duas metodologias permitiram a obtenção de resultados de alta confiabilidade. Como os testes de grãos germinados e germinação nas espigas indicaram um mesmo resultado, qualquer um poderia ser utilizado para estudos dos genes envolvidos e para identificação de marcadores moleculares associados a essa característica. Os testes de determinação de dormência de grãos em câmara de germinação são mais demorados, por isso utilizou-se a metodologia que permitiu desenvolver avaliações em um grande número de populações, utilizando a nota mínima como critério de caracterização da dormência.

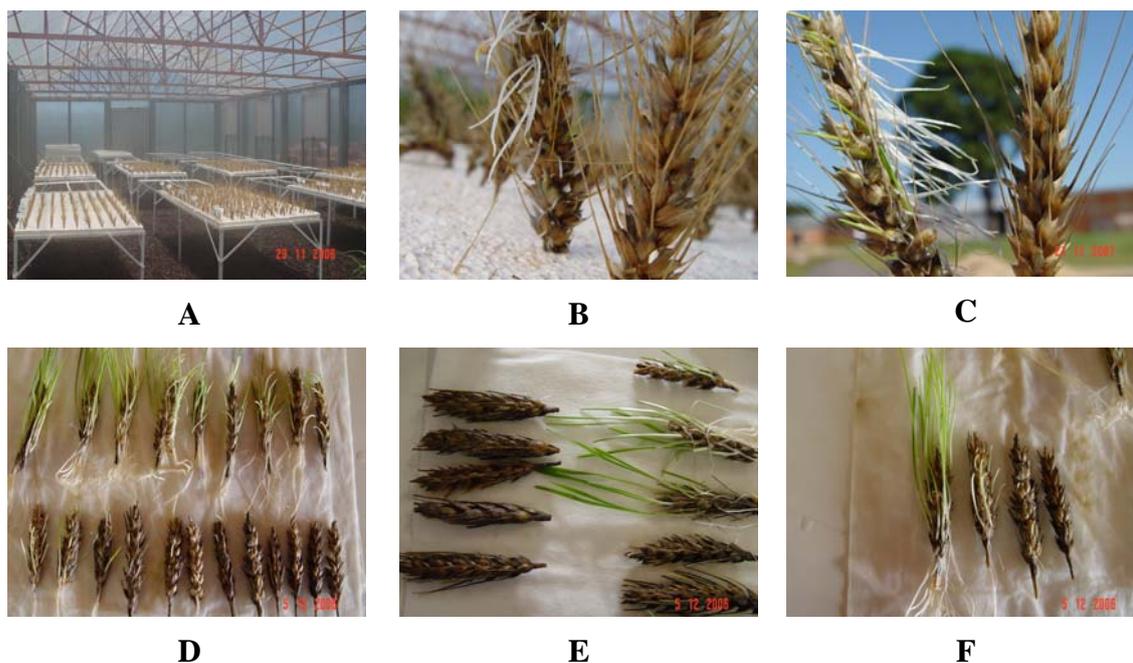
As espigas, utilizadas nas avaliações, foram colhidas na maturação fisiológica, para preservar as sementes com o máximo de dormência e com um alto potencial de reserva, para o desenvolvimento de uma nova plântula. Os resultados das avaliações de germinação na espiga, obtidos após programação de chuva artificial, revelaram notas baixas (Figuras 2 e 3) e estão indicando que as condições de ambiente foram favoráveis a manifestação do controle genético da dormência, presente no genitor tolerante à germinação na pré-colheita. Os valores foram baixos, mas permitiram distinguir os níveis de germinação entre as populações. A nota 1 para o genitor tolerante significa que nenhum dos grãos expressou germinação na espigas, apesar das condições favoráveis de chuva artificial e favorecimento de temperatura (Figura 4). Entretanto, para o genitor suscetível, praticamente todos os grãos expressaram a germinação.



**Figura 2** – Distribuição de freqüências das médias das notas de germinação na espiga em uma população F<sub>2:3</sub> obtida pelo cruzamento de Frontana/Ocepar 18. Avaliação em condição controlada em um simulador de chuva.



**Figura 3** – Distribuição de freqüências das médias das notas de germinação na espiga em uma população F<sub>2:3</sub> obtida pelo cruzamento de Frontana/CD 105. Avaliação em condição controlada em um simulador de chuva.



**Figura 4** – (A) Câmara para germinação artificial, com distribuição eqüidistante das espigas na mesa com isopor, (B e C) espigas germinadas e não germinadas e (D, E e F) espigas representando a escala de notas de 1 a 11 de McMaster e Derera (1976).

Nos testes de germinação realizados por Flintham e Gale (1996), com uma semana após a colheita na maturação, a cultivar NS 67 apresentou mais de 50% de grãos germinados em 4 dias, e a linha isogênica de grão vermelho expressou apenas 5%. Esta linha continuou a germinação, lentamente, por um período de mais de 15 dias até a chegar aos 50%, obtido no início do teste pela outra cultivar. Para as avaliações de 2 e 3 semanas após a colheita, não houve diferença de germinação, as duas linhas apresentaram rápida germinação. Todos os genótipos perderam a dormência em 3 semanas.

Nos trabalhos desenvolvidos com a cultivar Frontana, realizaram-se as avaliações praticamente 3 semanas após a colheita e não ocorreu a germinação na espiga, indicando a existência de um forte mecanismo de tolerância à germinação na pré-colheita. Este genitor tolerante, mesmo com condições propícias para germinação, gerou a nota mínima, o que caracteriza a inexistência de grão na espiga com a emissão da radícula, apesar de todas as condições favoráveis.

A não ocorrência de germinação para o cultivar Frontana confirmou que a forte dormência é um mecanismo de extrema importância para busca da

tolerância à germinação na pré-colheita em trigo. Os resultados dos testes de germinação na espiga dos dois cruzamentos possibilitaram a separação das populações com valores similares aos genitores. O baixo número de grãos germinados em algumas famílias, em ambiente altamente favorável, contribuiu para destacar um mecanismo de dormência muito forte, que pode garantir a manutenção da qualidade de semente em condições de atraso de colheita.

Outros trabalhos desenvolvidos para a avaliação da tolerância à germinação na espiga foram consistentes quando detectaram baixa germinação na espiga na cultivar Frontana (LINHARES, 1979; REIS e CARVALHO, 1989; ROSA, 1999; TONON, 2001; BASSOI, 2002 e 2004). Entre as cultivares avaliadas, 'Frontana' é citada como uma referência quanto à resistência à germinação, por apresentar os menores valores de grãos germinados. Este genótipo tem um mecanismo de dormência que garante a resistência, mesmo sendo submetido às condições extremamente favoráveis à germinação.

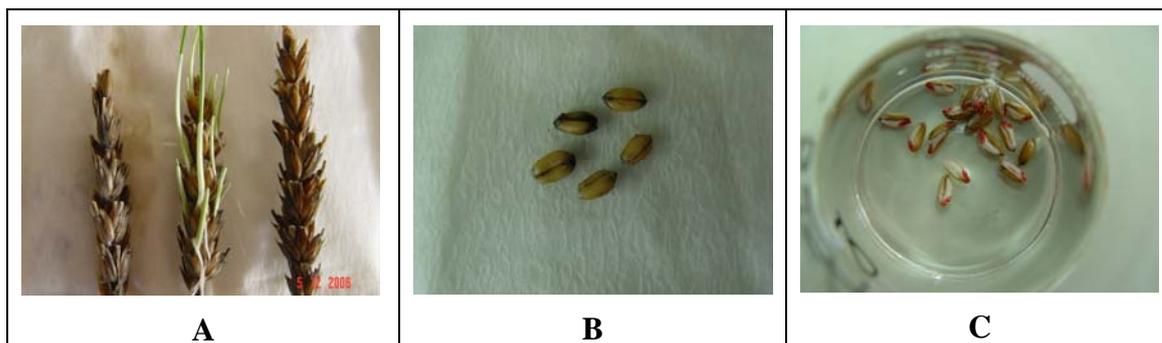
Para avaliar o potencial de germinação por população, algumas espigas foram debulhadas e os grãos utilizados para fazer um teste de germinação, com tratamento a frio para superação da dormência (Tabela 2). Os valores de germinação correspondem a um percentual de germinação normal para a cultura do trigo. Portanto, os grãos tinham bom potencial para germinação, contribuindo para obtenção de resultados favoráveis, para as análises das populações segregantes, para identificação do mecanismo responsável pelo controle da germinação na pré-colheita.

Na Tabela 2, estão relacionados os valores dos grãos que não germinaram e que foram submetidos a um teste de tetrazólio. As avaliações estão representadas na Figura 5, com as diferentes etapas da identificação das espigas sem germinação, dos grãos obtidos destas espigas debulhadas e o

**Tabela 2** – Médias dos testes de germinação (%) e tetrazólio (%) para as sementes de dois cruzamentos de trigo, Cascavel 2006.

Cruzamento	Germinação (%)		Tetrazólio (%)	
	Normal	Mortas	Dormentes	Mortas
Frontana/OCEPAR 18	94.25	5.75	88.50	11.50
Frontana/CD 105	95.25	4.75	91.26	8.74

resultado do teste de dormência. Por meio do teste de tetrazólio, é possível perceber que as sementes não-germinadas estavam com forte dormência, pois cerca de 90% destas apresentavam atividade biológica. Estes resultados, obtidos após os teste de germinação, representam alto valor e contribuem para garantir maior confiança na presença deste caráter na cultivar Frontana.



**Figura 5** – (A) Espigas sem germinação, (B) grãos dormentes e grãos submetidos ao teste de tetrazólio.

O fator mais importante para obter resistência à germinação na pré-colheita é atribuído à dormência, detectada em muitos trabalhos e confirmado no estudo envolvendo comparação de cultivares relatados no capítulo anterior. Cultivares com dormência não germinam na espiga, mesmo que ocorram ótimas condições de umidade e temperatura (BEWLEY e BLACK, 1985; POPINIGS, 1985; HILHORST, 1995; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; CASTRO et al., 2004). Esta inibição é causada por fator genético, que mantém os grãos intactos na presença de condições ótimas, e somente um período de tempo após a colheita ou a combinação de fatores ambientais superam esta barreira genética e permitem que as sementes assumam condições normais de germinação. Muitos genes afetam a tolerância à germinação na pré-colheita, mas será necessário identificar a dormência, que pode estar relacionada a um ou poucos genes.

A avaliação fenotípica das populações utilizadas foi realizada em 10 espigas de cada família  $F_{2:3}$  e também 10 espigas dos genitores. No experimento da população Frontana x Ocepar 18, todas as 10 espigas avaliadas da cultivar Frontana apresentaram nota 1. No experimento da população Frontana x CD 105, apenas uma espiga da cultivar Frontana

apresentou nota 2, e as demais apresentaram nota 1. Por outro lado, todas as espigas avaliadas das cultivares Ocepar 18 e CD 105 apresentaram nota maior do que 1.

Na avaliação das famílias  $F_{2:3}$ , foram consideradas dormentes (ou resistentes à germinação na espiga), apenas as famílias que apresentaram todas as espigas com nota 1. Famílias  $F_{2:3}$  que apresentaram pelo menos uma espiga com nota maior do que 1 foram consideradas suscetíveis ou segregantes. Por este motivo, a proporção observada de famílias  $F_{2:3}$  consideradas resistentes deve ser proveniente de plantas  $F_2$  homozigotas, pois a presença de locos em heterozigose resultaria em famílias  $F_{2:3}$  segregantes. As proporções esperadas de famílias  $F_{2:3}$  resistentes:suscetíveis estão ilustradas no anexo 1. As proporções genéticas apresentadas no anexo 1 consideram resistentes apenas famílias  $F_{2:3}$  provenientes de plantas  $F_2$  homozigotas, e suscetíveis às famílias derivadas de plantas  $F_2$  homozigotas suscetíveis ou heterozigotas.

Na população derivada do cruzamento Frontana x CD 105, foram obtidas 52 famílias resistentes (todas as plantas com nota 1) e 243 famílias suscetíveis (pelo menos uma planta com nota maior do que 1). Nenhuma hipótese que considerasse a presença de um ou dois genes pôde ser aceita com estas proporções esperadas. Os dados obtidos se ajustaram a proporção 11:53, que pelo desenho experimental utilizado, se ajustam a hipótese de herança de três genes, sendo dois genes dominantes de ação duplicada e um gene recessivo epistático aos primeiros ( $P=84,14\%$ ) (Tabela 3).

Considerando-se a hipótese de herança de dois genes dominantes com ação duplicada, e um gene recessivo epistático aos primeiros, a proporção esperada de famílias  $F_{2:3}$  resistentes:suscetíveis, pelo critério utilizado no desenho experimental, é de 7R:57S. No entanto, na descendência das plantas  $F_2$  com genótipo AaBbcc, espera-se obter a proporção de 15R:1S. Ao avaliar 10 plantas  $F_{2:3}$  descendentes de uma planta  $F_2$  com genótipo aaBbCc, a probabilidade de obter pelo menos uma planta suscetível (aabbcc) é de 52,4%, e a probabilidade de não obter nenhuma planta suscetível é 47,6%. Assim, existe probabilidade de que a descendência das plantas  $F_2$  com genótipo aaBbCc apresentem todas resistentes, ao se avaliar apenas 10, considerando-

se que os genes B e C são dominantes e de ação duplicada e o gene A é recessivo. Neste caso, a proporção esperada é de 11R:53S.

Nas populações derivadas do cruzamento Frontana x Ocepar 18, foram obtidas 32 famílias resistentes (todas as plantas com nota 1) e 226 famílias suscetíveis (pelo menos uma planta com nota maior do que 1). Os dados observados se ajustaram à proporção genética de 7R:57S (P=45,07%) indicando a herança de três genes, sendo dois genes com ação duplicada, e um gene com ação epistática sobre os primeiros. Uma vez que apenas plantas F<sub>2</sub> homocigotas (e respectivas famílias F<sub>2:3</sub>) foram consideradas resistentes, não é possível saber a relação de dominância dos genes.

Uma vez que tanto CD 105 quanto Ocepar 18 são suscetíveis à germinação na espiga, e que em ambas as populações (Frontana x Ocepar 18 e Fontana x CD 105) a hipótese de três genes foi aceita, é de se esperar que sejam os mesmos genes que segreguem em ambas as populações. Neste caso, a herança da resistência na população Frontana x Ocepar 18 também deve ser de dois genes dominantes de ação duplicada, e um gene recessivo epistático aos primeiros. Em ambas as populações, se considerarmos que metade das famílias F<sub>2:3</sub> descendentes de plantas F<sub>2</sub> com genótipo AaBbcc apresentem pelo menos uma planta suscetível, e metade não apresente nenhuma plantas suscetível, a mesma hipótese é aceita (proporção esperada de 9:55) com  $\chi^2$  igual a 2,07 (P=14,96%) na população Frontana x Ocepar 18, e  $\chi^2$  igual a 3,1017 (P=7,82) na população Frontana x CD 105.

Após a determinação dos genes, envolvidos com a dormência na pré-colheita em trigo, foi estabelecida uma estratégia para localização através de

**Tabela 3** – Proporções observadas e esperadas, e teste de hipótese para a herança da tolerância a germinação na espiga (dormência) em sementes de trigo, em populações F<sub>2:3</sub> derivadas dos cruzamentos entre as cultivares Frontana x Ocepar 18 e Frontana x CD 105.

População	Classe	Famílias F <sub>2:3</sub> observadas	Esperado		$\chi^2$	Prob.(%)
			Proporção	Valor		
Frontana/ OCEPAR 18	Nota 1 (R) Nota > 1 (S)	32 226	7/64 57/64	28,2187 229,7812	0,5689	45,07
Frontana/ CD 105	Nota 1 (R) Nota > 1 (S)	52 243	11/64 53/64	50,7031 244,2968	0,04	84,14

marcadores moleculares. Foram escolhidos 81 marcadores microssatélites e STSs, através das informações dos resultados na revisão de literatura, e distribuídos nos 21 cromossomos do trigo, na análise de *bulks* de DNA de plantas F<sub>2</sub> contrastantes para a característica, na população Frontana x Ocepar 18. A composição dos *bulks* está apresentada na Tabela 4. Foram utilizados dois *bulks* de DNA de plantas F<sub>2</sub> cujas famílias F<sub>2:3</sub> apresentaram todas as plantas com nota 1 (*bulks* R), e dois *bulks* de DNA de plantas F<sub>2</sub>, cuja média das famílias estivesse entre as mais altas observadas (*bulks* S).

**Tabela 4** - Notas de germinação na espiga, obtida em ambiente controlado, das espigas das plantas utilizadas para a formação dos *bulks* de DNA de plantas resistentes (R) e suscetíveis (S), da população derivada de Frontana X OCEPAR 18.

<i>Bulk</i> R1		<i>Bulk</i> R2		<i>Bulk</i> S1		<i>Bulk</i> S2	
Sulco	Nota	Sulco	Nota	Sulco	Nota	Sulco	Nota
150	1	140	1	30	5.1	55	3.9
153	1	197	1	65	5.9	59	3.9
198	1	220	1	167	4.6	67	3.7
230	1	245	1	176	6.4	88	4.6
232	1	253	1	181	5.2	136	4.0
Média	1	Média	1	Média	5.44	Média	4.02

Para identificar/validar marcadores moleculares associados à tolerância à germinação na pré-colheita, foram avaliados marcadores microssatélites e STS, especialmente, nos cromossomos 4A, 3A, 3B e 3D, onde as evidências de genes de tolerância à germinação na espiga são mais fortes (FLINTHAM e GALE, 1996; ZANETTI et al., 2000; KATO, et al., 2001; FLINTHAM et al., 2002; OSA et al., 2003; MORI et al., 2005; BASSOI e FLINTHAM, 2005; KULVAL, et al., 2005; TORADA et al., 2005; TAN et al., 2006). Apesar da constância de resultados descritos nestes trabalhos, apenas o *primer* Xgwm397, mapeado na região descrita do cromossomo 4A, foi polimórfico nos *bulks* avaliados. Na etapa seguinte, foram reunidas as amostras de DNA das plantas segregantes F<sub>2</sub> e submetidas às avaliações com esse marcador para determinar as plantas resistentes e suscetíveis à germinação na espiga. No entanto, o produto da amplificação do DNA, com este *primer*, não permitiu discriminar os indivíduos homocigotos para o alelo proveniente de Frontana dos indivíduos heterocigotos

(Figura 6).

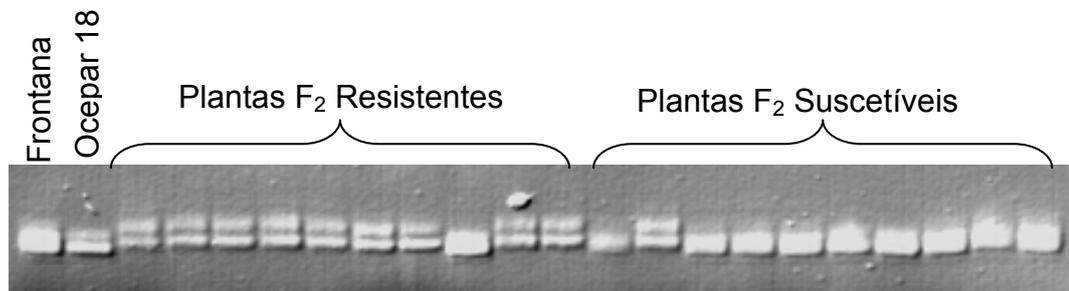


Figura 6 – Padrão de amplificação das amostras de DNA com o *primer* microsatélites Xgwm397. Não é possível distinguir plantas heterozigotas de plantas homozigotas para o genótipo de Frontana.

Na mesma região genômica do marcador Xgwm397, estão mapeados os marcadores Xbarc170 e Xbarc343 (Song et al., 2005). Estes marcadores também foram polimórficos nos *bulks* e na população, porém para o marcador Xbarc343 a identificação correta do genótipo em cada indivíduo da população também não é fácil de ser obtida. Para o marcador Xbarc170, por outro lado, os genótipos foram claramente definidos em todos os indivíduos da população (Figura 7).



Figura 7 – Padrão de amplificação das amostras de DNA com o *primer* microsatélites Xbarc170.

A análise conjunta dos genótipos obtidos no marcador Xbarc170, e os fenótipos obtidos no ensaio de germinação dos grãos na espiga de trigo em condições controladas, através de uma tabela de contingência, demonstrou haver associação entre o loco marcador e a expressão fenotípica da dormência

**Tabela 5** – Tabela de contingência para análise da associação entre o marcador Xbarc170 e a tolerância à germinação na pré-colheita em trigo em uma população F<sub>2:3</sub> derivada do cruzamento de Frontana com Ocepar 18.

Genótipo do marcador Xbarc170	Tolerante	Suscetível	TOTAL
Homozigoto Frontana	24	65	89
Heterozigoto	5	84	89
Homozigoto Ocepar 18	3	77	80
TOTAL	32	226	258

$\chi^2=26,66$ , GL = 2, P=0,0001%

das sementes de trigo (Tabela 5). Este marcador está associado ao gene recessivo que controla a dormência no cultivar Frontana, localizado no cromossomo 4A, e possibilitou uma alta eficiência na seleção de plantas suscetíveis.

Nos dados apresentados na Tabela 5, obtidos através da utilização do marcador Xbarc170, apenas 24 famílias F<sub>2</sub>, que apresentaram o genótipo homozigoto para a cultivar Frontana, tiveram notas de tolerância à germinação na pré-colheita. E as outras 65 plantas F<sub>2</sub> com o genótipo deste cultivar, que correspondem a um percentual de 73 %, foram de populações F<sub>2:3</sub> com notas que caracterizavam suscetibilidade. Já para as plantas com genótipo heterozigoto, 94,4% das famílias são suscetíveis, e entre as plantas com genótipo homozigoto para o alelo de Ocepar 18, 96,25% das plantas são suscetíveis. Isso indica que o alelo proveniente de Frontana, no gene ligado ao marcador Xbarc170 é recessivo, uma vez que o fenótipo das plantas heterozigotas e homozigotas para Ocepar 18 apresentam o mesmo fenótipo. Se estas duas classes forem reunidas (heterozigotas mais homozigotas para Ocepar 18), teremos 169 plantas, das quais 95,3% são suscetíveis.

O estudo de herança do caráter dormência de sementes em trigo, na população derivada do cruzamento entre as cultivares Frontana e Ocepar 18, demonstrou que a dormência é controlada por três genes, sendo dois de ação duplicada e um epistático aos dois primeiros. Considerando a avaliação conjunta da população obtida pelo cruzamento Frontana e CD 105, o estudo de herança indicou que os dois genes de ação duplicada são dominantes e o gene epistático é recessivo. Ou seja, se considerarmos que os genes A, B e C sejam responsáveis pelo controle genético da dormência das sementes de trigo, as plantas homocigotas resistentes devem ter genótipo aaBBCC, aaCC ou aaBB. Como o gene marcado pelo marcador Xbarc170 é o recessivo (aa), as plantas que contêm este gene devem ter também, pelo menos, um dos outros dois genes (BB ou CC) para serem homocigotas resistentes. Isso explica a grande quantidade de plantas suscetíveis entre o grupo de plantas homocigotas para o genótipo de Frontana, no marcador Xbarc170.

Já as plantas que não possuem o genótipo homocigoto para a cultivar Frontana são suscetíveis, pois o gene recessivo aa é epistático e, mesmo na presença dos outros genes, ele é necessário para conferir a dormência. A falta deste gene, ligado ao marcador Xbarc170, é suficiente para que a planta seja suscetível.

Por meio do marcador Xbarc170, é possível eliminar a maior parte das plantas suscetíveis, possibilitando reunir maior número de plantas com a característica de tolerância à germinação na pré-colheita. Na população de Frontana e OCEPAR 18, das 258 famílias avaliadas, 169 seriam eliminadas pelo marcador, e apenas 89 precisariam ser avaliadas fenotipicamente. As avaliações precisariam ser feitas apenas em 34,5% das famílias, correspondendo a aproximadamente um terço do total do trabalho necessário para identificar as plantas tolerantes. Esse processo garante que todas as famílias selecionadas apresentem as sementes dormentes, pois a seleção final fenotípica poderia identificar as 24 famílias com a característica de tolerância desejada pela presença dos 3 genes. Neste esquema, seriam eliminadas na seleção pelo marcador somente 5 famílias com dormência, por não ter oportunidade de serem avaliadas fenotipicamente, gerando uma taxa de erro muito baixa. Este processo reduz para apenas um terço a avaliação fenotípica de famílias e possibilita a eliminação de 100% das famílias suscetíveis.

O marcador Xbarc170 pode ser utilizado, então, como uma ferramenta de seleção negativa. Pode-se utilizar o marcador para eliminar as plantas suscetíveis (com 95,3% de eficiência de seleção), e avaliar fenotipicamente as que apresentam o genótipo de Frontana neste marcador. Esta estratégia deverá ser utilizada, até que sejam identificados os marcadores para os outros genes.

A população de mapeamento avaliada apresentou uma distorção de segregação no loco do marcador Xbarc170. Em uma população  $F_2$ , espera-se obter uma proporção de 1:2:1 de genótipos Homozigoto Dominante:Heterozigoto:Homozigoto Recessivo. Na população utilizada, foram observadas 80:89:89 plantas para estes três genótipos ( $\chi^2=25,43$   $P=0,0002\%$ ).

Distorção de segregação tem sido verificada em outros trabalhos. Silva et al. (2007) relataram distorção de segregação para marcadores microsatélites ligados a QTLs de resistência da soja ao nematídeo de cisto da soja. O mesmo também já havia sido verificado por Webb et al. (1995) e Wang et al. (2004) também para marcadores microsatélites ligados à resistência ao nematídeo de cisto da soja. Kopsisch-Obuch e Diers (2006) relataram algumas causas para esta distorção de segregação, como a seleção gamética, aborto de sementes durante o desenvolvimento, e seleção durante a emergência da semente e do desenvolvimento da planta.

Considerando que o gene de tolerância ligado ao marcador Xbarc170 apresente a mesma distorção de segregação, e que a segregação observada foi de 1:1:1 de genótipos Homozigoto Dominante:Heterozigoto:Homozigoto Recessivo ( $\chi^2=0,6279$   $P=73,05\%$ ), as proporções esperadas, para o estudo de herança, apresentadas no anexo 1, devem ser divididas por 2 para todos os genótipos heterozigotos para o gene A (considerando que o gene A é o gene ligado ao marcador Xbarc170). Neste caso, as proporções esperadas para a hipótese de herança de três genes, sendo dois genes dominantes de ação duplicada, e um gene recessivo epistático, são 7R:41S, se considerarmos que as famílias derivadas de aaBbCc apresentem pelo menos uma planta suscetível.

Mesmo considerando esta distorção de segregação, a população derivada do cruzamento Frontana x Ocepar 18 ainda segrega conforme esperado para três genes, considerando a hipótese de dois genes dominantes

de ação duplicada, e um gene recessivo epistático ( $\chi^2=0,9845$  P=32,11%). Para a população derivada do cruzamento entre Frontana X CD 105, considerando que ao avaliar 10 plantas por família, metade das famílias F<sub>2:3</sub> derivadas de plantas F<sub>2</sub> com genótipo aaBbCc não apresente nenhuma espiga com nota maior do que 1, e metade apresente pelo menos uma espiga suscetível (proporção esperada de 9:39), a mesma hipótese também é aceita ( $\chi^2=0,2441$ , P=62,12%). Assim, mesmo com a distorção de segregação observada neste loco, o estudo de herança continua a indicar a herança de três genes, sendo dois dominantes de ação duplicada e um recessivo epistático aos dois primeiros.

Esta importante identificação do marcador Xbarc170, associado a um gene recessivo para a dormência, poderá trazer grande esperança para o melhoramento genético incrementar a tolerância à germinação na pré-colheita e se transformar em uma potente ferramenta para uso de marcador genético na eliminação de plantas com problemas de germinação. Estes resultados representam uma grande contribuição, por propiciar os avanços de incremento de tolerância, por formar fortes barreiras contra a germinação na espiga antes da colheita e garantir a manutenção da qualidade industrial. O sucesso da cultura poderá ser alcançado em curto espaço de tempo, reduzindo, principalmente, a necessidade de importar grandes quantidades de trigo e possibilitando maior segurança na produção e na obtenção de um produto de maior valor comercial. Este mecanismo poderá contribuir com a segurança necessária para aumento de área e incremento na média de produtividade, nas regiões com problemas de germinação na espiga.

Esta consistência de resultados, na identificação de marcador para dormência, formou forte argumento para continuar as investigações de outros marcadores, que poderiam estar ligados aos outros dois genes dominantes, mas com efeitos duplicados, que poderão auxiliar os programas de melhoramento genéticos para obtenção de tolerância à germinação na pré-colheita.

## 4 CONCLUSÃO

As avaliações das populações segregantes, das cruzas de Frontana com OCEPAR 18 e com CD 105, revelaram a existência de um gene recessivo e dois genes dominantes envolvidos no controle de dormência na pré-colheita em trigo. Os dois dominantes possuem efeito duplicado, e o recessivo é epistático aos dominantes.

Foi identificada a associação do marcador Xbarc170, localizado no cromossomo 4A, com o gene recessivo.

O marcador molecular Xbarc170 poderá ser utilizado em um programa de melhoramento para eliminar as plantas suscetíveis e aumentar a probabilidade de obtenção da tolerância à germinação na pré-colheita em trigo.

Novos estudos deverão ser programados para identificar os outros dois genes dominantes envolvidos com tolerância à germinação na pré-colheita em trigo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, R.E.; VOGEL, O.A. Monosomic analysis of red seed color in wheat. **Crop Science**, v.5, p.474-475, 1965.

ANDERSON, J.A.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D. Molecular markers for pre-harvest sprouting resistance in wheat. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PRE-HARVEST SPROUTING IN CEREALS, 6., 1993 St. Paul. **Proceedings...** Walker-Simmons, M.K. and Ried, J.L., Eds. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, 1993a. p.121-128.

ANDERSON, J.A.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D. RFLP Analysis of Genomic Regions Associated with Resistance to Preharvest Sprouting in Wheat. **Crop Science**, v.33, p.453-459, 1993b.

ANDREOLI, C.; BASSOI, M.C.; BRUNETTA, D. Genetic control of seed dormancy and pre-harvest sprouting in Wheat. **Science Agricultural**, v.63, n.6, p.564-566, 2006.

BARNARD, A.; DEVENTER, C.; MAARTENS, H. Genetic variability of preharvest sprouting – the South African situation. **Euphytica**, v.143, n.3, p.291-296, 2005.

BASSOI, M.C. Introdução ao problema da germinação pré-colheita em trigo no Brasil. In: CUNHA, G.R. & PIRES, J.L.F. (Ed.). **Germinação pré-colheita em trigo**. Passo Fundo, 2004. p.21-136.

BASSOI, M.C. **Quantitative trait analysis of grain dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell)**. 2002. 240 f. Thesis (Ph.D. in Biotechnology Plant Breeding) – John Inns Centre & University of East Anglia, Norwich, UK, 2002.

BASSOI, M.C.; FLINTHAM, J. Relationship between grain colour and preharvest sprouting-resistance in wheat. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.10, p.981-988, 2005.

BASSOI, M.C.; FLINTHAM, J.; RIEDE, C.R. Analysis of preharvest sprouting in three Brazilian wheat populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.4, p.583-590, 2006.

BELDEROK, B. Changes in the seed coat of wheat kernels during dormancy and after-ripening. **Cereal Research Communications**, v.4, p.165-171, 1976.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seed**: physiology of development and germination. New York, Plenum Press, 1985. 367p.

BORÉM, A. Aplicação dos Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas. In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, 2006. p.79-106.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Manual do teste de tetrazólio em sementes**. Brasília, DF: AGIPLAN, 1976. 85p.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, 2006, p.9-78.

CARDLE, L.; RAMSAY, L.; MILBOURNE, D.; MACAULAY, M.; MARSHALL, D.; WAUGH, R. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. **Genetics**, v. 156, p.847-54, 2000.

CARVALHO, N.M.de; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre, 2004. p.149-162.

CLARKE, J.M. Time of physiological maturity and post-physiological maturity drying rates in wheat. **Crop Science**, v.23, p.1203-1205, 1983.

CLARKE, J.M.; CHRISTENSEN, J.V.; DePAUW, R.M. Effect of weathering on falling numbers of standing and windrowed wheat. **Canadian Journal of Plant Science**, v.64, p.457-463, 1984.

CRUZ, C. M. **Programa Genes**. Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 422 p.

CUNHA, G.R.; PIRES, J.L.F.; PASINATO, A. Introdução ao problema da germinação na pré-colheita em trigo no Brasil. In: CUNHA, G.R. & PIRES, J.L.F. (Ed.). **Germinação pré-colheita em trigo**. Passo Fundo, 2004. p.11-20.

DERERA, N.F. The audit of sprouting. **Cereal Research Communications**, v.8, p.15-22, 1980.

DERERA, N.F.; BHATT, G.M.; McMASTER, G.J.. On the problem of preharvest sprouting of wheat. **Euphytica**, v.26, p.299-308, 1977.

DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Sciences**, v.33, p.660-668, 1993.

ELLIS, M.; SPIELMEYER, W.; K. GALE, K.; G. REBETZKE, G.; R. RICHARDS, R. Perfect markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, n.6-7, p.1038-1042, 2002.

FELÍCIO, J.C.; CAMARGO, C.E.de O.; GERMANI, R.; FREITAS, J.G. Rendimento e processo germinativo do grão na espiga de genótipos de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n.3, p.1-9, 2002.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA. D. Genética de Associação em Plantas. In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, 2006. p.273-306.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA. D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEM, Documento 20).

FLINTHAM, J.E.; GALE, M.D. Genetics of pre-harvest sprouting and associated traits in wheat: review. **Plant Varieties & Seeds**, v.1, p.87-97, 1988.

FLINTHAM, J.E. Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat. **Seed Science Research**, v.10, p.43-50, 2000.

FLINTHAM, J.E.; ADLAM, R.E.; GALE, M.D. Seedcoat and embryo dormancy in wheat. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PRE-HARVEST SPROUTING IN CEREALS, 8., Detmold, 1999. **Proceedings...** Weipert, D., Ed. Association of Cereal Research and Federal Centre for Cereal, Potato and Lipid Research, Detmold, Germany, 1999. p.67-76

FLINTHAM, J.E.; BÖRNER, A.; WORLAND, A.J.; GALE, M.D. Optimizing wheat grain yield: effects of *Rht* (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. **Journal of Agricultural Science**, v.128, p.11-25, 1997.

FLINTHAM, J.E.; GALE, M.D. Dormancy gene maps in homoeologous cereal genomes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PRE-HARVEST SPROUTING IN CEREALS, 7., 1996, Abashiri-shi. **Proceedings...** Abashiri-shi, Japan. Osaka: Edited by K. Noda, D.J. Mares, Center for Academic Societies, 1996. p.143-149.

FLINTHAM, J.E.; GALE, M.D. The Tom Thumb Dwarfing Gene, *Rht3* in Wheat, I. Reduced Pre-harvest Damage to Breadmaking Quality. **Theoretical and Applied Genetics**, v.62, p.121-126, 1982.

FLINTHAM, J.E.; ADLAM, R.; BASSOI, M.C.; HOLDSWORTH, M.; GALE, M.GRUS, V.M. Mapping genes for resistance to sprouting damage in wheat. **Euphytica**, v.126, p.39-45, 2002.

FRANCO, F. de A.; BRUNETTA, D.; DOTTO, S.R. **Ocorrência de germinação na espiga em cultivares de trigo no Oeste do Paraná no período de 1993 a 1995**. 1996. 8p. (Mimeo) Trabalho apresentado na XII Reunião da Comissão Centro-Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo, Londrina, PR. 1996.

FRANCO, F. de A. e CARVALHO, F.I.F. Estimativa do progresso genético no rendimento de grãos de trigo e sua associação com diferentes caracteres sob o efeito de variações de ambiente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n.3, p.1-9, 1985.

GATFORD, K.T. **Seed Dormancy Mechanisms In Diploid Wheat (*Triticum tauschii* Coss. Schmalh.)**. 2004. 224 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – School of Agriculture and Food Systems, Institute of Land and Food Resources, University of Melbourne, Melbourne, USA, 2004.

GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* using DNA probes and specific primers. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.20-27, 2002.

GRODZICKER T.; WILLIAMS J.; SHARP P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor. **Symposium Quantitative Biology**, v.39, p.439-446, 1974.

GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J.V.; SOUZA JUNIOR, C.L. Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas. In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, 2006. p.107-144.

HAGEMANN, M. G.; CIHA, A. J. Evaluation of methods used in testing winter wheat susceptibility to preharvest sprouting. **Crop Science**, v.24, p.249-254, 1984.

HAGEMANN, M.G.; CIHA, A.J. Environmental x Genotype Effects on Seed Dormancy and After-Ripening in Wheat. **Agronomy Journal**, v.79, p.192-196, 1987.

HANFT, J.M.; WYCH, R.D. Visual indicators of physiological maturity in hard red spring wheat. **Crop Science**, v.22, p.584-587, 1982.

HILHORST, H.W.M. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Science Research**, v.5, p.1-73, 1995.

HIMI, E.; NISAR, A.; NODA, K. Color genes (R and Rc) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat. **Genome**, v.48, p.747-754, 2005.

HIMI, E.; SATO, N.; KATO, K.; AMANO, Y. Detection of chromosomes carrying genes for seed dormancy of wheat using the backcross reciprocal monosomic method. **Plant Breeding**, v.106, p.1491-1496, 2002.

HIMI, E.; MARES, D.J.; YANAGISAWA, A.; NODA, K. Effect of grain colour gene (R) on grain dormancy and sensitivity of embryo to abscisic acid (ABA) in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1569-1574, 2002.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Informações Técnicas para as culturas do trigo e triticales no Paraná 2003**. Londrina, 2003. 202p. (IAPAR, Circular, 126).

JACOBSEN, J.V.; BEACH, L.R. Control of transcription of  $\alpha$ -amylase and RNA genes in barley aleurone protoplast by gibberillin and abscisic acid. **Nature**, v.316, p.275-277, 1985.

KATO, K.; NAKAMURA, W.; TABIKI, T.; MIURA, H.; SAWADA, S. Detection of loci controlling seed dormancy on group 4 chromosomes of wheat and comparative mapping with rice and barley genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.980-985, 2001.

KETTLEWELL, P.S.; COOPER, J.M. Field studies on  $\alpha$ -amylase activity of wheat grain in the absence of sprouting: relationship with grain drying rate and with nitrogen fertilizer application. **Cereal Research Communications**, v.26, p.354-361, 1991.

KHAN, A.A. Cytokinins: permissive role in seed germination. **Science**, v.171, p.853-859, 1971.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York, 1995. 491p.

KING, R.W. Manipulation of grain dormancy in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.1059-1066, 1993a.

KING, R.W. Physiology of sprouting resistance. In: PREHARVEST FIELD SPROUTING IN CEREALS, 1989, Boca Raton. **Proceeding...** Derera, N.F., Ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1989. p.27-60.

KING, R.W.; WETTSTEIN-KNOWLES, P. Epicuticular waxes and regulation of

ear wetting and pre-harvest sprouting in barley and wheat. **Euphytica**, v.112, p.157-166, 2000.

KONSTANTINOVA, P.; BONANTS, P.J.M.; GENT-PELZER, M.P.E.; ZOUWEN, P.; BULK, R. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. **Mycological Research**, v.106, n.1, p.23-33, 2002.

KOPISCH-OBUCH, F.J.; DIERS, B.W. Segregation at the SNC resistance locus *rhg1* in soybean is distorted by an association between the resistance allele and reduced field emergence. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.109-207, 2006.

KULWAL, P.L.; KUMAR, N.; GAUR, A.; KHURANA, P.; KHURANA, J.P.; TYAGI, A.K.; BALYAN, H.S.; GUPTA, P.K. Mapping of a major QTL for pre-harvest sprouting tolerance on chromosome 3A in bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.1052-1059, 2005.

KULWAL, P.L.; SINGH, R.; BALYAN, H.S.; GUPTA, P.K. Genetic basis of pre-harvest sprouting tolerance using single-locus and two-locus QTL analyses in bread wheat. **Functional & Integrative Genomics**, v.4, p.94-101, 2004.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, p.185-199, 1989.

LENTON, J.R.; APPLEFORD, N.E. Gibberellin and  $\alpha$ -amylase production in germinating wheat: some effects of temperature and the Rht3 dwarfing allele. In: TAKAHASHI, N.; PHINNEY, B.O.; MACMILLAN, J. **Gibberellins**. Springer-Verlag, New York, USA, 1991. p.345-353.

LENTON, J.R.; APPLEFORD, N.E.J.; CROKER, S.J.. Hormonal regulation of  $\alpha$ -amylase gene expression in germinating wheat. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PRE-HARVEST SPROUTING IN CEREALS, 7., 1996, Osaka. **Proceeding...** Noda, K.; Mares, D.J., Eds., Center for Academic Societies Japan, Osaka, 1996. p.397-404.

LINHARES, A.G. Germinação da semente na espiga em trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.01, n.3, p.25-28, 1979.

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

LIU, X.B.; LI, W.X.; ZENG, H.B. 1996. Factors involved in dormant wheat seeds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PRE-HARVEST SPROUTING IN CEREALS, 7., 1996, Osaka. **Proceeding...** Noda, K.; Mares, D.J., Eds. Center for Academic Societies Japan, Osaka, 1996, p.385-390.

LUNN, G.D.; MAJOR, B.J.; KETTLEWELL, P.S.; SCOTT, R.K. Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum*, L.) grain in the U.K. **Journal of Cereal Science**, v.33, p.313-329, 2001.

MACAUBAS, C.; JIN, L.; HALLMAYER, J.; KIMURA, A.; MIGNOT, E. The Complex Mutation Pattern of a Microsatellite. **Genome Research**, v.7, n.6, p.635-641, 1997.

MARES, D.J. Dormancy in white wheat: mechanism and location of genes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PRE-HARVEST SPROUTING IN CEREALS, 7., 1996, Osaka. **Proceeding...** Noda, K.; Mares, D.J., Eds. Center for Academic Societies Japan, Osaka, 1996. p.179-184.

MARES, D.J. Preservation of dormancy in freshly harvested wheat grain. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.34, p.33-38, 1983a.

MARES, D.J.; ELLISON, M.E. Dormancy and preharvest sprouting tolerance in white-grained end red-grained wheats. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PRE-HARVEST SPROUTING IN CEREALS, 5., 1990, Oxford. **Proceeding...** Ringlund k., Mosleth E., Mares, D.J., Ed. Westview Press, Oxford, 1990. p.75-84.

MARES, D.J.; MRVA, K.; TAN, M.; SHARP, P. Dormancy in white-grained wheat: Progress towards identification of genes and molecular markers. **Euphytica**, v.126, p.47-53, 2002.

MATHER, D.E.; TINKER, N.A.; LABERGE, D.E.; EDNEY, M.; JONES, B.L.; ROSSNAGEL, B.G.; LEGGE, W.G.; BRIGGS, K.G.; IRVINE, R.B.; FALK, D.E.; KASHA, K.J. Regions of the genome the affect grain and malt quality in a North American two-row barley cross. **Crop Science**, v.37, p.544-554, 1997.

McDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, v.22, p.171-176, 1994.

McMASTER, G.J.; DERERA, N.F. Methodology and sample preparation when screening for sprouting damage in cereals. **Cereal Research Communications**, v.4, n.2, p.251-254, 1976.

METZGER, R.J.; SILBAUGH, B.A. Locations of genes for seed coat colour in hexaploid wheat, *Triticum aestivum*, L. **Crop Science**, v.10, p.495-496, 1970.

MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.

MIURA, H.; SATO, N.; KATO, K.; AMANO, Y. Detection of chromosomes carrying genes for seed dormancy of wheat using the backcross reciprocal

monosomic method. **Plant Breeding**, v.121, p.394-399, 2002.

MORI, M.; UCHINO, N.; CHONO, M.; KATO, K.; MIURA, H. Mapping QTLs for grain dormancy on wheat chromosome 3A and group 4 chromosomes and their combined effect. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.1315-1323, 2005.

MRVA, K.; MARES, D.J. Expression of late maturity  $\alpha$ -amylase in wheat containing gibberellic acid insensitivity genes. **Euphytica**, v.88, p.69-76, 1996a.

MRVA, K.; WALLWORK, M.; MARES, D.J. Alfa-amylase and programmed cell death in aleurone of ripening wheat grains. **Journal Experimental Botany**, v.57, n.4, p.877-885, 2006.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERILICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Symposium Quantitative Biology**, v.51, p.263-273, 1986.

NODA, K.; KAWABAT, C.; KAWAKAMI, N. Response of wheat grain to ABA and imbibition at low temperature. **Plant Breeding**, v.113, p.53-57, 1994.

OKUYAMA, L.A.; RIEDE, C.R.; CAMPOS, L.A.C.; SCHOLZ, M.B.S. Avaliação de cultivares de trigo quanto à germinação na espiga. In: REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 18, 2003, Guarapuava. **Palestras, Resumos e Atas**, Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2003. p.191-193.

OSA, M; KATO, K.; MORI, M.; SHINDO, C.; TORADA, A.; MIURA, H. Mapping QTLs for seed dormancy and the Vp1 homologue on chromosome 3A in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1491-1496, 2003.

PATERSON, A.H.; SORRELLS, M.E. Inheritance of grain dormancy in white kernelled wheat. **Crop Science**, v.30, p.25-30, 1990.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

REDDY, L.V.; METZGER, R.J.; CHING, T.M. Effect of temperature on seed dormancy of wheat. **Crop Science**, v.25, p.455-458, 1985.

REIS, M.S.; CARVALHO, F.I.F. Eficiência de três métodos artificiais para identificação da variabilidade do caráter germinação na espiga em trigo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.1, n.1, p.63-72, 1989.

ROSA, A.C. **Pre-harvest sprouting tolerance of a synthetic hexaploid wheat (*Triticum turgidum* L. x *Aegilops tauschii* Coss.)**. 1999. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Oregon State University, Corvallis, 1999.

ROY, J.K.; PRASAD, M.; VARSNEY, R.K.; BALYAN, H.S.; BLAKE, T.K.; DHALIWAL, H.S.; SINGH, H.; EDWARDS, K.J.; GUPTA, P.K. Identification of a microsatellite on chromosomes 6B and a STS on 7D of bread wheat showing an association with preharvest sprouting tolerance. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.336-340, 1999.

SAKIYAMA, N.S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.11, n.2, p.204-206, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3, 1989.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa, UFV, 2004. 568p.

SCHUSTER, I.; OLIVEIRA, M.R. Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético. In: PÍPOLO, V.C. & GARCIA, J.E. **Biotecnologia na agricultura: Aplicações e biossegurança**. Cascavel, 2006. p.213-237.

SHARMA, S.K.; DHALIWAL, H.S.; MULTANI, D.S.; BAINS, S.S. Inheritance of preharvest sprouting tolerance in *Triticum aestivum* and its transfer to an amber-grained cultivar. **Journal Heredity**, v.85, p.312-314, 1994.

SILVA, M.F. **Mapeamento e validação de QTLs de resistência ao nematóide de cisto da soja**. 2006. 124f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SILVA, M.F.; SCHUSTER, I.; SILVA, J.F.V.; FERREIRA, A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1143-1150, 2007.

SIMMONS, M.W. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. **Plant Physiology**, v.84, p.61-66, 1987.

SIMPSON, G.M. **Seed Dormancy in Grasses**. Cambridge, New York. 1990. 296p.

SODKIEWICZ, W. Diploid wheat – *Triticum monococcum* as a source of resistance genes to preharvest of triticale. **Cereal Research Communications**, v.30, p.323-328, 2002.

SONG, Q.J.; SHI, J.R.; SINGH, S.; FICKUS, E.W.; COSTA, J.M.; LEWIS, J.; GILL, B.S.; WARD, R.; CREGAN, P.B. Development and mapping of

microsatellite (SSR) markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.550-560, 2005.

SOUZA, A.P. de. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Eds). **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.938-965.

SVENSSON, F. Screening methods for sprouting resistance in wheat. **Cereal Research Communications**, v.4, n.2, p.263-266, 1976.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre:Artmed, 2000. 719p.

TAN, M.K.; SHARP, P.J.; LU, M.Q.; HOWES, N. Genetics of grain dormancy in a white wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.57, n.11, p.1157-1165, 2006.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acid Research**, v.17, n.16, p.6463-6471, 1989.

THOMAS, W.T.B.; POWELL, W.; SWANSTON, J.S.; ELLIS, R.P.; CHALMERS, K.J.; BARUA, U.M.; JACK, P.; LEA, V.; FORSTER, B.P.; WAUGH, R.; SMITH, D.B. Quantitative trait loci for germination and malting quality characters in a spring barley cross. **Crop Science**, v.36, 265-273, 1996.

TJIN WONG JOE, A.F.; SUMMERS, R.W.; LUNN, G.D.; ATKINSON, M.D.; KETTLEWELL, P.S. Pre-maturity  $\alpha$ -amylase and incipient sprouting in UK winter wheat, with special reference to the variety Rialto. **Euphytica**, v.143, n.3, p.265-269, 2005.

TONON, V.D. **Genética da resistência à germinação na espiga em trigo**. 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

TORADA, A.; IKEGUCHI, S.; KOIKE, M. Mapping and validation of PCR-based markers associated with a major QTL for seed dormancy in wheat. **Euphytica**, v.143, n.3, p.251-255, 2005.

TWARDROWSKA, M.; MASOJC, P.; MILCZARSKI, P. Pyramiding genes affecting sprouting resistance in Rye by means of marker assisted selection. **Euphytica**, v.143, n.3, p.257-260, 2005.

VARSHNEY, R.K.; PRASAD, M.; ROY, J.K.; RÖDER, M.S.; BALYAN, H.S.; GUPTA, P.K. Integrated physical maps of 2DL, 6BS and 7DL carrying loci for

grain protein content and pre-harvest sprouting tolerance in bread wheat. **Cereal Research Communications**, v.29, p.33-40, 2001.

WANG, D.; GRAEF, G.L.; PROCOPIUK, A.M.; DIERS, B.W. Identification of putative QTL that underlies yield in interspecific soybean backcross populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.458-467, 2004.

WARNER, R.L.; KUDRNA, D.A., SPAETH, S.C.; JONES, S.S. Dormancy in white-grain mutants of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L). **Seed Science Research**, v.10, p.51-60, 2000.

WEBB, D.M., BALTAZAR, B.M., RAO-ARELLI, A.P., SCHUPP, J., CLAYTON, K., KEIM, P., BEAVIS, W.D. Genetics mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437.654. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, n.1, p.574-581, 1995.

WEBER, J.L.; MAT, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal Human Genetic**, v.44, n.3, p.388-396, 1989.

WEILENMANN, F. A selection method to test the sprouting resistance in wheat. **Cereal Research Communications**, v.4, p.251-254, 1976.

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

YANAGISAWA, A.; NISHIMURA, T.; AMANO, Y.; TORADA, A.; SHIBATA, S. Development of winter wheat with excellent resistance to pre-harvest sprouting and rain damage. **Euphytica**, v.143, n.3, p.313-318, 2005.

ZANETTI, S.; WINZELER, M.; KELLER, M.; KELLER, B.; MESSMER M. Genetic analysis of pre-harvest sprouting resistance in a wheat spelt cross. **Crop Science**, v.40, p.1406-1417, 2000.

ZENTELLA, R.; YAMAUCHI, D.; HO, T.D. Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells. **The plant cell**, v.14, p.2289-2301, 2003.

## ANEXO 1

Proporções esperadas de famílias F2:3 homocigotas resistentes : homocigotas suscetíveis/heterocigotas. As proporções foram obtidas, esperando-se que se uma planta F2 é heterocigota, produzirá uma descendência com pelo menos uma planta suscetível, e neste caso está classificada como S. Apenas plantas F2 que produzam descendência 100% resistentes são classificadas com R.

Hipóteses para segregação de um gene

Genótipo F2	Freq.	Fenótipo em famílias F3	
		1	2
AA	1	R	S
Aa	2	S	S
aa	1	S	R
Segregação		1R:3S	1R:3S

Hipóteses:

- 1 – Um gene dominante
- 2 – Um gene recessivo

Hipóteses para segregação de dois genes

Genótipo F2	Freq.	Fenótipo em famílias F3					
		1	2	3	4	5	6
AABB	1	R	R	S	R	S	S
AABb	2	S	R	S	R	S	S
AAbb	1	S	R	R	R	S	R
AaBB	2	S	R	S	S	S	S
AaBb	4	S	S	S	S	S	S
Aabb	2	S	S	S	R	S	R
aaBB	1	S	R	S	S	S	R
aaBb	2	S	S	S	S	S	R
aabb	1	S	S	S	R	R	R
Segregação		1R:15S	7R:9S	1R:15S	7R:9S	1R:15S	7R:9S

Hipóteses:

- 1 – Dois genes dominantes epistáticos
- 2 – Dois genes dominantes duplicados
- 3 – Um gene dominante e um gene recessivo epistáticos
- 4 – Um gene dominante e um recessivo não epistáticos
- 5 – Dois genes recessivos epistáticos
- 6 – Dois genes recessivos duplicados

Hipóteses para segregação de três genes:

Genótipo F2	Freq.	Fenótipo em famílias F3											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AABBCC	1	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
AABBcc	2	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
AABbCC	1	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
AABbCc	2	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
AABbcc	4	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
AAbbCC	2	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R
AAbbCc	1	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R
AAbbCC	2	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R
AAbbcc	1	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R
AaBBCC	2	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
AaBBCc	4	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
AaBBcc	2	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R
AaBbCC	4	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AaBbCc	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AaBbcc	4	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
AabbCC	2	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
AabbCc	4	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
Aabbcc	2	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
aaBBCC	1	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
aaBBCc	2	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
aaBBcc	1	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R
aaBbCC	2	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
aaBbCc	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
aaBbcc	2	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R
aabbCC	1	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R
aabbCc	2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R
aabbcc	1	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R
Segregação		1R: 63S	37R: 27S	7R: 57S	1R: 63S	7R: 57S	37R: 27S	1R: 63S	7R: 57S	37R: 27S	1R: 63S	7R: 57S	37R: 27S

Hipóteses:

- 1 – Três genes dominantes epistáticos
- 2 – Três genes dominantes de efeito duplicado
- 3 – Dois genes dominantes duplicados e um dominante epistático
- 4 – Dois genes dominantes e um recessivo, epistáticos
- 5 – Dois genes dominantes duplicados e um gene recessivo epistático
- 6 – Dois genes dominantes e um recessivo, não epistáticos
- 7 – Um gene dominante e dois genes recessivos epistáticos
- 8 – Um gene dominante epistático e dois genes recessivos duplicados
- 9 – Um gene dominante e dois genes recessivos, não epistáticos
- 10 – Três genes recessivos epistáticos
- 11 – Dois genes recessivos duplicados e um gene recessivo epistático
- 12 – Três genes recessivos de efeito duplicado.

## ANEXO 2

**Tabela 1A-** Médias de notas de germinação na estufa em casa de vegetação e laboratório de análise de semente (Lab.), das populações da cruz de Frontana(Fron) com OCEPAR 18(OC18), 2006.

Sulco	Estufa								
1	1.7	59	3.9	127	1.5	186	3.3	252	1.5
2	3.3	60	1.4	128	1.1	189	2.6	253	1.0
3	1.1	61	3.4	129	2.0	190	2.2	254	2.0
5	1.4	62	2.5	132	2.4	191	1.4	255	1.1
6	1.7	63	1.7	133	1.3	193	3.0	256	1.1
7	1.1	64	1.0	134	2.8	194	1.6	257	1.6
8	1.5	65	5.9	135	1.0	195	2.4	258	2.2
9	1.3	67	3.7	136	4.0	196	1.6	259	1.4
10	1.7	68	2.7	137	2.0	197	1.0	260	1.1
11	1.0	69	2.3	138	2.9	198	1.0	261	1.6
12	1.0	70	1.0	139	1.3	199	1.4	262	1.0
14	1.8	71	1.2	140	1.0	200	1.8	263	1.6
15	1.7	72	1.2	142	1.2	201	1.2	264	1.1
16	2.1	73	1.1	143	1.6	202	1.0	265	1.5
17	1.2	74	2.1	144	1.3	203	1.4	266	1.1
18	1.8	75	1.1	145	1.7	204	1.1	267	1.3
19	1.6	76	2.1	146	1.9	205	1.4	269	1.3
20	1.5	78	1.4	147	1.5	208	1.0	271	1.6
21	2.1	79	2.7	148	1.9	209	1.4	272	1.6
22	1.2	80	1.1	149	1.4	210	1.1	273	1.9
23	1.2	81	1.4	150	1.0	215	2.8	274	1.9
24	1.0	82	2.1	151	3.0	216	1.3	275	2.5
25	1.2	83	1.4	152	2.0	217	1.2	276	1.9
26	1.7	84	1.0	153	1.0	218	1.0	277	1.2
27	1.6	87	2.1	154	1.1	219	1.0	278	2.2
29	1.4	88	4.6	155	1.3	220	1.0	279	2.1
30	5.1	89	1.5	156	2.0	221	2.0	280	1.4
31	1.0	90	2.4	157	2.4	222	1.2	282	1.8
33	1.2	91	1.7	158	1.5	223	1.1	283	2.4
34	3.5	92	2.0	160	1.1	224	1.2	284	1.1
35	2.5	93	1.1	161	1.1	226	1.5	285	1.8
36	1.0	94	1.5	162	2.8	228	1.2	286	1.7
37	1.8	95	1.2	163	2.6	229	1.8	290	1.9
38	1.1	96	1.2	164	1.2	230	1.0	291	1.9
39	3.4	98	1.6	165	2.8	231	1.9	292	1.7
40	1.0	101	1.0	166	1.8	232	1.0	293	1.1
41	2.0	102	1.0	167	4.6	233	1.3	294	1.2
42	1.3	103	1.4	168	2.1	234	1.1	Fron	1.0
43	1.8	105	1.1	170	1.0	235	1.1	OC18	4.6
44	1.1	106	1.0	171	1.5	236	1.2	297	1.3
45	1.7	110	1.1	172	1.5	238	1.3	299	2.6
46	2.3	112	1.4	173	2.4	239	1.9	302	1.7
47	3.2	113	1.6	174	1.1	240	1.4	303	1.9
48	1.4	114	1.6	175	2.1	241	2.9	304	1.3
49	1.3	115	1.0	176	6.4	242	1.1	305	1.3
50	3.2	116	1.3	177	1.0	243	1.1	311	1.0
51	2.2	117	1.4	178	1.7	244	1.3	313	1.1
52	2.4	118	1.6	179	1.9	245	1.0	314	1.1
53	1.9	120	1.8	180	3.7	246	1.5	319	1.1
54	1.2	121	1.1	181	5.2	248	1.1	320	1.6
55	3.9	123	1.1	182	1.7	249	2.6	321	1.2
57	3.6	125	2.3	183	1.5	250	1.8	322	1.8
58	1.1	126	1.7	184	1.2	251	1.0	323	1.3

### ANEXO 3

**Tabela 2A - Médias de notas de germinação na estufa em casa de vegetação, das populações da cruz de Frontana(Fron) com CD 105, 2006.**

Sulco	Nota										
1	1.0	55	2.0	105	1.7	155	1.0	214	4.3	269	2.8
2	1.9	56	2.1	106	4.0	156	1.0	215	1.7	270	1.0
3	1.4	57	1.0	107	2.7	157	2.9	217	2.5	271	1.9
4	1.3	58	1.0	108	3.0	158	1.1	218	1.2	272	1.3
7	3.9	59	1.0	109	1.2	159	1.0	221	1.3	273	3.1
9	1.1	60	1.1	110	3.7	160	1.3	222	1.6	274	2.8
10	1.4	61	1.5	111	1.4	161	1.6	223	1.2	275	1.6
11	2.4	62	2.3	112	1.7	162	1.3	224	2.0	276	2.0
12	3.8	63	1.0	113	1.1	163	1.3	225	1.1	277	1.3
13	1.9	64	3.2	114	1.8	164	1.0	226	1.6	278	2.3
14	2.0	65	1.7	115	1.5	166	1.0	227	2.0	279	1.0
15	4.1	66	1.5	116	1.8	167	1.1	228	1.4	280	1.4
16	1.3	67	3.0	117	1.0	168	1.0	229	2.0	281	2.2
17	2.2	68	1.5	118	2.0	169	1.4	230	3.1	282	1.0
18	1.6	69	1.0	119	1.5	170	1.5	231	2.2	283	1.0
19	2.2	70	1.1	120	3.4	171	1.0	232	4.1	284	1.3
20	1.7	71	1.0	121	2.1	172	3.5	233	1.3	285	1.1
21	1.7	72	2.6	122	1.1	173	2.2	234	1.4	286	1.0
23	2.8	73	1.9	123	1.0	174	2.3	235	2.4	287	1.6
24	2.7	74	1.4	124	4.0	175	1.3	236	4.5	288	1.2
25	1.0	75	1.0	125	1.9	176	1.0	237	2.9	290	1.0
26	1.5	76	2.3	126	2.3	177	1.1	238	1.8	291	1.1
27	1.8	77	1.0	127	1.0	178	2.2	239	2.6	292	1.3
28	2.6	78	1.0	128	1.6	179	1.6	240	1.6	293	1.2
29	2.1	79	1.0	129	1.2	180	1.1	241	1.9	294	1.2
30	2.0	80	1.3	130	1.0	181	1.3	242	1.4	295	1.0
31	4.3	81	1.0	131	1.2	182	1.0	243	1.6	296	1.2
32	2.2	82	2.5	132	1.0	183	2.2	244	2.0	297	1.1
33	1.2	83	1.6	133	2.3	184	1.0	245	1.1	298	1.1
34	1.4	84	1.5	134	3.1	185	2.5	246	1.2	299	1.0
35	1.1	85	3.2	135	3.3	187	4.6	247	2.1	301	1.4
36	2.4	86	1.2	136	1.1	188	1.5	248	2.5	302	1.5
37	1.2	87	1.4	137	1.0	189	1.7	249	1.3	303	1.0
38	2.4	88	1.0	138	1.0	190	1.0	250	2.8	304	1.5
39	1.4	89	1.5	139	3.8	191	2.1	251	2.7	305	1.3
40	4.7	90	4.3	140	2.1	192	1.1	252	1.5	306	1.9
41	2.6	91	1.2	141	1.5	193	1.2	253	4.1	307	2.4
42	2.2	92	1.1	142	1.2	194	1.4	254	2.9	316	2.1
43	2.0	93	1.0	143	2.6	195	2.6	255	1.1	317	1.2
44	1.1	94	1.0	144	1.1	196	1.0	256	1.9	321	1.8
45	1.8	95	1.6	145	1.2	197	1.0	257	1.6	323	1.0
46	1.3	96	1.8	146	1.2	198	2.6	258	1.1	324	1.8
47	1.0	97	5.0	147	1.4	199	1.2	Fron	1.1	327	3.9
48	1.2	98	2.4	148	1.0	201	1.3	260	1.4	328	1.2
49	1.3	99	1.6	149	1.2	204	3.1	261	1.9	329	1.2
50	1.0	100	1.6	150	2.5	206	1.6	262	3.9	330	3.0
51	1.3	101	2.2	151	1.0	210	2.2	CD105	3.9	332	1.2
52	2.3	102	1.0	152	1.4	211	1.4	266	2.4		
53	1.4	103	1.2	153	1.3	212	1.1	267	1.5		
54	1.1	104	1.1	154	1.0	213	1.6	268	1.4		

# 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](#)