

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NO
MELHORAMENTO GENÉTICO DO TRIGO**
ÁREA: MELHORAMENTO VEGETAL

Aluna: Simone Andressa Dobner
Supervisor: Prof. Dr. Antônio Costa de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Robson Fernando Missio

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a conclusão do
CURSO DE GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
EM BIOTECNOLOGIA

PALOTINA-PR
Agosto de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NO
MELHORAMENTO GENÉTICO DO TRIGO**

Aluna: Simone Andressa Dobner
Supervisor: Prof. Dr. Antônio Costa de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Robson Fernando Missio

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a conclusão do
CURSO DE GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
EM BIOTECNOLOGIA

PALOTINA - PR
Agosto de 2013

AGRADECIMENTOS

À minha mãe pela determinação e luta na minha formação, por sempre acreditar na minha capacidade e nunca me deixar desistir, e a minha irmã, que mesmo distante sempre esteve pronta para uma palavra de conforto nos momentos difíceis.

Às amigas Soili, Laís, Karine e Tharyn, pelas conversas e motivação nos momentos de desânimo e dificuldade, além de sempre estarem presentes em todos os momentos em que foram necessárias, e ao amigo Luís Felipe, por todas as conversas e momentos de companheirismo durante a graduação.

À Michele, Ariele e Glaucia pela hospedagem durante a realização do estágio, além das risadas, conversas e apoio que foi concedido.

Aos novos amigos conquistados, Zé, Wesley, Matheus, Ana, Cândida, Isabella e Dênis, e todos os demais que amenizaram a saudade de casa durante a estadia em Pelotas.

À mestranda Taiane Peres Viana, pela paciência cedida e por todos os conhecimentos compartilhados, além da amizade, companheirismo e motivação durante este período.

Aos colegas de CGF William e Railson pelos momentos de descontração proporcionados, e a todos os demais estagiários, mestrandos e pós-doutorandos que de alguma forma tornaram meus dias melhores.

Ao meu orientador professor Dr. Robson Fernando Míssio pela confiança, apoio e sugestões, o que tornou possível a conclusão deste trabalho.

Ao meu supervisor professor Dr. Antônio Costa de Oliveira que possibilitou a realização deste estágio.

À Universidade Federal do Paraná e Universidade Federal de Pelotas.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	A CULTURA DO TRIGO	2
2.2	A GIBERELA	4
2.3	MARCADORES MOLECULARES	6
2.3.1	Marcadores Microsatélites	7
2.4	MELHORAMENTO DO TRIGO	8
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1	LOCAL DE ESTÁGIO	9
3.2	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	10
3.2.1	Semeadura do trigo	10
3.2.2	Coleta de tecido vegetal	10
3.2.3	Extração de DNA	11
3.2.4	Preparo da PCR	12
3.2.5	Preparo do gel de agarose e eletroforese	13
3.2.6	Quantificação e diluição de DNA	14
3.2.7	Montagem da placa para eletroforese em gel de poliacrilamida	15
3.2.8	Preparo do gel de poliacrilamida e eletroforese	15
3.2.9	Revelação do gel em nitrato de prata	16
3.2.10	Material vegetal utilizado na análise de dados	16
3.2.11	Análise de géis	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5	CONCLUSÕES	19
6	REFERÊNCIAS	21

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação das cultivares de trigo em relação à giberela.	17
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de vida do patógeno.....	4
FIGURA 2. Giberela ou fusariose da espiga do trigo. Espiga com sintomas típicos da doença (A), grãos giberelados (B), <i>Gibberella zeae</i> em meio seletivo (C), macroconídios de <i>Fusarium graminearum</i> (D).....	5
FIGURA 3. Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel.....	9
FIGURA 4. Plantas de trigo após 14 dias de semeadura.	10
FIGURA 5. Esquema simplificado das etapas de extração de DNA.	12
FIGURA 6. Termociclador PTC 100 – MJ Research usado na PCR.....	13
FIGURA 7. Aplicação das amostras em gel de agarose.	14
FIGURA 8. Dendrograma gerado pelo método UPGMA entre as 9 cultivares de trigo com diferentes graus de resistência a giberela.	18
FIGURA 9. Polimorfismo observado em gel de agarose. Ordem de aplicação: 1 Kp Plus DNA Ladder, Frontana, Pampeano, BRS 194, BRS 220, Marfim, Valente, Supera, Quartzo, Itaipu.	19

RESUMO

A giberela (*Fusarium graminearum*) tem sido apontada como uma das principais doenças do trigo (*Triticum aestivum* L.). Além de causar perdas de produtividade e de qualidade dos grãos, apresenta efeitos nocivos à saúde dos homens e animais devido ao acúmulo de micotoxinas nos grãos infectados. O controle desta doença através de tratamento químico com o uso de fungicidas apresenta baixa eficiência, portanto, a utilização de variedades resistentes é uma alternativa para a produção de trigo livre de giberela. Marcadores moleculares permitem a identificação de polimorfismo em nível de DNA, minimizando a interferência ambiental e aumentando a confiabilidade na distinção dos mesmos, demonstrando o potencial dos genótipos para serem utilizados nos programas de melhoramento genético. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo em 9 cultivares comerciais de trigo utilizando 20 marcadores microssatélites, avaliar a divergência genética entre as cultivares e verificar o potencial das mesmas como genitoras para futuros cruzamentos com o intuito de obter genótipos superiores e resistentes a giberela. As cultivares de trigo utilizadas foram: Frontana, Pampeano, BRS 194, BRS 220, Marfim, Valente, Supera, Itaipu e Quartzo. Os resultados obtidos indicaram elevada variabilidade genética entre as cultivares de trigo avaliadas. As cultivares Marfim e Supera apresentaram a menor distância genética, já a cultivar Pampeano foi a que mais se diferenciou das demais, desse modo, pode-se dizer que as hibridações mais promissoras podem ser conseguidas a partir de cruzamentos das cultivares Pampeano com Marfim e Supera, já que essas apresentam maior distância genética. A porcentagem de polimorfismo obtida foi de 85%. Dentre os 20 *primers* utilizados, somente três apresentaram-se monomórficos, deste modo, os demais são os mais indicados para a avaliação de cultivares de trigo em relação à resistência a giberela.

PALAVRAS-CHAVE: *Triticum aestivum*, giberela, polimorfismo.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de plantas cultivadas vem desde os tempos remotos, porém a redescoberta das leis de Mendel e o avanço nos conhecimentos de genética, estatística, bioquímica e fisiologia, associados às práticas da genética quantitativa, da mutagênese, da cultura de células e tecidos e, desde a década de 70, da biologia molecular, auxiliaram na criação de novas variedades de plantas (MORAES FERNANDES, 2000).

O melhoramento vegetal é importante para a criação de variedades mais produtivas, mais tolerantes a estresses e adaptadas a diferentes ambientes; pode ser realizado tradicionalmente ou através da biotecnologia. O melhoramento convencional utiliza-se das características observadas em campo, como rendimento e resistência ao selecionar os genótipos utilizados nos cruzamentos. Já através da biotecnologia, a escolha dos parentais pode ser realizada com base no genótipo, o que diminui o tempo de seleção e acelera a obtenção de novas cultivares (MILACH, 1998).

Os países que atualmente dominam a economia mundial também são os que mais investiram em pesquisas genéticas e em melhoramento (MORAES FERNANDES, 2000). O melhoramento para resistência a doenças é um dos principais objetivos do melhoramento de plantas.

O trigo é um dos cereais mais produzidos no mundo e um dos principais alimentos da humanidade. No Brasil, a produção oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas por ano, enquanto o consumo tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas. A maior concentração da produção está na região Sul (CONAB, 2013).

Contudo, o trigo apresenta um elevado número de doenças, sendo a giberela uma das mais importantes. Essa doença é causada pelo fungo *Gibberella zeae* e afeta a qualidade dos grãos, reduzindo o peso e prejudicando a aparência da planta, além de possibilitar a produção de micotoxinas pelo fungo, que são prejudiciais ao homem e aos animais que deles se alimentam (LIMA, 2004).

A identificação e mapeamento de genes no genoma do trigo é uma estratégia biotecnológica que fornece informações importantes quanto ao tipo de resistência envolvida. A principal técnica utilizada para essa identificação são os marcadores moleculares. Esta tecnologia associada com o melhoramento genético clássico torna um programa de melhoramento mais eficaz e eficiente (MILACH, 1998).

No presente relatório serão descritas as atividades desenvolvidas durante o estágio obrigatório supervisionado, realizado no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF), pertencente à Universidade Federal de Pelotas (UFPeL).

O estágio teve como objetivo aplicar os conhecimentos adquiridos durante as aulas teóricas e práticas na Universidade Federal do Paraná, através do acompanhamento e realização de atividades no laboratório de Biologia Molecular, relacionados a projetos de pesquisa e melhoramento genético de cultivares de trigo, além de verificar, através da utilização de marcadores microssatélites, a divergência genética e o potencial como genitoras de 9 cultivares de trigo contrastantes para a característica de resistência a giberela, visando compor cruzamentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO TRIGO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma planta anual, autógama e pertence à família das Poaceas (BRAMMER, 2000). É um dos cereais mais produzidos no mundo e é utilizado na panificação, fabricação de farinha, massas, biscoitos, cerveja, além da alimentação de animais (CUNHA, 2009).

Teve sua domesticação iniciada a cerca de 10.000 anos na região da Mesopotâmia (Sudeste da Ásia) (PIANA e CARVALHO, 2008). Foi introduzido na Índia, China, Europa em 5000 a.C. (BRAMMER, 2000), e no Brasil em 1534, por Martin Afonso de Souza, na Capitania de São Vicente, atual Estado de São Paulo (LAGOS, 1983).

A migração do cultivo do trigo para os pólos e Equador foi favorecida pela seleção natural e pelo surgimento de cultivares mais adaptadas a ambientes diversificados, essa adaptabilidade da planta a diversas regiões é reflexo dos muitos genes envolvidos neste caráter (CASTRO; KLUGE, 1999).

As espécies do gênero *Triticum* possuem sete cromossomos e podem ser divididas de acordo com o nível de ploidia: diplóides ($2n=14$ genoma AA), tetraplóides ($2n=28$ genomas AABB) e hexaplóides ($2n=42$ genomas AABBDD). Atualmente, as espécies cultivadas em grande escala são o trigo duro tetraplóide *Triticum turgidum* L. e o trigo de panificação hexaplóide, *Triticum aestivum* L. (SILVA, 2006).

As espécies de trigo evoluíram a partir de cruzamentos naturais que ocorriam entre espécies ancestrais e plantas daninhas, resultando em espécies mais produtivas e adaptadas às novas condições ecológicas (MORAES FERNANDES, 2000).

A partir de um cruzamento natural entre uma espécie diplóide de trigo (*T. monococcum*) e uma gramínea silvestre, também diplóide, *Aegilops speltoides*, originou-se um produto diplóide que, após sofrer uma duplicação cromossômica natural, deu origem ao *T. turgidum* L. e outras espécies tetraplóides. As espécies hexaplóides surgiram do cruzamento natural entre uma espécie tetraplóide (*T. turgidum* Jakubz) e uma gramínea silvestre do gênero *Aegilops*, provavelmente a forma anual diplóide *Aegilops squarrosa*, e após duplicação cromossômica natural deu origem às formas hexaplóides, como o *T. aestivum* L. (SOBRINHO e SOUZA, 1983; CURTIS *et al.*, 2002).

O trigo foi introduzido no Rio Grande do Sul em 1737, com a chegada dos imigrantes açorianos, constituindo-se na principal cultura da região na época, porém em 1811, com o surgimento da ferrugem os trigais foram destruídos. Em 1823 o cereal deixou de ser cultivado no sul do País. Posteriormente, em 1875, com o início da imigração italiana na região colonial de Caxias do Sul o trigo voltou a ser semeado, porém restrito às pequenas propriedades e utilizado apenas como alimento pela população local. Contudo, a boa adaptação de algumas cultivares italianas introduzidas possibilitou a consolidação do trigo no sul do Brasil. Mais adiante, os preços elevados no mercado mundial aumentaram a produção nacional (SCHEEREN *et al.*, 2011).

O trigo é uma cultura de importância econômica e considerada uma *commodity* agrícola. O Brasil produz de 0,5 a 1% da produção mundial, o Rio Grande do Sul e Paraná são os estados que mais contribuem para essa produção, com aproximadamente 90% do volume total produzido no País. Porém, devido à baixa produção e elevado consumo, torna-se necessário a importação do cereal, proveniente principalmente da Argentina (CONAB, 2013).

O Brasil possui um grande potencial para produção e transformação do trigo devido à disponibilidade de terras, clima favorável, tecnologia e agricultores experientes, desse modo pode aumentar sua produção e reduzir a dependência externa, porém, deve superar os problemas de altos custos de produção, dificuldade de acesso ao crédito, falta de diferenciação de insumos, precariedade da logística, e infraestrutura de armazenagem e transporte (MEZIAT; VIEIRA, 2009).

2.2 A GIBERELA

A giberela ou fusariose da espiga é uma doença causada pelo fungo *Gibberella zeae* e de difícil controle, sua ocorrência é altamente influenciada pelo ambiente. A doença ataca o trigo principalmente a partir do início da floração e em regiões onde ocorrem chuvas frequentes e contínuas, temperaturas de 20-25 °C e molhamento foliar de, no mínimo, 48 horas consecutivas são condições favoráveis à infecção (MARCHIORO; FRANCO 2010).

O patógeno, durante o seu ciclo de vida (Figura 1), apresenta a fase saprofítica e a fase parasitária, produzindo esporos sexuais (ascósporos) e assexuais (conídios). Durante a fase saprofítica, sobrevive na forma sexual e recebe o nome de *G. zeae*, caracterizada pela produção de corpos de frutificação, os peritécios. Na presença do hospedeiro, ocorre a liberação de ascósporos do interior dos peritécios, que, ao atingirem as espigas, germinam, dando início à fase parasitária, que se transforma na fase assexual, denominada *Fusarium graminearum* (LIMA, 2004).

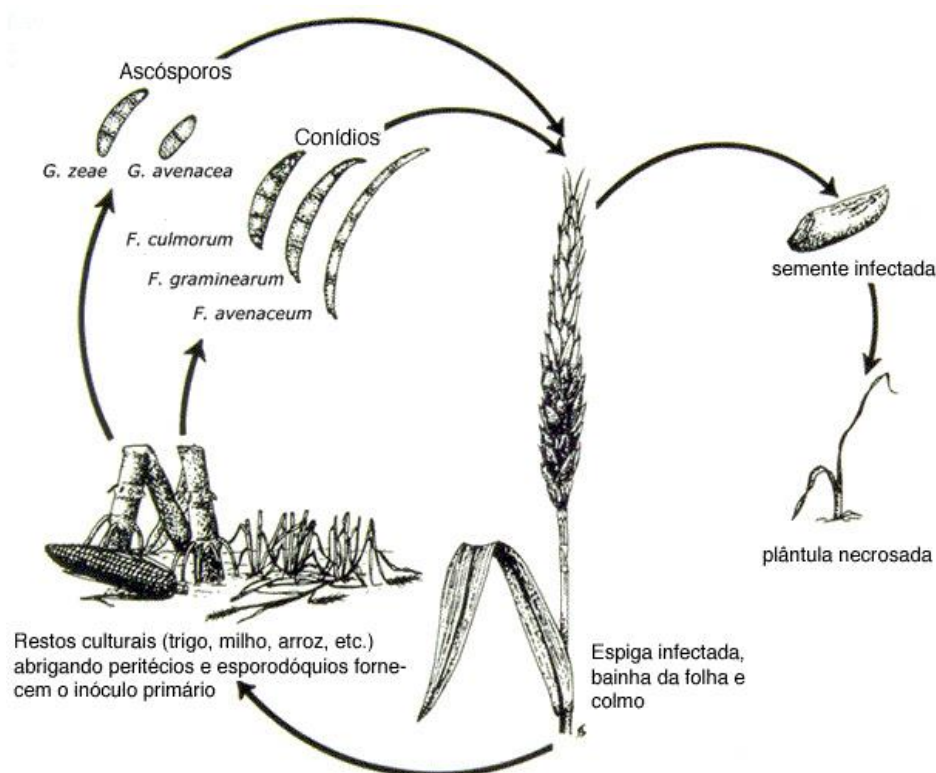


FIGURA 1. Ciclo de vida do patógeno. Fonte: DEL PONTE *et al.*, 2004.

Os sintomas característicos são espiguetas despigmentadas, de coloração esbranquiçada ou cor de palha (Figura 2). A giberela pode causar o abortamento de flores ou a

formação de grãos chochos, enrugados, de coloração rósea a esbranquiçada, que podem ser tóxicos para o ser humano e animais devido a presença de micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas por fungos (LIMA, 2004).



FIGURA 2. Giberela ou fusariose da espiga do trigo. Espiga com sintomas típicos da doença (A), grãos giberelados (B), *Gibberella zeae* em meio seletivo (C), macroconídios de *Fusarium graminearum* (D). Fonte: DEL PONTE *et al.*, 2004.

No caso do *Fusarium graminearum* a principal micotoxina produzida durante o processo de infecção é a deoxynivalenol (DON) (LORI *et al.*, 2003).

A infecção é iniciada nas anteras, sua remoção precoce (emasculação) reduz drasticamente a intensidade da doença (STRANGE & SMITH, 1971). A infecção dissemina-se na espiga através da raquis, o patógeno progride a partir desse ponto através da utilização de enzimas (KANG; BUCHENAUER, 2000).

A manutenção de restos culturais na superfície do solo facilita a produção e a disseminação de ascósporos de *G. zeae*. A produção de ascósporos por *G. zeae* em resíduos de trigo é viável por até dois anos após a colheita, o que indica uma fonte de inoculo em longo prazo (PEREYRA; DILL-MACKY, 2004).

A curta distância a disseminação dos macroconídios é realizada através do respingo da chuva, já a longa distância os ascósporos são transportados pelo vento (REIS, 1988). Insetos e pássaros também podem servir como vetores do patógeno a campo (SUTTON, 1982).

No Brasil, a giberela causou prejuízos nas safras de 1957, 1975 e 1982, e devido às condições favoráveis tornou-se um problema mais preocupante no Sul do Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul. As epidemias mais recentes de giberela na região sul do Brasil foram registradas em 1997, 1998, 2000 e 2002 (LIMA, 2004).

Atualmente não existe uma cultivar de trigo que seja completamente resistente a giberela e ao mesmo tempo tenha alta produtividade. Desse modo, é recomendável associar o uso de cultivares com maior resistência genética ao controle químico, além do escalonamento da semeadura dentro do período recomendado ou o cultivo de cultivares com ciclos distintos, para possibilitar o escape da doença (CUNHA, 2009).

2.3 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, diferenciando assim dois ou mais organismos, e são herdados geneticamente (MILACH, 1998). São utilizados nos programas de melhoramento genético de plantas, pois aumentam a eficiência e proporcionam maiores ganhos genéticos em culturas de interesse econômico (BORÉM; CAIXETA, 2009). Além de serem altamente polimórficos, possuem ausência de influência ambiental, apresentam baixo custo por dado gerado e são distribuídos em todo o genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Atualmente vários marcadores moleculares são conhecidos, estes são diferenciados pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA, habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Os marcadores moleculares podem ser divididos em dois grupos: os baseados em hibridação, como o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), e os que empregam o uso da PCR (Polymerase Chain Reaction), como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); Microsatélite; e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (MILACH, 1998).

Devido à possibilidade de acessar a variabilidade do DNA que não é influenciada pelo ambiente, os cruzamentos podem ser planejados, o que maximiza as diferenças genéticas entre genótipos elites. Os marcadores moleculares podem ser utilizados em estudos de

evolução, detecção da variabilidade genética, identificação e localização de genes, mapeamento de locos de resistência, dentre outros (MILACH, 1998).

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares disponíveis, uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismo entre seqüências de DNA é a utilização de marcadores microssatélites (LITT; LUTY, 1989).

2.3.1 Marcadores Microssatélites

Os marcadores microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeat”) são seqüências de um a seis pares de bases repetidas em tandem, distribuídas no genoma e encontradas em alta frequência. Esse tipo de marcador utiliza iniciadores específicos (*primers*) que amplificam regiões com DNA repetitivo. Os alelos diferem porque mostram números distintos de repetições, oriundos de *crossing-over* desigual durante a meiose ou ao deslize da DNA polimerase durante a duplicação da molécula. As variações no número de repetições constituem-se em variações no comprimento do segmento amplificado via PCR, os quais são detectados pela separação destes fragmentos por meio da eletroforese (BUSO *et al.*, 2003).

Os microssatélites são codominantes e multialélicos, altamente polimórficos e reprodutíveis, e são baseados na PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2006), podem ser utilizados para mapeamento genômico, estudos de ligação, identificação de genótipos, proteção de variedades, avaliação de pureza de sementes, utilização e conservação de germoplasma, estudos de diversidade, análise gênica e de locos quantitativos (QTL), seleção assistida por marcadores moleculares e análise de bibliotecas para clonagem de genes (CAIXETA *et al.*, 2009).

Os microssatélites são classificados conforme a composição das seqüências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção (GTGTGT); (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo (GTGTAGTGT); (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições de microssatélites estão dispostas adjacentes (GTGTCACA) (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Em alguns casos pode ocorrer a conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas, possibilitando aproveitar *primers* desenvolvidos para uma determinada espécie e empregá-los em outras espécies filogeneticamente próximas (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996). Um estudo de transferabilidade de locos microssatélites de arroz para genótipos de

trigo foi realizado por CARVALHO (2007), porém a análise do polimorfismo não permitiu a identificação de marcadores que pudessem ser associados à resistência para fusariose do trigo.

2.4 MELHORAMENTO DO TRIGO

O melhoramento vegetal teve início com o processo de domesticação das plantas, quando os agricultores, com seu instinto de observação aguçado, detectavam plantas superiores na lavoura e as colhiam para a obtenção de sementes (BORÉM; MIRANDA 2009).

No Brasil, a criação de novas cultivares de trigo teve início em 1914, quando o químico Jorge Polissú selecionou uma nova variedade de sementes provenientes de Guaporé, RS (GUARIENTI, 2009).

Em 1919 foram criadas as primeiras estações experimentais para pesquisar o cereal: a Estação Experimental de Alfredo Chaves, em Veranópolis (RS), e a Estação Experimental de Ponta Grossa (PR). Posteriormente o melhoramento do trigo também passou a ser pesquisado pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em 1973, pelo Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT) e pela OCEPAR (Organização das Cooperativas do Estado do Paraná) em 1974 (SCHEEREN *et al.*, 2011).

Em 1925, o geneticista sueco Iwar Beckman realizou os primeiros cruzamentos artificiais de trigo no Brasil, destacando-se como resultado a cultivar “fronteira”, resistente a ferrugem amarela. Em 1929 este pesquisador realizou o cruzamento dos trigos “fronteira” com “mentana”, obtendo o trigo “frontana”, utilizado até hoje em cruzamentos visando a tolerância a germinação na espiga e resistência durável à ferrugem da folha (GUARIENTI, 2009).

A adaptação do trigo para as condições de clima e solo do Paraná foi iniciada nos anos 70 e consolidada por instituições de pesquisa, como IAPAR, COODETEC e Embrapa, utilizando o melhoramento genético e desenvolvendo técnicas eficientes de manejo da cultura (BRUNETTA E DOTTO, 2000). O programa de melhoramento genético na Embrapa Soja, em parceria com a Embrapa Trigo, a partir de 1992, teve como finalidade apresentar cultivares com melhores características como: tolerância ao alumínio tóxico, resistência às doenças, potencial e estabilidade no rendimento de grãos, qualidade industrial e ampla adaptação.

Até 1997 as empresas de melhoramento desenvolviam as atividades de avaliação e recomendação de novas cultivares de forma cooperativa, porém a partir de 1998, com a

aprovação da Lei de Proteção de Cultivares, cada empresa ficou responsável pelos seus experimentos e lançamentos (TAVARES *et al.*, 2011).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular (Figura 3) no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), pertencente à Universidade Federal de Pelotas (UFPel) situada na cidade do Capão do Leão, Rio Grande do Sul.

O CGF foi criado em 1987, pelo professor Fernando Irajá Félix de Carvalho, e conta com os Laboratórios de Biologia Molecular e Duplo-Haplóides. Atualmente é coordenado pelo professor Dr. Antônio Costa de Oliveira, que desenvolve pesquisas nas áreas de recursos genéticos e melhoramento de plantas e é referência nacional e internacional no melhoramento vegetal.

O CGF atende alunos de graduação no desenvolvimento de estágio, e orienta alunos de pós-graduação em nível de mestrado, doutorado e pós-doutorado, além de manter intercâmbio com pesquisadores de outras instituições e de outros países, como Itália, França, África, dentre outros.



FIGURA 3. Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel.

3.2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

3.2.1 Semeadura do trigo

A semeadura de sementes provenientes de planta F1, obtidas pelo cruzamento entre Frontana x Itaipu, foi realizada em vasos de plástico contendo $\frac{3}{4}$ de terra (Figura 4). Foram utilizados 20 vasos e em cada um destes foram colocadas 7 sementes. As plantas foram irrigadas diariamente e mantidas em casa de vegetação durante 18 dias, até atingirem tamanho suficiente para a realização da coleta.



FIGURA 4. Plantas de trigo após 14 dias de semeadura.

3.2.2 Coleta de tecido vegetal

A coleta do tecido vegetal foi realizada em casa de vegetação com a utilização de luvas e óculos. As 89 amostras foliares foram envolvidas em papel alumínio, anteriormente numerado para a identificação das plantas, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para evitar a degradação do DNA até ser realizada a extração.

3.2.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada no laboratório de biologia molecular seguindo o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987), com modificações, conforme descrito a seguir: 150 mg de folhas jovens foram maceradas em cadinhos através da utilização de nitrogênio líquido e pistilos, até a obtenção de um pó bem fino, que foi transferido para novo tubo de 1,5 ml onde foram adicionados 700 µL de tampão CTAB (100 mM de Tris-HCl; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA; 2% de CTAB; 1% de PVP; 0,5% de β-mercaptoetanol). Os tubos foram fechados, agitados no vórtex por 30 segundos e invertidos manualmente 50-60 vezes para que o material ficasse em suspensão. As amostras foram colocadas em banho-maria por 60 minutos a 60 °C e agitadas manualmente a cada 10 minutos para manter a suspensão, após a incubação ficaram em repouso a temperatura ambiente durante 5 minutos. A seguir, foram adicionados 700 µL de CIA 24:1 (Clorofórmio: Alcool Isoamílico), os tubos foram invertidos 50-60 vezes e foi realizada uma centrifugação a temperatura ambiente a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado (700 µL, ou o máximo que foi possível retirar) e transferido para um novo tubo de 1,5 ml, onde foram adicionados 700 µL de etanol para a precipitação do DNA, em seguida os tubos foram agitados por inversão 50 vezes, colocados no freezer e deixados overnight.

No dia seguinte foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 10 min para formar o *pellet*. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 700 µL de etanol 70%, mantidos por 20 minutos, após a retirada foram adicionados 300 µL de etanol 100% por alguns segundos e novamente o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente sobre papel absorvente para a evaporação do álcool até o *pellet* secar. Posteriormente foram adicionados 50 µL de TE-RNase e as amostras foram deixadas em banho-maria durante 1 hora a 37°C para a digestão do RNA, os tubos foram armazenados no freezer até a utilização do DNA.

As principais etapas envolvidas na extração de DNA estão demonstradas na figura a seguir.

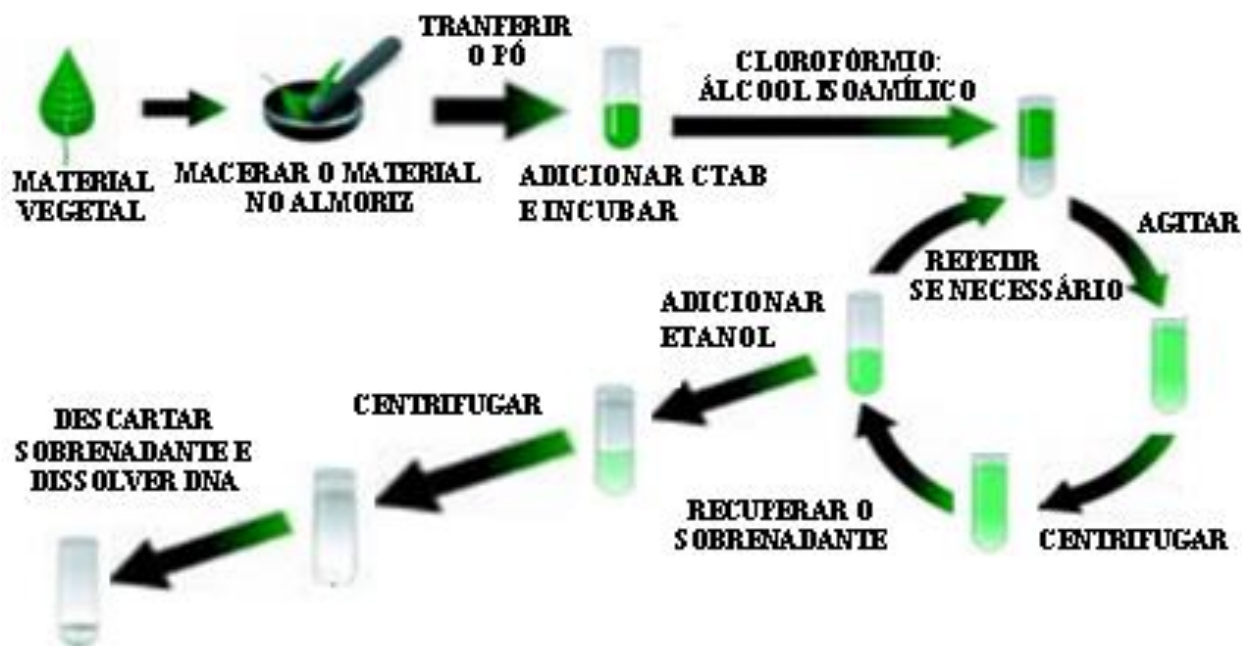


FIGURA 5. Esquema simplificado das etapas de extração de DNA.

3.2.4 Preparo da PCR

Para a elaboração do mix das reações de amplificação foram misturados na seguinte ordem: 2 μL de DNA, 2,75 μL de água Invitrogen®, 2,5 μL de *primer* (1,25 μL de *primer forward* e 1,25 μL de *primer reverse* na concentração de 10mM cada), e 6,25 μL do kit comercial GoTaq Green® Master Mix da Promega, obtendo um volume final de 13,5 μL . A seguir os tubos foram colocados na centrífuga ou mini-spin por alguns segundos e depois transferidos para o termociclador (Figura 6) programado para uma desnaturação inicial de três minutos a 94 °C, seguido por 45 ciclos repetidos nas seguintes condições: um minuto a 94 °C (desnaturação), um minuto a 60 °C (anelamento) e dois minutos a 72°C (extensão). Por fim, foi efetuada uma etapa de extensão final de dez minutos a 72°C. Após a PCR procedeu-se a eletroforese, ou quando não foi possível, a reação foi mantida no freezer por até 72 h.



FIGURA 6. Termociclador PTC 100 – MJ Research usado na PCR.

3.2.5 Preparo do gel de agarose e eletroforese

O gel de agarose pode ser utilizado tanto para a quantificação, quanto para a separação dos fragmentos dos ácidos nucléicos. Para a quantificação os géis foram preparados na concentração de 1%, onde em um erlenmeyer foram pesadas 0,3g de agarose e adicionados 30 ml de tampão TBE 1X; já para a separação dos fragmentos o gel de agarose foi preparado na concentração de 3%, através da pesagem de 0,9g de agarose e adição de 30 ml de tampão TBE 1X, a seguir todas as etapas são iguais para o preparo dos géis.

Após misturar os componentes, a solução foi levada ao micro-ondas e aquecida até a dissolução da agarose, em seguida a solução foi despejada na canaleta e o pente foi ajustado no local desejado; após a polimerização o pente foi removido e foi adicionado tampão TBE 1X para a hidratação do gel, ou então este foi guardado em um vasilhame contendo tampão até sua utilização.

Para a realização da eletroforese, em cada amostra que sofreu amplificação por PCR foram acrescentados 0,5 μL de Blue Green Loading Dye da Invitrogen®, em seguida 6 μL de cada amostra foram aplicados nos poços do gel (Figura 7). O marcador foi composto por 2 μL de Blue Green Loading Dye, 2 μL de 1 Kb Plus DNA Ladder da Invitrogen® e 2 μL de Blue Juice da Invitrogen®, este foi aplicado no primeiro poço do gel.

Após o término da corrida, o gel foi visualizado no fotodocumentador para observar a presença e a distribuição dos ácidos nucléicos.

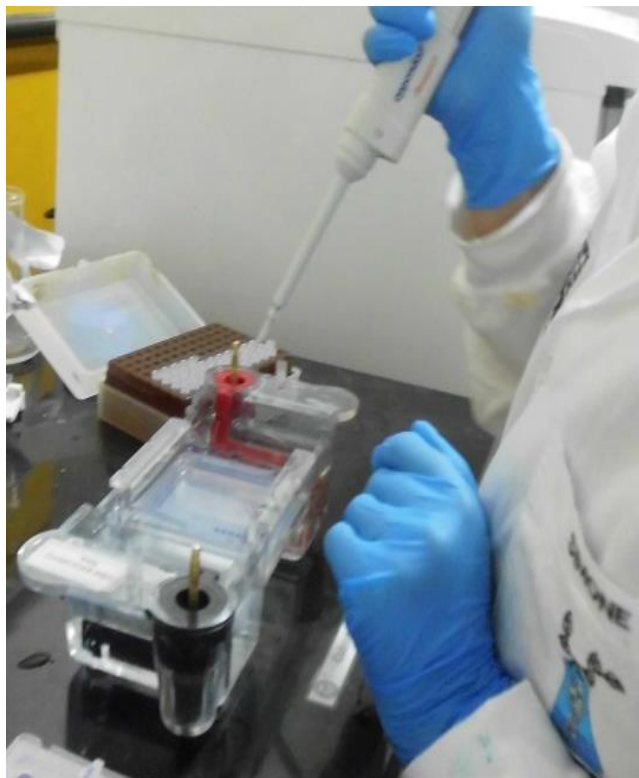


FIGURA 7. Aplicação das amostras em gel de agarose.

3.2.6 Quantificação e diluição de DNA

Para a quantificação do DNA foram utilizados 2 μL de Blue Juice; 0,5 μL de Blue Green Loading Dye e 2 μL de DNA, estes foram misturados e em seguida aplicados no gel.

O marcador de peso molecular utilizado para a comparação das bandas produzidas foi o Low DNA Mass Ladder da Invitrogen®, 2 μL deste foram misturados a 2 μL de Blue Juice e 2 μL de Blue Green Loading Dye e aplicados no primeiro poço do gel. Foi realizada uma corrida de aproximadamente 15 minutos a 84 V e a visualização foi realizada em fotodocumentador para verificar se o DNA necessitava diluição e preparar as soluções de trabalho.

A diluição do DNA foi realizada conforme a comparação visual da banda produzida pela amostra no gel com as bandas do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder. As amostras foram padronizadas para a concentração 50-100 ng e então diluídas nas concentrações de 1:3 (10 μL de DNA para 30 μL de água Invitrogen®), 1:2 (10 μL de DNA para 20 μL de água Invitrogen®) e 1:1 (10 μL de DNA para 10 μL de água Invitrogen®), algumas não necessitaram diluição.

3.2.7 Montagem da placa para eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a montagem da placa as mesmas foram primeiramente lavadas com água e sabão e enxaguadas com água deionizada. A seguir foram tratadas com álcool 40% e álcool etílico absoluto, procedimento realizado duas vezes em cada placa, alternadamente, sempre com álcool absoluto na última lavagem.

Na placa maior foram gotejados 1000 μL de Repel-Silane e o mesmo foi espalhado com papel toalha homogeneamente, o processo foi repetido e então a placa foi deixada em repouso por 5 minutos; o Repel-Silane faz com que o gel não grude na placa e descole mais facilmente no momento de realizar a revelação. Na placa menor foram espalhados 995 μL de ácido acético + 5 μL etanol absoluto e 3 μL de Bind-Silane, a solução foi homogeneizada sobre a placa, deixando secar por 5 minutos; o Bind-Silane favorece a colagem do gel no vidro. O procedimento foi realizado em capela de exaustão e entre o preparo das placas foi realizada a troca das luvas para não haver contaminação e perda permanente das mesmas.

A seguir, os espaçadores foram colocados nas placas e elas foram sobrepostas, os lados foram vedados com fita durex, as placas foram inclinadas e o gel foi vertido. O pente foi colocado virado para a formação do “nível” e as placas foram vedadas com filme plástico para evitar contaminação e escorrimento da acrilamida, foram colocados grampos nas laterais para ajudar no processo de formação do gel. As placas ficaram em repouso até o dia seguinte para completa polimerização do gel, quando a vedação e o pente foram retirados e as placas foram colocadas na cuba.

3.2.8 Preparo do gel de poliacrilamida e eletroforese

O gel de poliacrilamida foi preparado na concentração de 5%, através da mistura de 63 ml TBE 5X + uréia; 31,5 mL de acrilamida; 45 μL de TEMED e 30 μL de APS.

Para a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida foram aplicados 3 μL de solução desnaturante (solução desnaturante 99% de formamida; 0,5% de EDTA 0,5M; 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol) em cada tubo contendo as amostras que sofreram amplificação por PCR e em seguida as amostras foram desnaturadas durante 4 minutos a 95 °C no termociclador, quando retiradas foram colocadas diretamente em um suporte gelado para não haver a renaturação do DNA.

Em seguida o tampão de corrida (TBE 1X) foi colocado na cuba e a região superior do gel foi lavada com a seringa para retirar o excesso de uréia, o pente foi colocado para a formação dos poços. Foi realizada uma pré-corrída com a aplicação de 500 µL de solução desnaturante em cada lado da placa para formar duas linhas de frente de corrida; a pré-corrída estabiliza o gel. Foram aplicados 6 µL da amostra em cada poço, para o marcador de peso molecular utilizou-se 3 µL de 1 Kb Plus e 3 µL de solução desnaturante. Após término da corrida as placas foram retiradas e foi realizada a revelação com nitrato de prata.

3.2.9 Revelação do gel em nitrato de prata

Para realizar a revelação do gel em nitrato de prata, primeiramente foi realizada a fixação do gel com ácido acético durante 30 minutos sob agitação orbital. A seguir ocorreu o enxágue do gel por 5 minutos, houve a troca da água e mais um enxágue durante 5 minutos. Posteriormente houve a coloração do gel com solução de prata através de agitação por 30 minutos. A placa foi retirada da solução de prata e emergida em água, sendo então colocada no 1º recipiente com solução reveladora e agitada até aparecerem as primeiras bandas. Foi então transferida para o 2º recipiente com solução reveladora por mais 2-3 minutos e quando começou a escurecer foi acrescentado 1 litro de solução de fixação para o bloqueio da reação, foi então agitado lentamente por 3 minutos. Por fim, houve um enxágue final e a placa foi guardada na capela com o gel voltado para dentro, afim de não pegar pó. A fotocópia foi realizada com a placa com o gel voltado para cima. Para remover o gel da placa foram utilizados 2 litros de NaOH 5 %.

3.2.10 Material vegetal utilizado na análise de dados

A PCR utilizando marcadores microssatélites foi realizada com 20 *primers* e nove cultivares, sendo elas: Frontana, Pampeano, BRS 194, BRS 220, Marfim, Valente, Supera, Itaipu e Quartzo.

Tais cultivares podem ser classificadas como resistentes (R), moderadamente resistentes (MR), suscetíveis (S) e moderadamente suscetíveis (MS) em relação à giberela, como pode ser observado na tabela a seguir.

TABELA 1. Classificação das cultivares de trigo em relação à giberela.

CULTIVAR	RESISTÊNCIA À GIBERELA
Frontana	R
Pampeano	MR
BRS 194	S
BRS 220	MS
Marfim	S
Valente	S
Supera	S
Itaipu	MS
Quartzo	MS

Fonte: ORSEMENTES; SEMENTES FRÓES; BIOTRIGO GENÉTICA; ALVES 2010.

3.2.11 Análise de géis

Os produtos das amplificações por PCR em gel de agarose e acrilamida foram analisados visualmente para a ausência (0) e presença (1) de bandas e foi gerada uma matriz de dados.

A relação genética entre os acessos foi analisada pelo coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979), realizando-se a análise de agrupamento com o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (SNEATH & SOKAL, 1973), e os resultados foram apresentados na forma de dendrograma. O coeficiente de correlação (r) foi calculado com o teste de Mantel (MANTEL, 1967) utilizando 1000 permutações para avaliar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade e os dados de agrupamento. As análises descritas acima foram conduzidas no software NTSYS-PC (ROHLF, 2000).

A matriz de dados e os *primers* utilizados não puderam ser apresentados neste relatório, tendo em vista que são dados obtidos durante um trabalho de mestrado que não foi defendido até a data de entrega deste relatório, o que impossibilitou a apresentação de mais resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A elucidação da relação genética entre as cultivares de trigo com base na combinação do polimorfismo dos *loci* associados à resistência a giberela pode ser visualizada na Figura 8.

O teste de Mantel (r) foi empregado para verificar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade genética e os resultados de agrupamento apresentados no dendrograma, o resultado obtido foi de 0,91, indicando uma ótima correlação. Os *loci* avaliados possibilitaram a discriminação das nove cultivares de trigo, com distância genética variando entre 0,37 a 0,92. Houve a formação de 4 grupos, assim divididos: Grupo 1: Frontana, Quartzo, BRS 220, Itaipu, Marfim e Supera, Grupo 2: Valente, Grupo 3: BRS 194 e Grupo 4: Pampeano.

As cultivares caracterizadas com alguma resistência a giberela (Frontana e Pampeano) apresentaram-se em lados opostos pelos resultados obtidos através do dendrograma. No Grupo 1, exceto Frontana, todas as demais cultivares são caracterizadas como suscetíveis ou moderadamente suscetíveis. As cultivares Marfim e Supera apresentaram-se como as mais similares, sendo ambas suscetíveis à doença; Valente e BRS194 agruparam-se lado a lado com a similaridade genética abaixo de 0,65, no entanto são genótipos caracterizados como suscetíveis; Pampeano foi a cultivar que mais se diferenciou das demais.

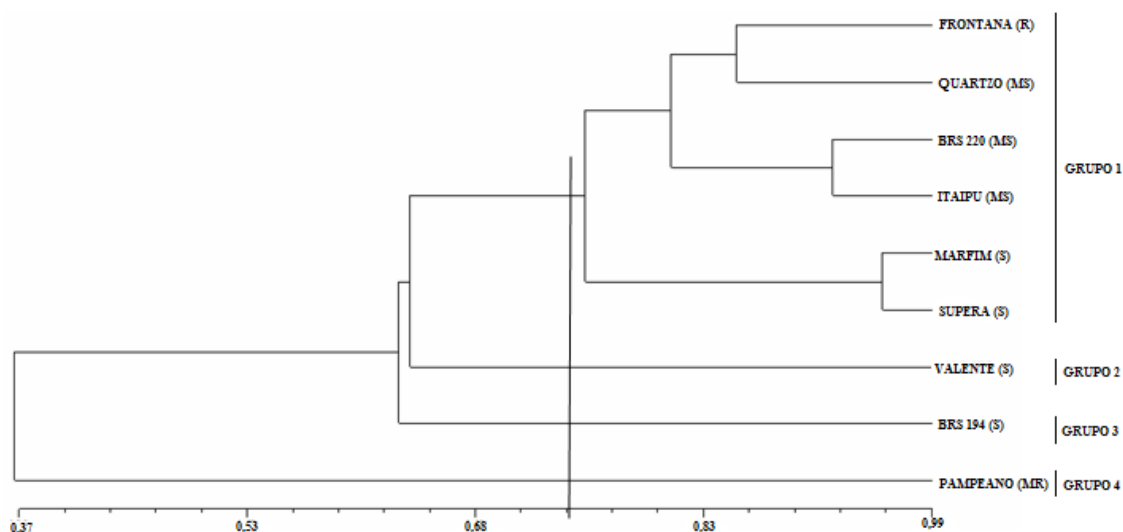


FIGURA 8. Dendrograma gerado pelo método UPGMA entre as 9 cultivares de trigo com diferentes graus de resistência a giberela.

De acordo com Melchinger *et al.*, (1994), na escolha de genitores, o melhorista seleciona plantas de seu interesse e realiza a hibridação esperando que ocorra segregação na progênie. Geralmente, a escolha é fundamentada na diferença entre os pais, pois, quanto maior a distância genética, maior será a segregação, e, portanto, maiores as possibilidades da ocorrência de genótipos superiores com constituições ajustadas ao ambiente. Dessa forma,

através do dendrograma produzido, a cultivar Pampeano seria um bom cruzamento com Marfim e Supera, já que estes apresentam a maior distância genética, podendo assim resultar em genótipos superiores com constituições ajustadas ao ambiente.

Através da análise dos géis de poliacrilamida e agarose (Figura 9), dentre os 20 *primers* testados, 17 (85%) apresentaram-se polimórficos, sendo assim indicados para a avaliação de cultivares de trigo em relação à resistência a giberela.

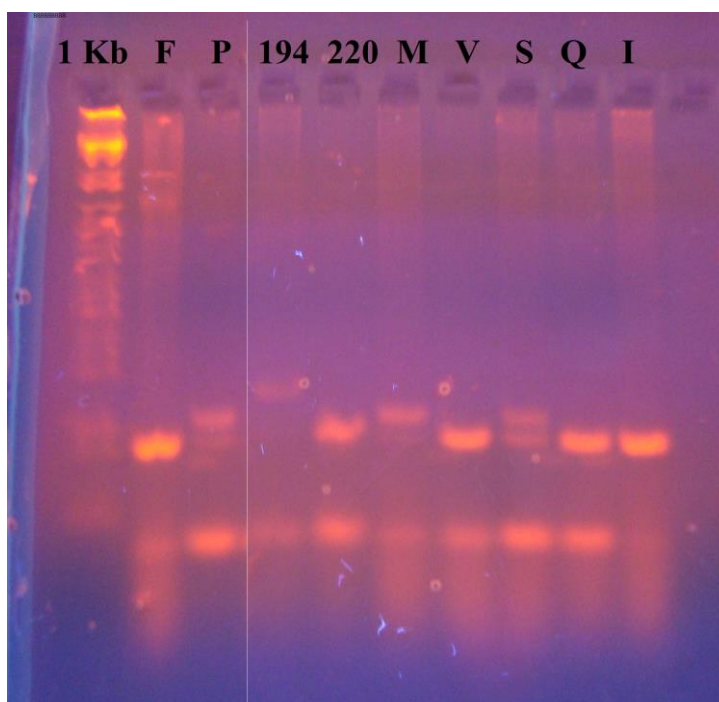


FIGURA 9. Polimorfismo observado em gel de agarose. Ordem de aplicação: 1 Kp Plus DNA Ladder, Frontana, Pampeano, BRS 194, BRS 220, Marfim, Valente, Supera, Quartzo, Itaipu.

5 CONCLUSÕES

O estágio realizado no Centro de Genômica e Fitomelhoramento, pertencente à Universidade Federal de Pelotas, contribuiu muito para minha formação acadêmica e profissional por proporcionar a prática dos conhecimentos adquiridos em sala de aula, aprendizagem de novas técnicas, e aperfeiçoamento de outras já conhecidas, porém pouco praticadas.

De acordo com as análises realizadas pode-se dizer que os marcadores microssatélites empregados são eficientes no estudo da diversidade e existe alta variabilidade genética entre as cultivares de trigo avaliadas, sendo que as hibridações mais promissoras podem ser

conseguidas a partir de cruzamentos dos genitores Pampeano com Marfim e Supera, já que esses apresentam maior distância genética.

A porcentagem de polimorfismo obtida foi de 85%. Os *primers* polimórficos podem ser utilizados para a avaliação de cultivares de trigo em relação à resistência a giberela.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, R.H. **Reação de resistência à giberela em cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), avaliada em condições de campo e casa de vegetação.** 57 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2010.

BIOTRIGO GENÉTICA. **Cultivares** Disponível em:
<<http://www.biotrigo.com.br/cultivares/>>. Acesso em: 14/07/2013.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares.** Viçosa, 2009, 532 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas.** Viçosa, MG: UFV, 2009. 529 p.

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

BRUNETTA, D.; DOTTO, S.R. Trigo no Paraná: visão histórica, situação atual e perspectivas. p.129-135. In: CUNHA, G.R., (Org.). **Trigo no Brasil: rumo ao século XXI.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 194 p.

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

CAIXETA, E. T; OLIVEIRA, A. D. B de; BRITO, G. G. de; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. cap. 1, p. 11-94. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares.** Viçosa, 2009, 532 p.

CARVALHO, A. Z. de. **Transferabilidade de microssatélites de arroz para trigo na busca por marcadores ligados à resistência à fusariose.** 52p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

CASTRO, P.R.C; KLUGE, R.A. (Coord.). **Ecofisiologia de cultivos anuais: trigo, milho, soja, arroz e mandioca.** São Paulo: Nobel, 1999. 126 p.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, maio 2013**. Brasília: Conab, 29 p., 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_09_09_29_16_boletim_graos_mai_2013.pdf>. Acesso em: 08/07/2013.

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

CURTIS, B. C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, H. G. **Bread Wheat Improvement and production**. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations, v.30. 554 p. 2002.

DEL PONTE, E.M.; FERNANDES, J.M.C.; PIEROBOM, C.R.; BERGSTROM, G.C. Giberela do trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, n.6, p. 587-605, 2004.

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

GUARIENTI, E. M. Qualidade do trigo brasileiro: realidade versus necessidade. cap. 4, p. 95-102. In: CUNHA, G.R. da (Ed.) **Oficina sobre Trigo no Brasil**: bases para a construção de uma nova triticultura brasileira. Passo Fundo: Editora Embrapa, 2009. 192p.

KANG, Z.; BUCHENAUER, H. Ultrastructural and cytochemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. **Journal of Phytopathology**, v.148, p. 263-275, 2000.

LAGOS, M.B. **História do melhoramento de trigo no Brasil**. Boletim Técnico n.10. Instituto de Pesquisas Agronômicas. Departamento de Pesquisa. Secretaria da Agricultura. Porto Alegre, RS, 1983.

LIMA, M. I. P. M. **Giberela ou Brusone?** Orientações para a identificação correta dessas enfermidades em trigo e cevada. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 42 p. 2004.

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

LORI, G.A.; SISTERNA, N.; HAIDUKOWSKI, M.; RIZZO, I. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiological Research**, v.158, p. 29-35, 2003.

MANTEL, N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, p. 209-220, 1967.

MARCHIORO, V. S.; FRANCO, F. de A. **Informações técnicas para trigo e triticale – safra 2011**. In: IV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale. Cascavel: COODETEC. Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 2010. 170 p.

MELCHINGER, A.E.; GRANER, A.; SINGH, M.; MESSMER, M.M. Relationships among european barley germplasms: I. Genetic diversity among winter and spring cultivars revealed by RFLPs. **Crop Science**, v.37, p.1191-1199, 1994.

MEZIAT, A.; VIEIRA, R. de C. M. T. Política e desenvolvimento produtivo e sua extensão à cadeia produtiva do trigo. cap. 1, p. 15-27. In: CASTRO, P.R.C; KLUGE, R.A. (Coord.). **Ecofisiologia de cultivos anuais: trigo, milho, soja, arroz e mandioca**. São Paulo: Nobel, 1999. 126 p.

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

MORAES FERNANDES, M.I.B. de. Genética e novas biotecnologias no melhoramento de trigo. Passo Fundo: Embrapa Trigo, **Documentos Online 4.**, 2000. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do04.htm>. Acesso em: 12/07/2013.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science**. Washington, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n. 2, p.294-307, 2006.

OR SEMENTES. **Cultivares**. Disponível em: <http://www.orsementes.com.br/?page_id=35>. Acesso em: 14/07/2013.

PEREYRA, S.A.; DILL-MACKY, R.; SIMS, A.L. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. **Plant Disease**, v.88, p.724-730, 2004.

PIANA, C. F de B.; CARVALHO, F. I. F. de. Trigo: A cultura que deu suporte à civilização. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E.R.T. **Origem e Evolução de Plantas Cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. cap. 36, p. 819-852, 2008.

REIS, E. M. Quantificação de propágulos de *Giberella zeae* no ar através de armadilhas de esporos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 13, n. 4, p. 324-327, 1988.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software, 2000. 98p.

SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E.; SILVA, M. S.; BONOW, S. Melhoramento de trigo no Brasil. cap. 17. p. 427-452. In: PIRES, J. L. F.; VARGAS, L. CUNHA, G. R. da. **Trigo no Brasil**: bases para produção competitiva e sustentável. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2011. 488 p.

SEMENTES FRÓES. **Produtos**. Disponível em:
<<http://www.sementesfroes.com.br/produtos/>>. Acesso em: 14/07/2013.

SILVA, P. R. da. **Identificação de marcadores e caracterização de mecanismos moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo**. 137 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOBRINHO, J. S. e SOUZA, M. A. Origem, descrição botânica e desenvolvimento do trigo. **Informe Agropecuário**, v.97, p.9-13. 1983.

STRANGE, R. N.; SMITH, H. A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. **Physiol. Plant Pathol.**, v.1, p. 141-150, 1971.

SUTTON, J. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.4, p.175-209, 1982.

TAVARES, L. C. V.; BASSOI, M.C.; MIRANDA, L. C.; PRETE, C. E.C. Transferência de tecnologia para cultivares de trigo no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p.21-27, 2011.