

KELLY PELLIZZARO

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO
GENE RB-1 EM TRIGO, E RELAÇÃO COM A TOLERÂNCIA À
GERMINAÇÃO NA ESPIGA**

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

KELLY PELLIZZARO

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO
GENE RB-1 EM TRIGO, E RELAÇÃO COM A TOLERÂNCIA À
GERMINAÇÃO NA ESPIGA**

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

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

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

P391v Pellizzaro, Kelly
Validação de marcadores moleculares associados ao gene RB-1 em trigo, e relação com a tolerância à germinação na espiga. / Kelly Pellizzaro. -- Maringá, 2010.
40 f. : il. color.

Orientador : Prof. Dr. Alessandro de Lucca e Braccini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal, 2010.

1. Marcadores microssatélites. 2. Semente na espiga. 3. Dormência. 4. Gene RB-1. I. Universidade Estadual de Maringá. Curso de Pós-graduação em Agronomia. Área de concentração: Produção Vegetal. II. Título.

CDD 21.ed.641.331

KELLY PELLIZZARO

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO
GENE RB-1 EM TRIGO, E RELAÇÃO COM A TOLERÂNCIA À
GERMINAÇÃO NA ESPIGA**

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

APROVADA em 24 de Fevereiro de 2010.

Dr. Ivan Schuster

Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim

Prof. Dr. Alessandro de Lucca e Braccini
(Orientador)

A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade.
A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação.
A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para
que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus.
Aos meus pais por natureza, por opção e amor, Wilson e Maria Silvia.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao término de mais uma etapa na minha vida profissional, gostaria de agradecer aqueles que de alguma forma colaboraram para esta realização.

A Deus meu agradecimento maior, pela saúde, proteção, inspiração e força para enfrentar as dificuldades e pela oportunidade de ter estas pessoas em minha vida.

Aos meus pais, pela educação, carinho, dedicação e apoio recebido.

Ao pesquisador, Dr. Ivan Schuster, pelos ensinamentos valiosos para a realização deste trabalho e para a vida, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade concedida.

Ao orientador, professor Dr. Alessandro de Lucca e Braccini, pelo apoio recebido e disponibilidade na orientação.

A pesquisadora Dra. Elisa Serra Negra Vieira pela amizade e incentivo.

Ao pesquisador Dr. Francisco de Assis Franco, pela grandiosa colaboração.

Aos professores do programa de pós-graduação em Agronomia.

Ao coordenador do curso de Agronomia, professor Dr. Cassio Antonio Tormena e a secretária Érika Cristina Takamizawa Sato, pela contribuição.

Aos membros da banca examinadora, professor Dr. Alessandro de Lucca e Braccini, Dr. Ivan Schuster e professor Dr. Carlos Alberto Scapim.

À COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, pela estrutura fornecida para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Apoio à Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos (as), Crisleine T. Predebom, Fabiane Lazzari, Glacy J. da Silva, Joselaine Viganó, Julio C. Criveli, Laura C. Calgaro, Leandra R. Texeira, Leonardo A. de Oliveira, Marcelo B. de Oliveira, Mariana Rocha, Monica Gioda e Monise T. Herpich, pelo companheirismo e pelas palavras de amizade e estímulo durante todo o tempo de vivência no laboratório.

A família Rodrigues da Silva, pelo acolhimento e amizade.

Aos meus irmãos Aldino Pellizzaro e Felipe Pellizzaro, pelo carinho e estímulo.

Aos meus avôs, Leda Vanda Pellizzaro e Catherino Vergílio Pellizzaro, pelo incentivo.

Ao professor Gilmar Pezzopane Plá, pelos ensinamentos e incentivo.

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

BIOGRAFIA

KELLY PELLIZZARO, filha de Wilson Pellizzaro e Maria Silvia Pellizzaro, nasceu em Campos Novos, Estado de Santa Catarina, em 19 de janeiro de 1981.

Completo o ensino fundamental na Escola Básica Major Cipriano Rodrigues de Almeida (Campos Novos/SC) e o Ensino Médio no Colégio Estadual Paulo Blasi (Campos Novos/SC).

Graduou-se em Agronomia, em março de 2007, pela Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL (Tubarão/SC). Durante o curso de graduação realizou estágios dentro e fora da universidade, participou de projetos de iniciação científica (PUIC), cursos e eventos.

Realizou estágio de conclusão de curso no Laboratório de Biotecnologia da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – COODETEC (Cascavel/PR), no qual permaneceu trabalhando como auxiliar de pesquisa Sênior.

Em fevereiro de 2008 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Classificação botânica e caracterização genômica do trigo.....	3
2.2 Importância econômica.....	3
2.3 Cor do grão de trigo.....	5
2.4 Cor do grão e germinação na espiga.....	6
2.5 Marcadores moleculares.....	10
2.6 Marcadores moleculares para a cor do grão.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Material genético.....	13
3.2 Extração de DNA.....	14
3.3 Amplificação dos locos SSR e eletroforese.....	15
3.4 Análise dos dados.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 População PFAU x CD 0666.....	16
4.2 População PFAU x CD 0559.....	27
5. CONCLUSÕES.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

PELLIZZARO, K. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. **Validação de marcadores moleculares associados ao gene RB-1 em trigo e relação com a tolerância à germinação na espiga.** Professor orientador: Dr. Alessandro de Lucca e Braccini. Professores conselheiros: Dr. Ivan Schuster e Dr. Carlos Alberto Scapim.

Para identificar marcadores moleculares ligados ao gene que confere a cor do grão em trigo, foram utilizadas duas populações F₂, derivadas dos cruzamentos CD0666 x PFAU, que segrega para um gene de cor do grão e CD0559 x PFAU, que segrega para dois genes. Para as análises com marcadores moleculares microssatélites foi realizado um *screening* entre os pais, para identificar os *primers* polimórficos localizados nas regiões de localização dos genes RA-1, RB-1 e RD-1. Na população PFAU x CD0666 foram analisados 44 loci, e 38 deles não apresentaram polimorfismo. Os seis marcadores polimórficos estão no cromossomo 3A (Xgwm247), 3B (Xbarc229, Xgwm108, Xbarc344 e Xgwm247) e 3D (Xwmc631 e Xbarc323). A segregação mendeliana foi confirmada pelo teste de qui-quadrado (χ^2), com exceção dos marcadores Xbarc229 e Xgwm108 que apresentaram distorção de segregação. A análise de ligação entre os marcadores moleculares e a cor do grão foi realizada com auxílio do programa GQMOL, utilizando as funções de mapeamento de Kosambi. O marcador Xbarc344 foi identificado como ligado ao gene de cor a uma distância de 26,1 cM e apresentou eficiência de seleção de 83,25%. Não houve associação deste marcador com a tolerância à germinação na espiga e também não houve associação da cor de grão com a tolerância à germinação na espiga. Na população PFAU x CD0559 que segrega para dois genes R, foram avaliados 48 marcadores moleculares, dos grupos de ligação 3A, 3B e 3D. A segregação mendeliana dos marcadores polimórficos (Xbarc164, Xgwm631 e Xbarc77) foi confirmada pelo teste de qui-quadrado. Uma função de máxima verossimilhança foi utilizada para estimar a frequência de recombinação, considerando que a população segrega para dois

genes independentes para cor de grão. Porém, não foi detectada ligação de nenhum dos marcadores com a cor vermelha do grão de trigo nesta população.

Palavras-chaves: *Triticum aestivum* L., sementes, germinação na espiga, dormência.

ABSTRACT

PELLIZZARO, K. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. **Validation of molecular markers associated with the RB-1 gene in wheat and its relationship with tolerance to sprouting.** Teacher Advisor: Dr. Alessandro de Lucca e Braccini. Teachers councilmen: Dr. Ivan Schuster e Dr. Carlos Alberto Scapim.

To identify molecular markers linked to the gene that gives the color of the grain in wheat, we used two F2 populations derived from crosses PFAU x CD0666, which secretes a gene for grain color and PFAU x CD0559, segregating for two genes. For the analysis with microsatellite markers was carried out a screening of the parents, to identify polymorphic primers located in regions of localization of genes RA1, RB1 and RD1. In the population PFAU x CD0666 it was analyzed 44 loci, and 38 of them did not show polymorphism. The six polymorphic markers are on chromosome 3A (Xgwm247), 3B (Xbarc229, Xgwm108, Xgwm247 and Xbarc344) and 3D (Xwmc631 and Xbarc323). Mendelian segregation was confirmed by the chi-square (χ^2), with the exception of the markers Xgwm108 and Xbarc229 that had a distorted segregation. Linkage analysis between molecular markers and color of the grain was performed with the program GQMOL using the mapping function of Kosambi. The marker Xbarc344 was identified as linked to the gene of color at a distance of 26.1 cM and an efficiency of selection of 83.25%. There was no association of this marker with the tolerance to sprouting and there was no association of grain color with tolerance sprouting. In the population PFAU x CD0559 segregating for two color genes were evaluated 48 molecular markers of linkage groups 3A, 3B and 3C. The Mendelian segregation of polymorphic markers (Xbarc164, Xgwm631 and Xbarc77) was confirmed by the chi-square test. A maximum likelihood function was used to estimate the frequency of recombination, whereas the population segregates for two independent genes for grain color. However, it wasn't detected linkage of any markers for the red color of the wheat grain in this population.

Key words: *Triticum aestivum* L., seed, sprouting, dormancy.

1 INTRODUÇÃO

Um dos graves problemas que atinge a triticultura brasileira e de várias regiões produtoras de trigo no mundo é a germinação na espiga, também conhecida como PHS, sigla da expressão, em inglês “*Pre-Harvest Sprouting*”. O problema se agrava nas áreas mais quentes quando ocorrem chuvas no período que precede a colheita. A germinação na espiga causa diminuição no peso hectolítrico e afeta a qualidade da farinha, que pode se tornar inviável para o consumo humano em virtude da degradação das reservas de proteínas e de amido na semente.

O pigmento vermelho no grão de trigo é determinado pelos alelos R dominantes dos três genes controladores da cor do grão (R-A1, R-B1 e R-D1). Cultivares de trigo com grãos vermelhos são consideradas mais resistentes à germinação na espiga do que cultivares com grãos brancos. Porém, nem todas as cultivares de trigo com grão vermelho são tolerantes à germinação na espiga. Isso sugere que essa relação entre cor de grão e tolerância à germinação na espiga, se existe, não é para todos os genes R. Por outro lado, a cor branca é um atributo desejável pela indústria por permitir maior taxa de extração de farinha que trigos vermelhos.

Uma vez que existem evidências de que o incremento da tolerância a germinação na espiga e a cor vermelha são herdados como efeitos pleiotrópicos dos alelos R dominantes, a cor vermelha dos grãos é utilizada como marcador de seleção para tolerância à germinação na espiga, pelos programas de melhoramento genético de trigo. Neste caso, a possibilidade de variar a dose dos alelos R dominantes em um programa de melhoramento pode aumentar a tolerância à germinação na espiga em trigos de grãos vermelhos. Contudo, há incertezas quanto a esta associação da cor do grão com a tolerância à germinação na espiga. O mapeamento genético dos genes R pode auxiliar no entendimento desta associação.

Recentemente, os genes RA1, RB1 e RD1 foram mapeados nos cromossomos 3A, 3B e 3D do genoma do trigo. Os marcadores mais proximamente ligados aos genes R mapeados são de propriedade privada, da

empresa Trait Genetics, e seu uso para selecionar estes genes é restrito. Este trabalho teve como objetivos validar marcadores públicos ligados aos genes R, avaliar outros marcadores nas mesmas regiões genômicas, quanto à associação aos genes R, e verificar a associação de marcadores moleculares e do fenótipo cor do grão, com a tolerância do trigo à germinação na espiga.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Classificação botânica e caracterização genômica do trigo

O trigo pertence à família Poaceae, tribo Triticeae, subtribo Triticinae (FEDERIZZI et al., 1999). É uma espécie autógama e a fecundação cruzada ocorre em baixa frequência e em condições especiais de ambiente (FEDERIZZI et al., 2005).

As diferentes espécies formam uma série poliplóide, com número básico de cromossomos igual a sete e três níveis de ploidia: têm-se trigos diplóides ($2n = 2x = 14$, AA), tetraplóides ($2n = 4x = 28$, AABB) e hexaplóides ($2n = 6x = 42$ AABBDD) (FEDERIZZI et al., 1999). O trigo para pão (*Triticum aestivum* L.), é hexaplóide ($2n = 6x = 42$) com os três genomas A, B e D. Possui um genoma muito grande de 16×10^9 pb (por genoma haplóide), que é cerca de seis vezes o tamanho do genoma do milho e 35 vezes maior do que o do arroz (BENNETT; SMITH, 1976). A complexidade é um problema relevante quando se pretende realizar mapeamento genético, desenvolvimento de marcadores moleculares, sequenciamento de genes funcionais e transferência de genes, pois muitos genes presentes no genoma A podem estar repetidos nos genomas B e D, tornando mais complexo os padrões de segregação mendeliana e dificultando as análises genéticas (MORAES-FERNANDES, 1982).

2.2 Importância econômica

Segundo Federizzi et al. (2005), a área geográfica de distribuição e domesticação do cereal coincide com a da civilização do homem e início da agricultura. O trigo foi extensamente cultivado pelas civilizações da Babilônia, Grécia, Creta e Roma e era base da economia nestas regiões. Tais ocorrências datam de cerca de 10.000 anos, momento em que a civilização, essencialmente nômade e extrativista, torna-se gradativamente sedentária e agrícola.

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2009), entre os anos de 1986 e 1990 quando o governo comprava todo o trigo produzido no Brasil por um preço de garantia, a produção própria em média anual de 5,5 milhões de toneladas garantia 76% do consumo interno, que era de 7,2 milhões de toneladas. Após este período, a produção diminuiu e o consumo continuou aumentando a cada ano. Entre os anos de 1991 e 1995, a produção (2,8 milhões de toneladas) atendeu em 38% o consumo interno (7,4 milhões de toneladas) de trigo. Nos anos de 2001 a 2005 e 2006 a 2009, o aumento da produção foi proporcional ao aumento no consumo e a produção nacional manteve 40% de participação no consumo nos dois períodos. A adoção de novas tecnologias é um importante fator no aumento da produção por meio da maior produtividade. A área semeada foi de 2.361,8 mil ha em 2005/2006, 1.757,5 em 2006/2007, 1.851,8 mil ha em 2007/2008, 2.236,2 mil ha em 2008/2009 e 2.446,8 mil ha na safra de 2009/2010. A produtividade média para a safra de 2009/2010 foi estimada em 2.082 kg/ha^{-1} , nas safras anteriores em 2005/2006, 2006/2007, 2007/2008 e 2008/2009 a produtividade foi de 2.063, 1.271, 2.212 e 2.456 kg/ha^{-1} , respectivamente.

De acordo com Fanan et al. (2006), o Brasil possui elevado potencial para a produção de trigo, por apresentar clima e solos favoráveis. Existe interesse sócio-econômico em aumentar a produção de trigo no Brasil, atendendo ao mercado interno. Com as novas cultivares, o país tem condições técnicas para produzir a maior parte do trigo necessário para suprir o consumo interno (FEDERIZZI et al., 2005).

O Brasil tem se voltado para a opção da importação, por questões econômicas, no entanto, seria mais viável incentivar a adoção de tecnologias e adotar um modelo de profissionalização da agricultura brasileira com o objetivo da eficiência técnica e econômica. Para isso, a cadeia produtiva deverá se reestruturar de maneira a buscar interesses comuns para aumentar a participação do produto nacional e reduzir as importações (BRUM; MÜLLER, 2008)

2.3 Cor do grão de trigo

A cor do grão em trigo é controlada por 3 genes homólogos e independentes localizados nos cromossomos 3A, 3B e 3D. Os alelos que controlam a cor vermelha são denominados de R-A1b, R-B1b, e R-D1b e os que conferem a cor branca são: R-A1a, R-B1a e R-D1a (McINTOSH et al., 1998). A cor vermelha do tegumento apresenta caráter dominante. Sendo assim, é necessário que apenas um loco contenha o alelo dominante para resultar na cor vermelha (METZGER; SILBAUGH, 1970). Soper et al. (1989), relatam que em *Triticum durum*, a cor âmbar é devida a sua translucidez e presença de xantofila e pigmentos de luteína, mas o trigo duro com grão vermelho não é aceitável pela indústria de massas devido aos seus rigorosos padrões. No entanto, o trigo branco duro é de interesse do mercado por apresentar maiores vantagens na moagem e na qualidade final (TAYLOR et al., 2005), e por proporcionar maior taxa de extração de farinha (McCAIG; DePAUW, 1992).

Freed et al. (1976) relatam que a presença dos genes que controlam a cor vermelha estão relacionados com a dormência pós-colheita mas, nem todos os trigos vermelhos são dormentes. Os trigos de grãos brancos têm nível de dormência menor que os vermelhos, indicando que grãos de cor vermelha são portadores de genes de dormência adicionais aos brancos (FLINTHAM, 1993). Dyck et al. (1986) comprovaram que trigos com grãos vermelhos, são geralmente mais resistentes à germinação pré-colheita (PHS) que trigos de cor branca. Sendo assim, estes têm sido utilizados nos programas de melhoramento como marcador para a germinação pré-colheita (*pre-harvest sprouting* – PHS). Bassoi e Flintham (2005) avaliaram o efeito de dosagem dos genes R na germinação pré-colheita em uma população de descendência por semente única e relataram que a seleção pela cor do grão é eficaz, mas que a seleção baseada na intensidade da cor pode não ser eficiente.

Segundo Kuraparthi et. al (2008), embora diferentes cultivares de trigo possuam os genes R variando de zero a três cópias, todas as espécies selvagens possuem alelos R funcionais, sugerindo forte pressão de seleção

para a cor vermelha do grão nestas espécies, o que indica que os loci R estão envolvidos na evolução do trigo selvagem.

2.4 Cor do grão e germinação na espiga

Um grave problema que os agricultores enfrentam com a cultura do trigo durante a fase de colheita, quando as condições ambientais são favoráveis à germinação das sementes, é a germinação na espiga, que causa diminuição do peso hectolítrico e do rendimento de grãos. Pode causar também danos à qualidade da farinha, pelo desencadeamento de reações enzimáticas iniciais no processo de germinação. A germinação na pré-colheita em trigo atinge áreas tritícolas de várias 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). A ocorrência de chuvas em períodos de alta temperatura durante a maturação da cultura provoca a germinação dos grãos ainda na espiga, afetando a qualidade do trigo e inviabilizando parte da produção para consumo. 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 expressão da germinação na espiga ocorre pela contribuição de muitos fatores, externos e internos. A maioria deles é controlado por um fator genético, que determina a morfologia das espigas, sensibilidade hormonal e inibidores de alfa-amilase (BERNARD et al., 2005). A germinação na espiga pode ser influenciada por fatores físicos e fisiológicos. Físicos quando estão relacionados à taxa de infiltração de água no grão e dependem de características como: dureza, conteúdo de fibra e proteínas do grão, espessura da testa, posição da espiga, glumas que cobrem os grãos, presença de aristas e a forma do caráter da espiga.

Sabe-se que a tolerância a PHS está associada com a dormência das sementes. São dois sistemas geneticamente distintos de dormência nas sementes, um nível de controle opera por meio de efeitos maternos e a

dormência é imposta pelo revestimento da semente. Em contraste, os efeitos zigóticos são relacionados com fatores do embrião. A dormência imposta pelo tegumento ocorre quando o embrião se mantém fechado na estrutura (MIURA et al., 2002). Para Castro et al. (2004), a superação da dormência está relacionada a fatores internos e externos à semente. Quando são empregadas todas as condições necessárias à germinação, e mesmo assim esta não ocorre, existe uma forte possibilidade de haver algum tipo de bloqueio.

A temperatura é um fator que tem influência na expressão da dormência nas sementes de trigo. Em trabalho desenvolvido para avaliação da dormência, Belderock (1976) encontrou correlação positiva entre a baixa dormência e a alta temperatura após a maturação. Baixas temperaturas durante o período de enchimento de grãos induz a dormência; contudo, a baixa temperatura também é efetiva para romper a dormência na maturação (REDDY et al., 1985). A germinação pré-colheita está associada com a dormência inadequada das sementes e a cor vermelha é considerada como marcador nos programas de melhoramento de trigo para a resistência à germinação na espiga. Geralmente, trigos de cor branca têm sido relatados como mais suscetíveis que os vermelhos, no entanto, existe variação para ambos (BASSOI; FLINTHAM, 2005).

A germinação na espiga ocorre esporadicamente em todas as variedades comerciais vermelhas indicando que genótipos de cor vermelha nem sempre garantem resistência à germinação na espiga (FLINTHAM, 2000). Além da cor do tegumento, outros efeitos genéticos estão envolvidos no controle da dormência em trigo branco e vermelho (FLINTHAM, 2000; WU; CARVER, 1999). Huang et al. (1983) sugerem ainda que a taxa de embebição pode ser um dos fatores que afetam a dormência nos grãos de trigo e que grãos vermelhos embebem água mais lentamente que grãos brancos.

A associação da cor do grão com a dormência foi proposta primeiramente por Nilson-Ehle (1914) e confirmada por vários autores (FLINTHAM; GALE, 1988; FLINTHAM; HUMPHREY, 1993; FLINTHAM; GALE, 1996). Esta associação existente entre a PHS e a cor do grão pode ser devido a uma forte ligação entre os genes ou devido ao efeito pleiotrópico dos genes da cor do grão (McCAIG; DePAUW, 1992). A dormência nas sementes de trigo

é uma característica poligênica controlada por um conjunto de 3 genes R que controlam também a pigmentação vermelha do tegumento. Além destes, há outros genes que controlam a dormência nas sementes (BASSOI; FLINTHAM, 2005). Entre estes, o gene *Phs*, parece exercer efeito no embrião (dormência imposta pelo embrião); já a expressão do gene R se dá no tecido materno (dormência imposta pelo tegumento). Desta forma, são distintas funções genéticas baseadas em mecanismos fisiológicos diferentes (FLINTHAM, 2000). Dormência nos grãos e a cor da testa são herdados como efeito pleiotrópico de alelos dominantes R e representam uma série de genes funcionalmente equivalentes, os loci homólogos que estão localizados nos cromossomos 3A, 3B e 3D em trigo hexaplóide (SOPER et al., 1989; GALE et al., 1995; FLINTHAM; GALE, 1996; FLINTHAM et al., 1999; FLINTHAM, 2000).

O primeiro caso de efeito de gene principal, com herança mendeliana para a dormência associado à coloração vermelha do grão, controlado pelo fator R triplicado, localizado no braço longo dos cromossomos homólogos do grupo 3, foi detectado por Flintham e Gale (1996). 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. Flintham et al. (1999), apresentaram algumas evidências de efeitos dos cromossomos do grupo 3 independente da cor do grão e concluíram que no mínimo dois genes localizados no braço longo e braço curto do cromossomo 3A estão associados com a dormência.

Muitos trabalhos têm sido realizados com o intuito de identificar QTLs (*Quantitative trait loci*), que controlam a dormência e a tolerância a PHS em trigo (ANDERSON et al., 1993; FLINTHAM et al., 2002; GROOS et al., 2002; KATO et al., 2001; MARES; MIRVA, 2001; ROY et al., 1999; ZANETTI et al., 2000). Em trigo para pão, com exceção do cromossomo 1D, 20 são conhecidos por carregar QTLs para a tolerância a PHS/dormência. De todos, os cromossomos 3A, 3B, 3D e 4A têm sido considerados com maior importância para estudos genéticos para tolerância a PHS/dormência (BAILEY et al., 1999; ZANETTI et al., 2000; FLINTHAM et al., 2002). Diversos destes QTLs que

afetam a dormência das sementes foram mapeados utilizando marcadores moleculares.

Andreoli et al. (2006), em trabalho realizado em linhas F_2 derivadas de cruzamento entre Frontana x OR1, obtiveram resultados que indicam que a dormência parece ser recessiva, controlada por dois genes de grande efeito, envolvidos no controle de dormência das sementes. Observaram que somente o genótipo homozigoto aabb é dormente. Esta característica quantitativa é influenciada pelo ambiente bem como pela interação genótipo x ambiente (ANDERSON et al., 1993).

Kulwal et al. (2005), em trabalho realizado com trigo para panificação com RILs desenvolvidas de cruzamento entre SPR8198 (tolerante a PHS) e HD2329 (suscetível a PHS), identificaram um QTL de efeito maior (*QPhs.ccsu-3A.1*) no cromossomo 3AL. Os autores não detectaram associação entre o marcador Xgwm155, que está associado com o QTL identificado e a cor do grão sugerindo que nesta população os alelos que conferem a cor do grão, podem estar localizados nos cromossomos 3B e 3D. Franco (2008) identificou o marcador microssatélite Xbarc170 que está ligado a um gene recessivo, no cromossomo 4AL, responsável pela dormência das sementes. Foi utilizada uma população de 258 famílias $F_{2:3}$, derivada do cruzamento entre as cultivares Frontana (tolerante) e OCEPAR 18 (sensível).

Efeitos genéticos adicionais, independentes da cor dos grãos, têm sido implicados no controle da dormência em trigos brancos e vermelhos (DePAUW; McCAIG, 1983; CLARKE et al., 1984; FLINTHAM, 1993; FLINTHAM, 2000). A germinação na pré-colheita é considerada um caráter quantitativo, dependente da base genética da cultivar, das condições de colheita, secagem e armazenamento, região de cultivo e das interações das cultivares com o ambiente (ANDERSON et al. 1993; FLINTHAM, 2000; FLINTHAM et al., 2002). Flintham (2000) indica que a dormência pode ser um excelente mecanismo para seleção com auxílio de marcadores genéticos.

2.5 Marcadores moleculares

Marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, podendo ser isoenzimas ou um segmento específico de DNA (correspondente à região do genoma expressa ou não). Os marcadores isoenzimáticos são também conhecidos como marcadores bioquímicos. A sequência de nucleotídeos e a função de um marcador de DNA pode ou não ser conhecida. Ao se verificar seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

O primeiro grupo de marcadores moleculares que surgiu foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTSTEIN et al., 1980), baseado nas diferenças de comprimento de fragmentos de DNA por meio da hibridização. Esta técnica é limitada pelo uso intensivo de mão-de-obra e tempo para análise. Novas classes de marcadores moleculares surgiram com o uso da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*). Consiste na amplificação de pequenas sequências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise, a partir de mínima quantidade de DNA. Baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de *primers* específicos ou não. Estes *primers* delimitam a sequência de DNA de fita dupla a ser amplificada, resultando em milhões de cópias idênticas (MULLIS; FALOONA, 1987; WHITE et al., 1989).

Outros marcadores surgiram a partir do descobrimento desta técnica como: RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) ou AP-PCR (*Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction*). Nesta classe de marcadores os *primers* possuem sequência arbitrária, mas a amplificação ocorre em lugares específicos do genoma. Marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*), consistem na conversão de RFLP em marcadores baseado em PCR. Marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) consistem na conversão de marcadores RAPD, em marcadores de sequência específica (CAIXETA et al., 2009). Outra classe de marcadores que faz uso da técnica de PCR são os

marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), denominados também de microssatélites (LITT; LUTY, 1989), frequentemente encontradas nos genomas eucariotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Marcadores microssatélites consistem de sequências curtas de nucleotídeos repetidas na mesma ordem, cujo nível de polimorfismo produzido é devido à variação no número de unidades de repetição em um determinado locus (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). Marcadores SSRs são obtidos com o uso de *primers* que flanqueiam regiões contendo os microssatélites. Os *primers* para SSR são desenhados a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA, obtidos de bibliotecas genômicas, onde os microssatélites foram previamente localizados. São facilmente encontrados no genoma, altamente polimórficos, de fácil visualização, estáveis e co-dominantes (AKKAYA et al., 1992).

Os marcadores microssatélites têm sido desenvolvidos em várias espécies de plantas cultivadas e estão substituindo rapidamente outros marcadores em vários estudos genéticos, devido a sua reprodutibilidade, simplicidade técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo, grande poder de resolução e altos níveis de polimorfismo. O alto nível de diversidade alélica possibilita a obtenção de polimorfismo em populações multiparentais e em populações derivadas de híbridos de genótipos relacionados, além de distinguir acessos de germoplasma intimamente relacionados. Esta hipervariabilidade dos microssatélites os torna marcadores ideais para o mapeamento genético (CAIXETA et al., 2009). Por serem multialélicos os marcadores microssatélites têm alto potencial para uso em estudos evolutivos (SCHLOETTERER et al. 1991; BUCHANAN et al. 1994) e estudos sobre relações genéticas.

Diferentes espécies de plantas tiveram seus mapas de ligação desenvolvidos ou saturados por marcadores microssatélites, como soja (CREAGAN et al., 1999), aveia (LIU et al., 1996), milho (SENIOR et al., 1996), trigo (RÖDER et al., 1998), eucalipto (BRONDANI et al., 1998), maçã (GIANFRANCESCHI et al., 1998), feijão (YU et al., 2000) e arroz (TEMNYKH et al., 2001; McCOUCH et al., 1997, 2002). Em trigo hexaplóide, os marcadores microssatélites representam um nível muito mais elevado de polimorfismo e

informatividade do que qualquer outra classe de marcador (PLASCHKE et al., 1995; RÖDER et al., 1995).

O mapeamento dos genes no pré melhoramento é etapa importante, pois auxilia o melhorista na tomada de decisões importantes. Com o uso de marcadores moleculares podem-se mapear tanto os genes associados a caracteres qualitativos quanto quantitativos. No caso de caracteres quantitativos, que são controlados por vários genes, o uso de marcadores permite a identificação e análise de cada um dos genes envolvidos na característica. Além do mapeamento, é possível o estudo dos efeitos gênicos e da ação dos genes de maneira isolada, interativa e cumulativa (PEREIRA et al., 2009).

2.6 Marcadores moleculares para a cor do grão

Muitos esforços têm sido feitos para identificar QTLs (*Quantitative Trait Loci*) que controlam a dormência das sementes e a tolerância à germinação na espiga em trigo (ANDERSON et al., 1993). Os loci R da cor do grão são os principais de interesse agrônômico, e os três genes ortólogos são funcionais mesmo depois de 10.000 anos de evolução do trigo poliplóide (FLINTHAM; HUMPHREY, 1993). Embora se saiba pouco sobre a relação exata entre a dormência de sementes e a PHS, a influência da cor do grão na dormência de sementes foi representada de forma inequívoca em trigo (WATANABE; IKEBATA, 2002; TORADA; AMANO, 2002; FLINTHAM; HUMPHREY, 1993; FLINTHAM, 2000).

Segundo Flintham e Humphrey (1993), em trabalho realizado com mapeamento utilizando RFLP indicaram que os loci R foram mapeados em um intervalo de 8-12 cM flanqueado por alelos ortólogos de marcadores RFLP Xbcd131 e Xabc174 no braço do cromossomo homólogo 3L de trigo. Em trabalho com três populações segregantes, apenas um de cada um dos três loci de respectiva cor e homozigotos recessivos com os outros dois, foram identificados marcadores microssatélites ligados ao gene que confere a cor do grão nos cromossomos 3A, 3B e 3D, sendo Xgwm155, Xgwm4010 e Xgwm4306, respectivamente (SHERMAN et al., 2008).

A cor vermelha do grão de trigo é utilizada pelos programas de melhoramento genético, como marcador de seleção para tolerância à germinação na espiga. Existem evidências de que o incremento da tolerância à germinação na espiga e a cor vermelha são herdados como efeitos pleiotrópicos dos alelos R dominantes. Desta forma, a possibilidade de variar a dose dos alelos R dominantes, pode aumentar esta tolerância em trigos de grãos vermelhos. Entretanto, há muitas incertezas quanto esta associação. No Brasil, a maioria das variedades de trigo possuem grãos vermelhos, porém, nem todas são tolerantes à germinação na espiga, indicando que não são todos os genes que estão associados a este problema. O mapeamento genético dos genes R pode auxiliar no entendimento desta associação entre os genes R da cor do grão e a tolerância à germinação na espiga.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Núcleo de Biotecnologia da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – COODETEC, em Cascavel, Estado do Paraná no período de fevereiro de 2009 a fevereiro de 2010.

3.1 Material genético

Para a validação/identificação de marcadores moleculares associados à cor do grão de trigo, foram utilizadas duas populações de plantas F_2 obtidas a partir dos seguintes cruzamentos: CD0666/3/PFAU/SERI.1B//AMAD, que segrega para um gene de cor de grãos e CD0559/3/PFAU/SERI.1B//AMAD, que segrega para dois genes de cor de grãos. No decorrer deste trabalho estas populações serão denominadas de PFAU x CD0666 e PFAU x CD0559, respectivamente. Os dados fenotípicos como nota de germinação e cor de grão destas populações foram obtidos anteriormente nas plantas F_2 (SANTOS, 2009). Para a cor atribuiu-se fenótipo de cor vermelha ou branca dos grãos para as espigas de cada planta F_2 , e as notas de germinação na espiga foram

atribuídas por meio de leituras pela escala de notas de 1 a 11 de McMaster e Derera (1976).

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de uma amostra de 10 sementes de cada planta F_2 , e baseada no protocolo de extração descrito por McDonald et al. (1994), com algumas modificações. Em microtubos de 1,5 mL, contendo cerca de 50 mg de sementes moídas, foi adicionado 500 μ L de tampão de extração contendo 0,1 M Tris HCl (pH 7,5), 5 M NaCl, 5 M EDTA e 10% SDS. Em cada tubo foi colocado uma esfera de vidro de 3 mm de diâmetro para facilitar a homogeneização. Os tubos foram agitados em um grinder (ACS, Goiânia) na velocidade 7 ou 8 por dois minutos. Em seguida, foi adicionado a cada amostra mais 600 μ L de tampão de extração, homogeneizado em vortex por 30 segundos e centrifugado por 10 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo devidamente identificado, e em cada amostra foi adicionado 10 μ L de Proteinase K (10 mg mL⁻¹), para eliminação das proteínas. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 500 μ L de isopropanol gelado para a precipitação do DNA. Os microtubos foram centrifugados novamente por 10 minutos a 13.200 rpm. A força centrífuga promove a deposição do DNA no fundo do tubo, chamada de pellet. O sobrenadante foi retirado e o pellet secado por 15 minutos.

Para a eliminação do RNA, foi acrescentado 300 μ L de TE contendo 40 μ g μ L⁻¹ de RNase, incubando-se os microtubos por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida, foi adicionado 500 μ L de isopropanol gelado e deixado precipitar por 2 minutos e novamente centrifugado por 10 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi descartado novamente e depois de seco, o pellet de DNA foi ressuscitado em 300 μ L de TE.

A concentração do DNA de cada amostra foi estimada espectrofotometricamente por absorbância a 260 nm em Nanodrop1000, sendo cada unidade de absorbância correspondente à concentração de 50 μ g mL⁻¹ de DNA de 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). Após a quantificação e confirmação da qualidade do DNA, cada amostra foi diluída com TE, para concentração de 15ng μL^{-1} .

3.3 Amplificação dos locos SSR e eletroforese

Primeiramente foi realizado um *screening* entre os pais PFAU, CD0666 e CD0559, para identificar *primers* polimórficos nas populações utilizadas e que estivessem localizados nas regiões de interesse, nos cromossomos 3A e 3B.

As reações em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas em volume total de 20 μL , que continha: 99 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl_2 , tampão 1x (2 mM de Tris e 5 mM de KCl), 300 μM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,8 μM de cada iniciador (senso e antisenso), e uma unidade de Taq DNA Polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador Thermo Hybaid (Ashford, Middlesex, Reino Unido), programado para um ciclo de 94°C por 3 min., 45 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 2 min., e um ciclo final de 72°C por 10 min.

Após a amplificação, os fragmentos foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 7% e, em seguida, foram corados com nitrato de prata e submetidos à revelação com hidróxido de sódio e após o processo de revelação foram escaneados para armazenamento dos resultados. Um dos *primers* utilizados era marcado com fluorescência, para este foi pipetado 1 μL de reação de PCR pronta e diluído em 50 μL de água ultra-pura. Em seguida, 1 μL foi transferido para outra placa de PCR e adicionado um mix composto por 8,85 μL de formamida (hi-di) e 0,15 μL do padrão de peso molecular (*size standard*) 500LIZ de coloração laranja (Applied Biosystems). Os fragmentos amplificados foram separados em gel capilar, utilizando-se o sequenciador automático ABI 3130xl, de acordo com a recomendação do fabricante.

3.4 Análise dos dados

A análise de ligação entre marcadores moleculares e locos de cor de grão de trigo foi realizada com auxílio do programa GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2006), utilizando a função de mapeamento de Kosambi (1944). Para estimar a recombinação entre marcadores moleculares e um gene R, na população que segrega para dois genes R, foi utilizada uma função de máxima verossimilhança, obtida conforme descrito por Schuster e Cruz (2008). A análise de segregação dos marcadores foi realizada pelo teste de qui-quadrado (χ^2). As associações entre o marcador molecular e a cor do grão, marcador molecular e a germinação na espiga, e cor do grão e a germinação na espiga foram analisadas por meio da tabela de contingência utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2001).

A eficiência de seleção (E.S.), expressa em percentual, foi obtida pela expressão:

$$E.S. = \frac{\text{Número de plantas selecionadas corretamente com o marcador}}{\text{Número total de plantas avaliadas}} \times 100$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 População PFAU x CD 0666

Em trabalho anterior (SANTOS, 2009) foi identificado, pelo estudo de herança, que a população F_2 derivada do cruzamento entre PFAU x CD 0666 segregou para um gene R, que controla a característica cor de grão. Para identificar marcadores moleculares ligados ao gene da cor do grão, os estudos foram direcionados nos cromossomos 3A, 3B e 3D, nos quais anteriormente foram identificados marcadores ligados a genes da cor do grão (SHERMAN et al., 2008). Os marcadores identificados por estes autores não foram utilizados neste trabalho por serem de propriedade particular da empresa Trait Genetics, e a sequência dos marcadores não é pública. A exceção é o marcador Xgwm155, que é público. A posição dos *primers* microssatélite utilizados no

screening dos parentais PFAU e CD 0666 está apresentada nas Figuras 1, 2 e 3. Entre os 44 loci analisados, 38 foram monomórficos e somente 6 apresentaram polimorfismo. Os marcadores polimórficos estão no cromossomo 3A (Xgwm247), 3B (Xbarc229, Xgwm108, Xbarc344 e Xgwm247) e 3D (Xwmc631 e Xbarc323).

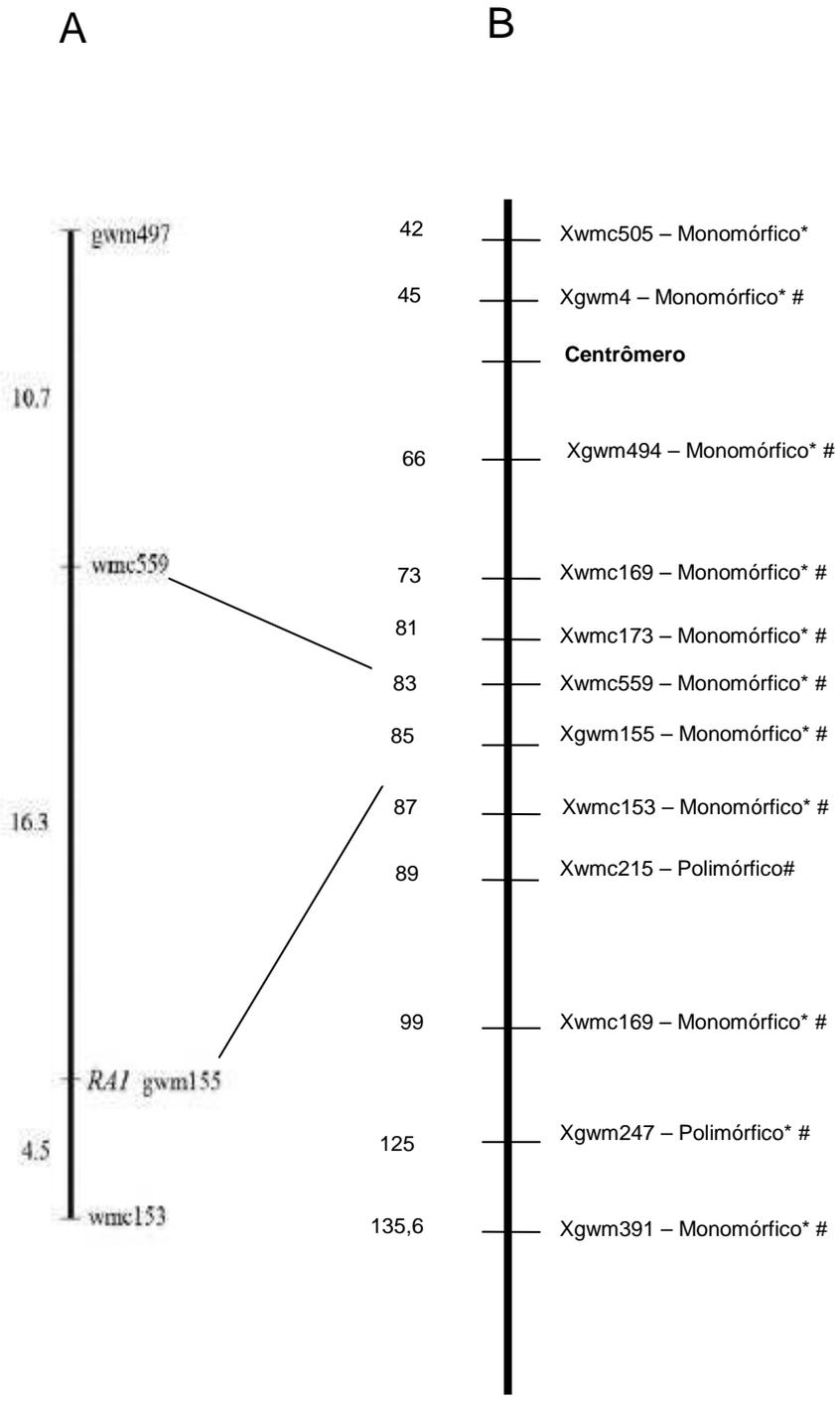
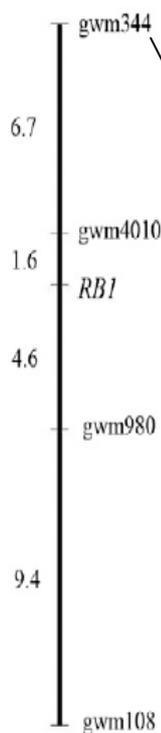


Figura 1- A - Fragmento do cromossomo 3A, contendo o gene RA1 (SHERMAN et al., 2008). B - Localização dos primers no cromossomo 3A utilizados no estudo de mapeamento do gene da cor do grão de trigo, nas populações PFAU x CD 0666* e PFAU x CD 0559#.

A



B

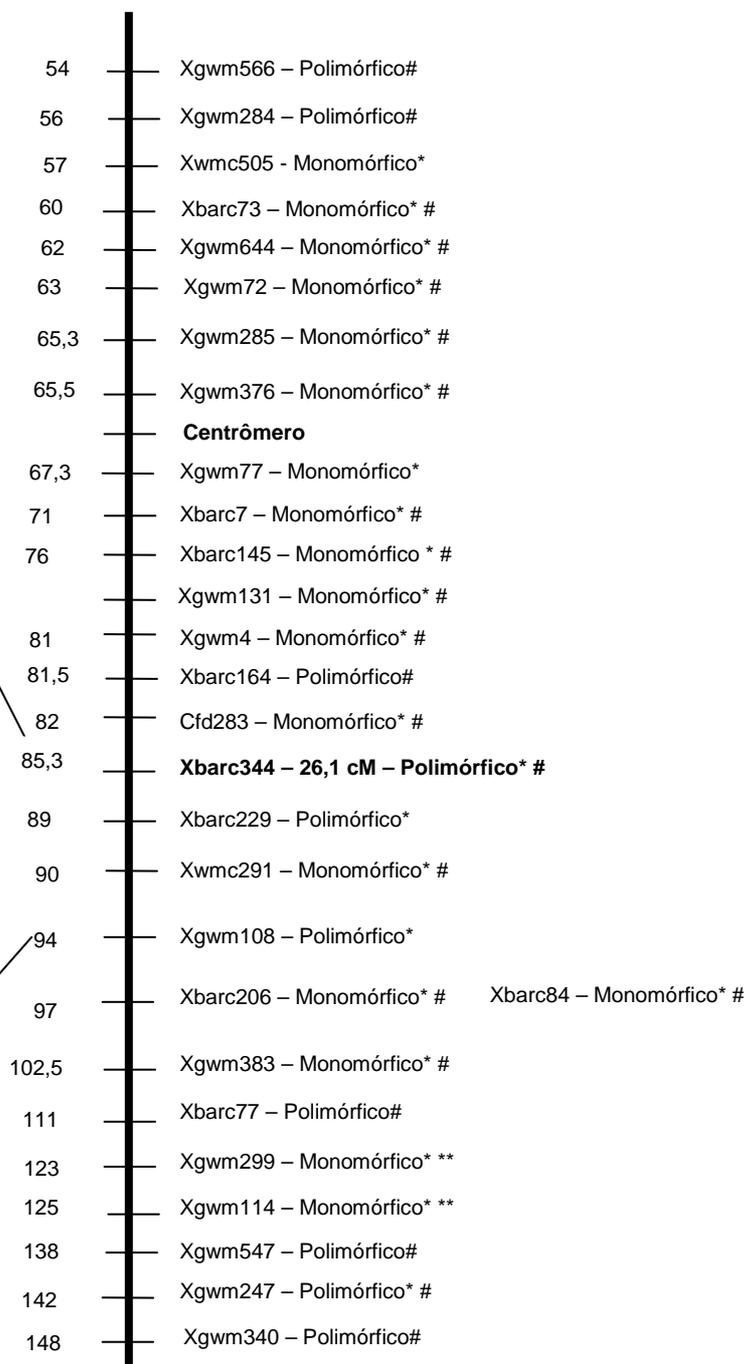


Figura 2- A - Fragmento do cromossomo 3B, contendo o gene RB1 (SHERMAN et al., 2008). B - Localização dos primers no cromossomo 3B utilizados no estudo de mapeamento do gene da cor do grão de trigo, nas populações PFAU x CD 0666* e PFAU x CD 0559[#].

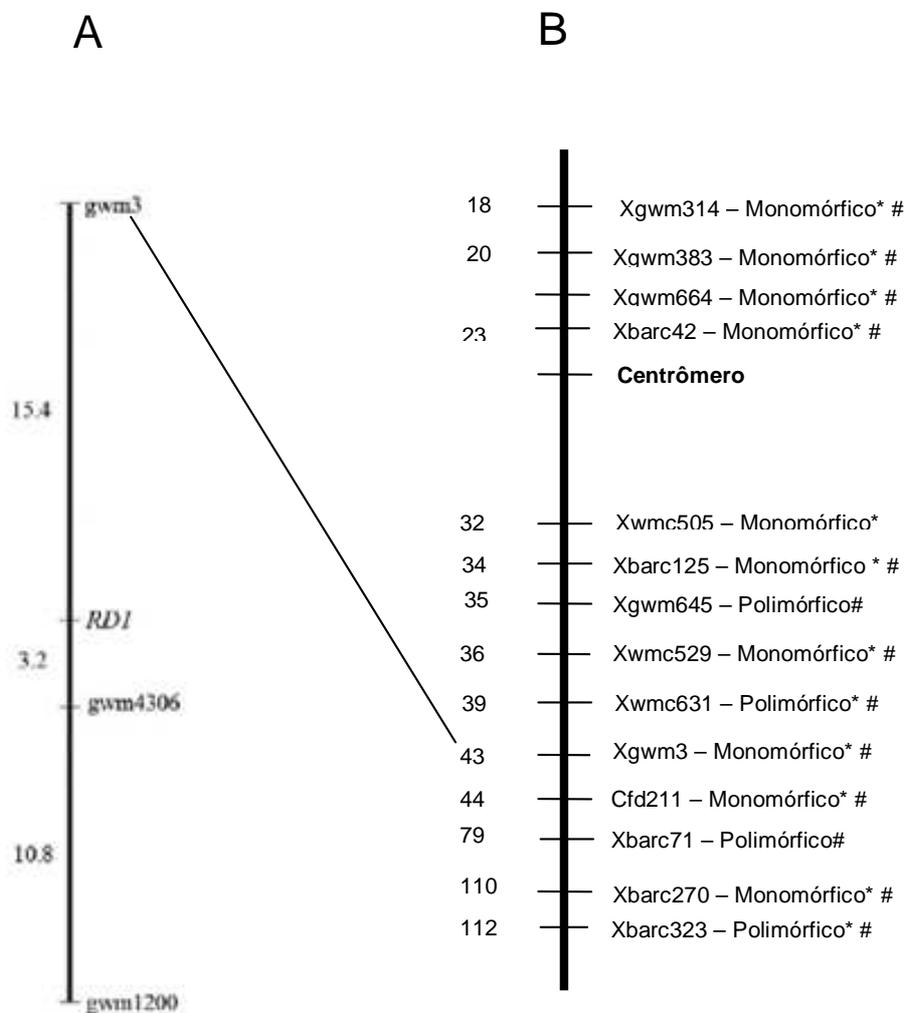


Figura 3- A - Fragmento do cromossomo 3D, contendo o gene RD1 (SHERMAN et al., 2008). B - Localização dos primers no cromossomo 3D utilizados no estudo de mapeamento do gene da cor do grão de trigo, nas populações PFAU x CD 0666* e PFAU x CD 0559#.

Os *primers* que apresentaram polimorfismo foram utilizados para amplificar toda a população de 203 plantas F₂. O teste de qui-quadrado (χ^2), confirmou a segregação mendeliana dos marcadores, exceto para os marcadores Xbarc229 e Xgwm108 (Tabela 1).

Tabela 1 - Segregação dos marcadores moleculares utilizados para mapeamento do gene da cor do grão em trigo na população F₂ derivada de PFAU x CD0666.

Marcador SSR	G.L	Valores observados			Hipótese	χ^2	P%
		CD 0666	Het	PFAU + Het.			
Xbarc344	B	66	99	44	1:2:1	5,21	7,39
Xbarc 229	B	43		88	3:1	4,28	3,86
Xwmc631	D	39	68	51	1:2:1	4,89	8,69
Xbarc323	D	27	31	22	1:2:1	4,68	9,66
Xgwm108	B	123	10	25	1:2:1	42,10	0

G.L: Grupo de Ligação

CD 0666: Homozigoto com o genótipo do progenitor de grão vermelho (CD 0666).

Het: Heterozigoto

PFAU: Homozigoto com o genótipo do progenitor de grão branco (PFAU).

PFAU + Het. Marcador dominante. O genótipo do homozigoto para PFAU e Heterozigoto não pode ser distinguido.

P: Probabilidade

Entre os marcadores polimórficos do grupo 3B, o Xbarc229 somente pode ser avaliado como um marcador dominante e, mesmo assim, não segregou na proporção esperada; por este motivo, não foi considerado nas análises de cosegregação. O marcador Xgwm247 apresentou qualidade de amplificação muito ruim e não pode ser utilizado. O marcador Xbarc344 foi o único que segregou na proporção esperada e apresentou qualidade de amplificação que permitiu a análise de cosegregação (Figura 4). Este marcador está ligado ao gene R, que confere cor do grão em trigo, a uma frequência de recombinação de 24,1%, ou seja, a 26,1 cM, pela função de Kosambi (Tabela 2).

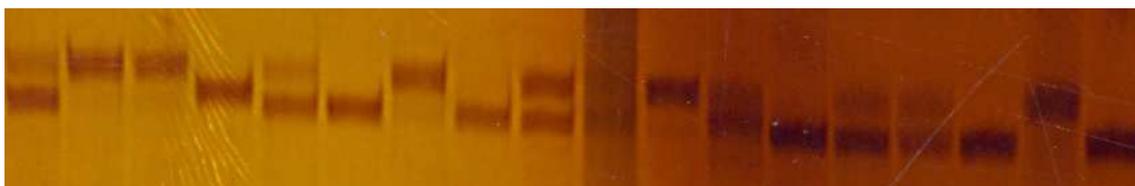


Figura 4 – Padrão de amplificação do DNA de plantas da população PFAU x CD0666 com o *primer* microssatélite Xbarc 344. PF=PFAU; CD=CD0666

Tabela 2 - Marcador localizado no cromossomo 3B identificado como ligado ao gene da cor do grão de trigo.

Marcador	Recombinação %	Desv. Padrão (%)	Distância (cM)	LOD
Xbarc344	24,1	3,36	26,1	8,41

Resultados semelhantes foram encontrados por Sherman et al. (2008), trabalhando com uma população derivada do cruzamento entre DOLLAR x MTHW9904. Os autores identificaram o marcador Xbarc344 ligado ao gene R, a uma distância de 8,3 cM. A maior distância do gene ao marcador, observada no presente estudo, deve-se ao background genético, e a diferença no tamanho das populações avaliadas, que podem resultar em variação nas estimativas de frequência de recombinação. Sherman et al. (2008) estimaram a frequência de recombinação em uma amostra de 96 plantas F₂, enquanto que a população de mapeamento no presente trabalho foi constituída de 203 plantas F₂.

Sherman et al. (2008) mapearam o gene RB1 no cromossomo 3B do trigo. Os autores relataram ligação deste gene com os marcadores Xgwm4010 e Xgwm980, que são de propriedade privada, e não puderam ser utilizados neste estudo. Os autores reportaram, ainda, como ligados ao gene RB1, os marcadores Xbarc344 e Xgwm108. O marcador Xgwm108 apresentou distorção de segregação nesta população, e não pode ser usado na análise de cosegregação. Por este motivo, outros marcadores mapeados no cromossomo 3B (SONG et al., 2005) foram testados. Embora a maior parte dos marcadores tenha sido monomórfica, foi detectada ligação entre o marcador Xbarc344 e a cor do grão de trigo. Como esta população segrega para apenas um gene da

cor de grão de trigo, pode-se concluir que a linhagem CD 0666 possui o gene RB-1, uma vez que o marcador associado está localizado no cromossomo 3B.

Os resultados obtidos, especialmente o grande número de marcadores monomórficos entre os parentais do cruzamento, reforça a recomendação de que a aplicação de marcadores moleculares em populações diferentes daquelas em que foram desenvolvidos requer a validação. Nem sempre o marcador identificado em uma população, ou em um *background* genético, apresenta resultados satisfatórios nas demais populações. Além disso, não são todos os marcadores encontrados na literatura que são públicos, como é o caso dos marcadores Xgwm4010 e Xgwm4306, encontrados como proximamente ligados aos genes R (SHERMAN et al., 2008).

Na Tabela 3 está apresentada a análise de contingência, que compara a análise fenotípica da cor do grão (vermelho e branco), com o genótipo do marcador Xbarc344 na população PFAU x CD 0666. Esta análise também confirma a associação entre a cor do grão de trigo e o marcador Xbarc344 ($\chi^2=57,40$, $P=0\%$). A cor vermelha é dominante e pode-se observar que das 153 plantas de grão vermelho, 90,85% apresentaram genótipo que confirma esta característica, ou seja, alelos do parental CD 0666 em homozigose ou heterozigose. Das 50 plantas com fenótipo de grão branco, 60% apresentam genótipo homozigoto com alelos do parental PFAU. A eficiência de seleção (ES) deste marcador em distinguir genótipos de grão branco de grão vermelho, nesta população, foi de 83,25% calculada com base no número de acertos (139 + 30) divididos pelo número total de indivíduos avaliados (203).

Para uma utilização mais segura dos marcadores para selecionar plantas que possuem, ou que não possuem, o gene RB1, é necessário identificar marcadores mais proximamente ligados. Brogim (2005), em trabalho de mapeamento de genes da ferrugem asiática em soja, obteve eficiência de seleção de 91,43, 89,74, 77,50, 88,89 e 87,18 % para os marcadores, Sat_263, Satt079, Satt277, Satt307 e Staga001, respectivamente. Uma vez que os demais marcadores mapeados nesta região do cromossomo 3B foram monomórficos, é necessário mapear novos marcadores, ou utilizar novas classes de marcadores, tais como marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polimorphysm*), que são mais abundantes do que os SSR.

Tabela 3 - Tabela de contingência comparando a análise fenotípica da cor do grão e a análise genotípica com o marcador Xbarc344 na população PFAU x CD 0666

Fenótipo	Xbarc 344		Total
	Alelo do PFAU	Alelo do CD 0666 e Heterozigotos	
Grão Vermelho	14	139	153
Grão Branco	30	20	50
Total	44	166	203

$\chi^2 = 57,40$
 $P = 0\%$

A cor do grão tem uma grande importância por ter uma relação forte e significativa com a expressão da tolerância a germinação na pré-colheita (BASSOI; FLINTHAM, 2005). Freed et al. (1976), relatam que a presença dos genes R que controlam a cor vermelha estão relacionados com a dormência pós-colheita. Na Tabela 4 está representada a análise de contingência em que se compara o marcador Xbarc 344 com a germinação na espiga nesta população. Pelo teste de χ^2 observa-se que não há associação entre este marcador e a tolerância a germinação na espiga de trigo.

Tabela 4 - Tabela de contingência comparando a análise fenotípica da germinação com o marcador Xbarc 344 na população PFAU x CD 0666.

Fenótipo	Xbarc 344		Total
	Alelo de PFAU	Alelo CD 0666 e Heterozigotos	
Resistente	1	2	3
Suscetível	43	161	204
Total	44	163	207

$\chi^2 = 0,265$
 $P = 60,65\%$

A Tabela 5 contém a análise de contingência entre a cor do grão e a germinação na espiga. O teste de χ^2 também indica não haver associação entre cor de grão e tolerância à germinação na espiga de trigo. Das 154 plantas com sementes vermelhas, apenas 2 apresentaram resistência à germinação na espiga, e das 201 plantas suscetíveis à germinação na espiga, 152 possuíam grãos vermelhos.

Tabela 5 - Tabela de contingência comparando a análise fenotípica da germinação com a análise fenotípica da cor do grão na população PFAU x CD 0666.

Fenótipo	Vermelho	Branco	Total
Resistente	2	1	3
Suscetível	152	49	201
Total	154	50	204

$$\chi^2 = 0,128$$

$$P = 72,04\%$$

Diferentemente dos dados obtidos neste trabalho, em que não houve associação da cor do grão com a germinação na espiga, alguns trabalhos realizados sugerem que há ligação relativamente forte ou pleiotropia entre a cor do grão e a tolerância à germinação na espiga (FREED et al., 1976; FLINTHAM; GALE, 1988; FLINTHAN; HUMPHRAY, 1993). Wu e Carver (1999), em trabalhos de campo confirmaram diferenças nos danos por germinação na espiga entre cultivares de grãos brancos e vermelhos. Cultivares de grãos brancos são consideradas mais suscetíveis, já as de grãos vermelhos apresentam grande variação na resistência ao problema. Esta relação entre a coloração do grão e a dormência das sementes ainda não está clara se é baseada em genes pleiotrópicos ou ligados (BELDEROK, 1975).

Mesmo que alguns trabalhos indiquem que cultivares de grãos brancos são mais sensíveis à germinação na espiga do que as de grãos vermelhos, (McCaig; DePAUW, 1992), outros trabalhos apontam que a herança da dormência pode ser independente da cor do grão (PATERSON; SORRELS, 1990). Cunha et al., 2004 relatam que as evidências indicam que o controle da dormência e da germinação na espiga envolve mais que os genes da cor. Wellington (1956) propõe diferenças morfológicas indicando que grãos de cor vermelha tem a casca mais resistente que os grãos brancos.

A ocorrência de dormência nas sementes na fase pré-colheita é o principal fator para conferir resistência ou tolerância à germinação na espiga (MIURA et al., 1997). No cromossomo 4A, estão mapeados os marcadores Xgwm397, Xbarc170 e Xbarc343 (SONG et al., 2005). Os genes R são dominantes, e estudos de herança da tolerância à germinação na espiga (dormência), identificaram genes recessivos controlando esta característica. Franco (2008) identificou no

cromossomo 4A o marcador Xbarc170 associado com o gene recessivo que controla a dormência.

Com todas estas incertezas relacionadas à cor do grão e sua associação com a germinação da espiga, Flintham e Gale (1988), indicam a manipulação de alelos da cor vermelha como caminho mais seguro para uma dormência de longa duração. Por este motivo, há necessidade de identificar marcadores moleculares ligados aos genes R. Embora a cor de grão seja uma característica fácil de selecionar em trigo, há necessidade de avaliar se existe associação de algum gene R específico e a tolerância a germinação na espiga. Isso explicaria o fato de que algumas cultivares de grão vermelho são mais tolerantes e outras não apresentam tolerância, enquanto que as cultivares de grão branco são suscetíveis. Havendo esta associação de algum gene R específico com a tolerância à germinação na espiga, a identificação de marcadores moleculares associados à cor do grão de trigo representa uma ferramenta promissora no melhoramento genético para selecionar genótipos mais tolerantes.

Devido ao alto nível de marcadores monomórficos encontrados para a realização deste estudo, e a busca constante por técnicas que facilitem o trabalho dos melhoristas na seleção assistida, menciona-se o uso do mapeamento a partir do desequilíbrio de ligação (DL). No mapeamento de ligação, por ser amostrada uma fração pequena de todos os possíveis alelos em uma determinada espécie, os marcadores moleculares associados a genes ou QTLs geralmente só podem ser usados nas populações em que foram desenvolvidos (CAHILL; SHMIDT, 2004; HOLLAND, 2004). Por outro lado, o mapeamento por desequilíbrio de ligação compreende a associação entre genótipos (haplótipos) e avaliação fenotípica, por meio da avaliação do polimorfismo genético que foi gerado em diferentes backgrounds por meio de muitas gerações de recombinação (DEKKERS; HOSPITAL, 2002; NORDBORG; TAVARÈ, 2002). Este tipo de mapeamento detecta e localiza QTLs baseados na intensidade da correlação entre marcadores moleculares mapeados e as características fenotípicas.

Após várias gerações de recombinação, em uma população não estruturada, apenas correlações entre QTLs e marcadores proximamente

ligados devem permanecer, facilitando o mapeamento mais fino (MACKAY; POWELL, 2007). Neste tipo de mapeamento, não há necessidade do preparo de uma população para o mapeamento, e avalia-se o genoma inteiro para identificar regiões associadas a determinado fenótipo.

4.2 População PFAU x CD 0559

A população F_2 derivada de PFAU x CD 0559 segrega para dois genes (R) de cor do grão (SANTOS, 2009). Os parentais foram também avaliados com os marcadores localizados nos cromossomos 3A, 3B e 3D (Figuras 1, 2 e 3). Dos 48 loci analisados nos três cromossomos, 14 apresentaram polimorfismo e estão localizados no cromossomo 3A: Xgwm247, Xwmc215; Cromossomo 3B: Xbarc164, Xbarc77, Xbarc344, Xgwm247, Xgwm566, Xgwm547, Xgwm284, Xgwm340 e Cromossomo 3D: Xwmc631, Xbarc323, Xgwm645 e Xbarc71.

Uma população F_2 derivada do cruzamento entre CD 0559 x CD 0666, não segregou para cor de grão, sendo que todas as plantas F_2 apresentaram sementes vermelhas, como os genótipos parentais. Isso indica que ambos os parentais compartilham pelo menos um gene R. Como a linhagem CD 0666 possui apenas o gene RB-1, pode-se concluir que a linhagem CD 0559 também possui este gene. Para avaliar esta hipótese, os marcadores Xbarc164 e Xbarc77 foram utilizados em todos os indivíduos da população. O marcador Xbarc344 não foi utilizado em toda a população F_2 , pois nesta população a qualidade de amplificação com este marcador não permitiu a correta identificação dos genótipos das plantas. O marcador Xwmc631 também foi avaliado na população F_2 completa.

A segregação mendeliana dos marcadores foi confirmada pelo teste de qui-quadrado (χ^2), exceto para o marcador Xbarc164 (Tabela 6).

Tabela 6 - Segregação dos marcadores moleculares utilizados na população PFAU x CD 0559 no grupo de ligação 3B para mapeamento do gene da cor do grão em trigo.

Marcador SSR	Valores observados			Hipótese	χ^2	P%
	HCD0559	Het	HPFAU			
Xbarc 164	67	74	53	1:2:1	12,99	0,16
Xbarc 77	56	91	46	1:2:1	1,66	43,53
Xwmc 631	18	31	18	1:2:1	0,37	82,98

HCD 0559: Homozigoto com o genótipo do progenitor com grão vermelho (CD 0559).

Het: Heterozigoto.

HPFAU: Homozigoto com o genótipo do progenitor com grão branco (PFAU).

P: Probabilidade.

Para características que são controladas por dois genes, como a cor do grão de trigo, na população derivada de PFAU x CD 0559, a estimativa da frequência de recombinação entre um marcador e um destes genes deve levar em conta a segregação independente dos dois genes. Considerando que a cor do grão seja controlada pelos genes A e B, e que a cor vermelha é dominante, para estimar a frequência de recombinação entre um marcador M e o gene B, por meio do método da máxima verossimilhança, é necessário utilizar as frequências apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Genótipos, fenótipos e frequências esperadas para um marcador e dois genes controlando uma característica fenotípica, considerando a possibilidade de ligação genética do marcador com um dos genes.

Genótipo	Fenótipo	Frequência esperada
A_B_MM	Vermelho	$3/16(1-r^2)$
A_B_Mm	Vermelho	$3/8(1-2+r^2)$
A_B_mm	Vermelho	$3/16r(2-r)$
A_bbMM	Vermelho	$3/16r^2$
A_bbMm	Vermelho	$3/8r(1-r)$
A_bbm	Vermelho	$3/16(1-r)^2$
aaB_MM	Vermelho	$1/16(1-r^2)$
aaB_Mm	Vermelho	$1/8(1-2+r^2)$
aaB_mm	Vermelho	$1/16r(2-r)$
aabbMM	Branco	$1/16r^2$
aabbMm	Branco	$1/8r(1-r)$
aabbmm	Branco	$1/16(1-r)^2$

r = frequência de recombinação entre o marcador M e o gene B.

No entanto, o genótipo dos dois genes não é observado nas plantas F₂. Considerando apenas as informações observáveis, ou seja, apenas o genótipo do marcador e o fenótipo, as frequências esperadas são aquelas apresentadas na Tabela 8. Uma vez que se dispõe das frequências esperadas e de valores observados, a frequência de recombinação pode ser estimada por meio do método de máxima verossimilhança, conforme descrito por Schuster e Cruz (2008).

Tabela 8 – Relação de genótipos de um marcador e fenótipo da cor de grão, frequências esperadas, e valores observados para os marcadores Xbarc164, Xwmc631, Xbarc77 em uma população F₂ de trigo.

Genótipo/fenótipo	Frequência esperada	Número Observado	Valores Observados	
			Xwmc631	Xbarc77
MM / Vermelho	$1/16(4-r^2)$	n ₁	16	50
Mm / Vermelho	$1/8(4-r+r^2)$	n ₂	25	88
mm / Vermelho	$1/16(3+2r-r^2)$	n ₃	17	43
MM / Branco	$1/16r^2$	n ₄	2	4
Mm / Branco	$1/8r(1-r)$	n ₅	6	3
mm / Branco	$1/16(1-r)^2$	n ₆	1	1

O valor de r que maximiza a função de máxima verossimilhança obtida é r=0,47 para o marcador Xbarc164, e r=0,5 para os marcadores Xwmc631 e Xbarc77. Ou seja, nenhum dos marcadores está ligado ao gene que confere cor vermelha ao grão de trigo.

O marcador Xbarc77 localiza-se no cromossomo 3B, e esperava-se que estivesse ligado ao gene RB-1, que está presente nesta população. O marcador Xwmc631 está no cromossomo 3D. Sherman et al. (2008), relatam um gene para cor de grão neste cromossomo (RD-1), na região próxima ao marcador Xwmc631. Mas na população derivada de CD 0559 x PFAU, também não foi detectada ligação genética deste marcador com o gene de cor.

Uma vez que a linhagem CD 0559 possui dois genes R (SANTOS, 2009), deveria ter sido detectada ligação de pelo menos um destes marcadores com um gene R de CD 0559. Além disso, como a população derivada do cruzamento entre CD 0559 x CD 0666 não segregou para cor de grão (SANTOS, 2009), é de se esperar que a linhagem CD 0559 tenha o gene RB-1, presente na linhagem CD 0666. Uma das causas desta falta de associação

destes marcadores com a cor do grão de trigo na população derivada de CD 0559 pode ser o tamanho da população estudada.

Schuster e Cruz (2008) apresentam os estimadores para o tamanho de população a ser utilizada em estudos de mapeamento, em função do poder estatístico dos estimadores. Na população derivada de CD 0666 o marcador Xbarc344 está ligado a uma frequência de recombinação de 0,26 do gene responsável pela cor do grão de trigo no cromossomo 3B. O tamanho mínimo de população necessário para obter uma estimativa de frequência de recombinação igual a 0,26 entre um marcador codominante e uma característica controladas por 2 genes dominantes, com LOD score mínimo de 3,0, é de 429 plantas F_2 . Ou seja, mais do que o dobro da população utilizada. Para uma característica controlada por um gene, na mesma condição (marcador codominante e gene dominante), o tamanho mínimo de população para obter LOD score mínimo de 3,0 para frequência de recombinação de 0,26, é 83 indivíduos.

O mapeamento genético dos três genes R presentes no trigo, com a utilização de marcadores moleculares públicos, é uma necessidade para a avaliação da associação específica de cada gene R com a tolerância à germinação na espiga em trigo. Este mapeamento é mais facilmente realizado, se populações que segreguem para apenas um gene forem utilizadas para o mapeamento. Neste caso, populações que segreguem para cada um dos genes R devem ser obtidas. Esta tarefa não é trivial, uma vez que não se sabe quais genes R cada cultivar possui.

O mapeamento dos genes R também pode ser realizado em populações que segreguem para mais de um gene. No entanto, para ter a possibilidade de sucesso na identificação de marcadores moleculares associados aos genes R presentes em parentais que possuam dois genes, populações F_2 maiores deverão ser utilizadas.

No presente trabalho foi validado o marcador Xbarc 344 ligado ao gene RB-1 em trigo. Diversos marcadores moleculares localizados na região genômica do gene RB-1 foram monomórficos na população F_2 que segrega para este gene. Também, diversos marcadores moleculares localizados nas regiões que contém os genes RA-1, RB-1 e RD-1 foram monomórficos entre os

parentais que contrastam para dois genes R. Isso demonstra a necessidade de validação de marcadores moleculares antes de seu uso em rotinas de seleção assistida.

5. CONCLUSÕES

- A linhagem CD 0666 possui o gene RB-1 que codifica para cor vermelha do grão de trigo.

- O marcador Xbarc344 está ligado a 26,1 cM do gene RB-1 na população PFAU x CD 0666.

- Para esta mesma população, foi identificado que não há associação entre o marcador Xbarc344 e a tolerância à germinação na espiga, e também, não há associação entre a cor do grão e a tolerância à germinação na espiga.

- Não foi detectada ligação de nenhum dos marcadores dos cromossomos 3A, 3B e 3D, utilizados na população PFAU x CD 0559, a gene(s) que confere(m) a cor vermelha do grão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, Chicago, v.132, n.4, p.1131-1139, 1992.

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

ANDREOLI, C.; BASSOI, C.; BRUNETTA, D. Genetic control of seed dormancy and pré-harvest sprouting in wheat. **Sciencia Agricola**, Piracicaba, v.63, n.6, p.564-566, 2006.

BAILEY, P.C.; McKIBBIN, R.S.; LENTON, J.R.; HOLDSWORTH, M.J.; FLINTHAM, J.E.; GALE, M.D. Genetic map locations for orthologous *Vp1* genes in wheat and rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, n.2, p.281-284, 1999.

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

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

BELDEROK, B. Physiological-biochemical aspects os dormancy in wheat. **Cereal Research Communications**, Szeged, v.4, n.2, p.133-137, 1975.

BELDEROK, B. Changes in the seed coat of wheat kernels during dormancy and after-ripening. **Cereal Research Communications**, Szeged, v.4, n.2, p.165-171, 1976.

BENNETT, M.D.; SMITH, J.B., Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, v.274, p.227-274, 1976.

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

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, n.3, p.314-331, 1980.

BUCHANAN, F.C.; ADAMS, L.J.; LITTEJOHN, R.P.; MADDOX, J.F. CRAWFORD, A.M. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. **Genomics**, v.22, n.2, p.397-403, 1994.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, n. 5-6, p.816-827, 1998.

BROGIN, R.L. **Mapeamento de genes de resistência a ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja**. 2005. 93 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B. de; BRITO, G.G de; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.) **Marcadores moleculares**. 2ª ed., Viçosa, UFV, 2009, p.11-94.

CAHILL, D.J.; SHMIDT, D.H. Use of Marker Assisted Selection in a Product Development Breeding Program. In: Fisher, T. (ed). **New directions for a diverse planet**. Proc. of the 4th Int. Crop Science Congress, Brisbane, QLD, Australia, 26 Sept – 1 Oct. 2004. Disponível em www.cropscience.org.au/icsc2004/ (verificado em 30 de abril de 2008). The Regional Institute Ltd., Gosford, NSW, Austrália.

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: Artmed, 2004. p.149-162.

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**, Ottawa, v.64, n.2, p.457-463, 1984.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos: Trigo **Companhia Nacional de Abastecimento** – Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>, Brasília, Acesso em: 08, dezembro, 2009.

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v.39, n.2, p.1464-1490, 1999.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001, 648p.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 9.1. 2006. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: 20 de novembro de 2009.

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

DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, Hampshire, v.3, n.1, p.22-32, 2002.

DePAUW, R.M.; McCAIG, T.N. Recombining dormancy and white seed color in a spring wheat cross. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.63, n.1, p.581-589, 1983.

DYCK, P.L.; J.S. NOLL; CZANECKI, E. Heritability of RL4137 type of dormancy in two populations of random inbred lines of spring wheat. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.66, n.2, p.855–861, 1986.

FANAN, S.; MEDINA, P.F.; LIMA, T.C.; MARCOS-FILHO, J. Avaliação do vigor de sementes de trigo pelos testes de envelhecimento acelerado e de frio. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.2, p.152-158, 2006.

FEDERIZZI, L.C.; CANCI, P.C.; MILACH, S.C.K.; BARBOSA NETO, J.F.; PACHECO, M.T. Hibridação em trigo. In: BORÉM, A. **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999, p.481-497.

FEDERIZZI, L.C.; SCHEEREN, P.L.; BARBOSA-NETO, J.F.; MILACH, S.C.K. PACHECO, M.T. Melhoramento do trigo. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. 969p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. p. 220, 2ª edição (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20).

FLINTHAM, J.E. Colour grain and sprout-resistance in wheat. In: WALKER-SIMMONS, M.K; REED, J.L. (eds.) **Pre-harvest sprouting in cereals**, 1992. St Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1993. p.30-36.

FLINTHAM, J.E. Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat. *Seed Science Research*, Cambridge, v.10, n.1, p.43-50, 2000.

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

FLINTHAM, J.E.; ADLAM, R.E; GALE, M.D. Seed coat and embryo dormancy in wheat. In: **8° International symposium on pre-harvest sprouting in cereals**, 1999, Detmold, **Proceedings** Detmold: Association of Cereal Research and Federal Centre for Cereal; Potato and Lipid Research, 1999. p.67-76.

FLINTHAM, J.E.; GALE, M.D. Dormancy gene maps in homoeologous cereal genomes. In: Noda K, Mares DJ (eds) **Pre-harvest sprouting in cereals**, Osaka: Center for Academic Societies, 1996. p.143-149.

FLINTHAM, J.E.; GALE, M.D. Genetics of pre-harvest sprouting and associated traits in wheat: review. **Plant Varieties & Seeds**, Oxford, v.1, n.2, p.87-97, 1988.

FLINTHAM, J.E.; HUMPHREY, S.J. Red coat genes and wheat dormancy. In: KETTLEWELL, P.S. et al. (ed.) **Cereal quality III. Aspects of Applied Biology**, Vol. 36, Wellesbourne: Association of Applied Biologists, 1993. p. 135–141.

FRANCO, F.A. **Estudo da tolerância à germinação na pré-colheita e identificação de marcadores moleculares associados à dormência em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.)**. 2008. 105 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

FREED, R.D.; EVERSON, E.H.; RINGLUND, K.; GULLORD, M. Seed coat color in wheat and the relationship to seed dormancy at maturity. **Cereal Research Communications**, Szeged, v.41, n.1, p.147-149, 1976.

GALE, M.D.; ATKINSON, M.D.; CHINOY, C.N.; HARCOURT, R.L.; JIA, J.; LI, Q.Y.; DEVOS, K.M. Genetic maps of hexaploid wheat. In: **8° International wheat genetics symposium**, 1995, Beijing. **Proceedings**. Beijing: Agricultural Sciencetech, 1995. p.29-40.

GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANC, M.; GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, n.2, p.1069-1076, 1998.

GROOS, C.; GAY, G.; PERRETANT, M.R.; GERVAIS, L.; BERNARD, M.; DEDRYVER, F.; CHARMET, G. Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a white x red grain bread wheat cross. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.104, n.2, p.39-47, 2002.

HOLLAND, J. Implementation of molecular markers for quantitative traits in breeding programs – change and opportunities. In: Fisher, T. (ed). **New**

directions for a diverse planet. Proc. of the 4th Int. Crop Science Congress, Brisbane, QLD, Australia, 26 Sept – 1 Oct. 2004. Disponível em www.cropscience.org.au/icsc2004/ (verificado em 30 de abril de 2008). The Regional Institute Ltd., Gosford, NSW, Austrália.

HUANG, G.; MCCRATE, A.J.; VARRIANO-MARSTON E.; PAULSEN, G.M. Caryopsis structural and imbibitional characteristics of some hard red and white wheats. **Cereal Chemistry Botany**, Minnessota, v.60, n.3, p.161-165, 1983.

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**, Berlin, v.102, n.3, p.980-985, 2001.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Ann Eugen.**, v.12, p.172-175, 1944.

KULWAL, P.L.; KUMAR, N.; BALYAN, H.S.; GAUR, A.; KHURANA, P.; KHURANA, J.P.; TYAGI, A.K.; GUPTA P.K. Mapping of a major QTL for pre-harvest sprouting tolerance on chromosome 3A in bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.111, n.2, p.1052-1059, 2005.

KURAPARTHY, V; SOOD, S.; GILL, B.S. Targeted Genomic Mapping of a Red Seed Color Gene (*R-A1*) in Wheat. **Crop Science**, Madison, v.48 (Supplement_1), p.S37-S48, 2008.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genetics*, Chicago, v.44, n.3, p.397-401, 1989.

LIU, Z.W.; BIYASHEV, R.M.; MARROF, M.A.S. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.93, n.2, p.869-876, 1996.

McCAIG, T.N.; DePAUW, R.M. Breeding for preharvest sprouting tolerance in white-seed-coat spring wheat. **Crop Science**, Madison, v.32, n.1, p.19-23, 1992.

McCOUCH, S.R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.35, n.1/2, p.89-99, 1997.

McCOUCH, S.R.; TEYTELMAN, L.; XU, Y.; LOBOS, K.B.; CLARE, K.; WALTON, M.; FU, B.; MAGHIRANG, R.; LI, Z.; XING, Y.; ZHANG, Q.; KONO, I.; YANO, M.; FJELLSTROM, R.; DECLERCK, G.; SCHNEIDER, D.; CARTINHO, S.; WARE, D.; STEIN, L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oriza sativa* L.). **DNA Research**, Oxford, v.9, n.6, p.199-207, 2002.

- MACKAY, I.; POWELL, W. Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v.12, n.3, p.57-63, 2007
- McDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, Zurich, v.22, n.1, p.171-176, 1994.
- McINTOSH, R.A.; HART, G.E.; DEVOS, K.M.; GALE, M.D.; ROGERS W.J. Catalogue of gene symbols for wheat. p.117. In: **Proc. 9th International Wheat Genetics Symposium**. Saskatoon: University Extension Press, University of Saskatchewan, v.5, 1998.
- McMASTER, G.J.; DERERA, N.F. Methodology and sample preparation when screening for sprouting damage in cereals. **Cereal Research Communications**, Szeged, v.4, n.2, p.251-254, 1976.
- MARES, D.J.; MIRVA, K. Mapping quantitative trait loci associated with variation in grain dormancy in Australian wheat. **Australian Journal Agricultural Research**, Melbourne, v.52, n.2, p.1257-1265, 2001.
- METZGER, R.J.; SILBAUGH, B.A. Locations of genes for seed coat colour in hexaploid wheat, *Triticum aestivum*, L. **Crop Science**, Madison, v.10, p.495-496, 1970.
- MIURA, H.; FUKUDA, Y.; SAWADA, S. Expression of dormancy in diallel F1 and F2 seed of wheat reaped under controlled environment. **Journal of Genetics and Breeding**, Roma, v.51, n.3, p. 195-200, 1997.
- 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, n.5, p.394-399, 2002.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. de. Citogenética. In: OSÓRIO, E.A. (Ed.). **Trigo no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1982. p.95-144.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Gainesville, v.3, n.1, p.175-182, 1993.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.55, n.2, p.335-350, 1987.
- NILSSON-EHLE, H. Zur Kenntnis der mit der keimungsphysiologie des weizens in zusammenhang stehenden inneren faktoren. **Zeitschrift für Pflanzenzüchtung**, Berlin, v.2, n.3, p.153-187, 1914.
- NORDBORG, M.; TAVARÈ, S. Linkage disequilibrium: what history has to tell us. **Trends Genetics**, London, v.18, n.2, p.83-90, 2002.

- PATARSON, A.H.; SORRELLS, M.E. Inheritance of grain dormancy in White-kernelled wheat. **Crop Science**, Madison, v.30, n.1, p.25-30, 1990.
- PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S.; COSTA, F.R. da Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.) **Marcadores moleculares**. 2ª ed., Viçosa: UFV, 2009. p.103-128.
- PLASCHKE, J., M. W. GANAL AND M. S. RÖDER Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.91, n.5, p.1001-1007, 1995.
- RÖDER, M.S.; PLASCHKE, J.; KÖNIG, S.U.; BÖRNER, A.; SORRELLS M.E. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. **Molecular Genetics and Genomics**, Gothenburg, v.246, n.3, p.327-333, 1995.
- RÖDER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M.; LEROY, P.; GANAL, M.W. A microsatellite map of wheat. **Genetics**, Chicago, v.149, n.4, p.2007-2023, 1998.
- 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**, Chicago, v.99, n.1-2, p.336-340, 1999.
- REDDY, L.V.; METZGER, R.J.; CHING, T.M. Effect of temperature on seed dormancy of wheat. **Crop Science**, Madison, v.25, n.2, p.455-458, 1985.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor: CSHL, 1989.
- SANTOS, L.T.; **Efeito da coloração de grãos de trigo sobre a tolerância à germinação pré-colheita**. 2009. 39f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá 2009.
- SCHLOETTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, London, v.354, n.6348, p.63-65, 1991.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos**. Viçosa: UFV, 2008. 568p.
- SENIOR, M.L.; CHIN, E.C.L.; LEE, M. SMITH, J.S.C.; STUBER, C.W. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. **Crop Science**, Madison, v.36, n.4, p.1676-1683, 1996.

- SHERMAN, J.D.; SOUZA, E.; SEE, D.; TALBERT, L.E. Microsatellite Markers for Kernel Color Genes in Wheat. **Crop Science**, Madison, v.48, n.4, p.1419-1424, 2008.
- SOPER, J.F.; CANTRELL, R.G.; DYCK, J.W. Sprouting damage and kernel color relationship in durum wheat. **Crop Science**, Madison, v.29, n.1, p.895-898, 1989.
- 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**, Chicago, v.110, n.5, p.550-560, 2005.
- TAYLOR, M.R.; BRESTER, G.W.; BOLAND, M. Hard white wheat and gold medal flour: General Mills contracting program. **Review of Agricultural Economics**, v.27, p.117-129, 2005.
- TEMNYKH, S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research**, v.11, n.8, p.1441-1452, 2001.
- TORADA, A.; AMANO, Y. Effect of seed coat color on seed dormancy in different environments. **Euphytica**, Wageningen, v.26, n.7, p.99-105, 2002.
- WATANABE, N.; IKEBATA, N. The effects of homoeologous group-3 chromosomes on grain color dependent dormancy and brittle rachis in tetraploid wheat. **Euphytica**, Wageningen, v.115, n.3, p.215-220, 2002.
- WELLINGTON, P.S. Studies on the germination of cereals. II. Factors determining the germination behavior of wheat grains during maturation. **Annals of Botany**, London, v.20, n.2, p.481-500, 1956.
- WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, London, v.5, n.6, p.185-189, 1989.
- WU, J.; CARVER, B.F. Sprout damage and pre-harvest sprout resistance in hard white winter wheat. **Crop Science**, Madison, v.39, n.2, p.441-447, 1999.
- YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **The Journal of Heredity**, Washington, v.91, n.6, p.429-434, 2000.
- ZANETTI, S.; WINZELER, M.; KELLER, M.; KELLER, B.; MESSMER, M. Genetic analysis of pre-harvest sprouting resistance in a wheat spelt cross. **Crop Science**, Madison, v.40, n.3, p.1406-1417, 2000.