

18

Biotecnologia aplicada à cultura do trigo

Sandra Patussi Brammer
 Sandra Maria Mansur Scagliusi
 Ana Lídia Variani Bonato
 Gisele Abigail Montan Torres
 Luciano Consoli
 Antonio Nhani Júnior

Introdução

O sucesso da produção agrícola depende fortemente do uso e geração de novas variedades e cultivares com desempenho superior, bem como do aumento na eficiência de seleção e da maximização dos ganhos genéticos. Novas formas de alcançar estes objetivos podem ser obtidas por meio de tecnologias desenvolvidas pela biotecnologia, uma vez que se baseiam nos processos genéticos, tanto celulares como moleculares. No Brasil e demais países em desenvolvimento, a incorporação da biotecnologia ao melhoramento genético e áreas associadas é a estratégia mais promissora, precisa e rápida, principalmente quando se almeja a redução das perdas na lavoura, decorrentes de inúmeras pragas, doenças e estresses abióticos como seca, salinidade, deficiência nutricional, germinação na espiga e toxicidade de alumínio, aliando-se aos impactos quanto à segurança alimentar e qualidade ambiental.

Por definição, a biotecnologia é a área da ciência que compreende quaisquer processos ou produtos tecnológicos que utili-

zem plantas, animais e micro-organismos ou nelas produzam modificações, em benefício do homem. Esta área da ciência não é recente, pois têm-se registros que em 6.000 a.C. os babilônios e sumérios já fabricavam bebidas e álcool através da fermentação de leveduras, seguidas de inúmeras outras finalidades, como, por exemplo, o crescimento do pão. Contudo, somente na década de 1970 é que surgiu a era da “moderna biotecnologia”, em que se destacam algumas áreas que vêm sendo fortemente empregadas, como a cultura de tecidos, a citogenética clássica e molecular, os marcadores bioquímicos e moleculares, a tecnologia do DNA recombinante e, mais recentemente, a era do sequenciamento do DNA, seguindo-se as eras da genômica, da proteômica, da transcriptômica, da metabolômica, da bioinformática e da nanobiotecnologia, entre outras.

A biotecnologia caracteriza-se pela multidisciplinaridade, pela aplicação em diversos setores produtivos e pelos elevados investimentos nas atividades de pesquisa, associados às aplicações comerciais, bem como de uma gestão tecnológica especializada na definição de estratégias mer-

cadológicas e administrativas corretas. Além disso, a troca de informações através de sistemas automatizados e o emprego de equipamentos analíticos, altamente sofisticados, são medidas fundamentais para o desenvolvimento das diversas tecnologias.

Atualmente, a área de biotecnologia da Embrapa Trigo está consolidada em uma equipe de profissionais que vem atuando de forma integrada com as demais áreas de pesquisa da unidade, bem como com outras instituições de ensino e pesquisa nacionais e internacionais. A biotecnologia visa a contribuir para o conhecimento e o entendimento de como os genes estão organizados nos genomas, com ênfase na cultura do trigo e demais cereais de inverno. Esforços continuados estão centrados na caracterização de germoplasma e no mapeamento, isolamento e caracterização de genes associados a respostas das plantas a estresses (bióticos e abióticos) ou, ainda, à qualidade de uso final dos produtos derivados de cereais. O objetivo geral do trabalho desenvolvido é o de inovação tecnológica, com intensa base científica, e a disponibilidade de acervos genéticos adequados e organizados para uso imediato, de médio e longo prazos. Assim sendo, destacam-se a seguir, as principais linhas de pesquisa em biotecnologia na Embrapa Trigo.

Citogenética clássica e molecular

A citologia é uma das áreas da biologia celular mais antigas. As primeiras atividades envolvendo estudos citológicos datam de 1591-1608, quando foi desenvolvido o primeiro microscópio, oferecendo um aumento de apenas 10 vezes. Contudo, centenas de anos posteriores de pesquisa foram necessários para o conhecimento exato dos mecanismos celulares e a compreensão da

hereditariedade, cujas descobertas de Mendel impulsionaram a fusão da citologia e da genética, consistindo, então, na citogenética propriamente dita.

Na área vegetal, a citogenética vem apresentando um grande avanço desde a década de 1930 e, no caso do trigo, vem fornecendo uma contribuição valiosa ao melhoramento varietal (MORAES-FERNANDES, 1982). Além disso, a citogenética impulsionou as demais áreas da biotecnologia, associando-se a estas como valiosa ferramenta para as pesquisas científicas, tanto básicas como aplicadas. Na Embrapa Trigo, a área de citogenética foi iniciada na década de 1970, destacando-se, em sequência, as principais linhas desenvolvidas: a) polimorfismo de grãos de pólen, em cultivares de *Triticum aestivum*, em resposta a estresses bióticos e abióticos; b) comportamento meiótico e viabilidade polínica em *T. aestivum*, submetido a defensivos, doenças e insetos-praga; c) análise meiótica em cultivares de *T. aestivum*, em relação a condições ambientais e experimentais de temperatura; d) índices meióticos em genótipos de trigos brasileiros; e) estudos comparativos entre comportamento citológico, fatores ambientais e componentes da produção em trigo; f) estudos de cromossomos somáticos em *T. aestivum*; g) volume nucleolar de genótipos brasileiros de trigo e de acessos de *Aegilops tauschii*; h) determinação do nível de ploidia, pareamento cromossômico e viabilidade polínica entre híbridos interespecíficos e intergenéricos de *T. aestivum* e espécies afins; i) análise fisiológica e citológica de germoplasma de *T. aestivum* armazenados em médio e longo prazo; e j) caracterização de genótipos, linhagens e cultivares de trigo e espécies afins, por meio de hibridização *in situ* – técnicas conhecidas como FISH e GISH (PEDROSA-HARAND; GUERRA, 2004).

Citogenética clássica

A citogenética clássica desenvolveu-se, principalmente, a partir do início do século 20 e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia. É a ciência que estuda os constituintes celulares portadores da informação genética, ou seja, os cromossomos. Compreende qualquer estudo relativo ao cromossomo, em suas diferentes formas, tanto no que diz respeito à morfologia, organização, função e replicação quanto no tocante a sua variação e evolução (SACCHET, 1999).

A análise cromossômica sempre foi um dos campos estimulantes da citologia e da genética, tendo relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma. Apesar da revolução provocada pela genética molecular, a análise cromossômica permite observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diferentes formas (GUERRA, 1988). Atualmente, estudos celulares têm produzido verdadeiras revoluções nas tecnologias e no conhecimento biológico. O progresso na identificação positiva dos cromossomos originou-se de uma rápida série de estudos que iniciaram em meados da década de 1960. A base desta mudança foi o fato de que muitos corantes, que têm uma afinidade pelo DNA, fluorescem sob a luz ultravioleta. Após tratamento adequado com esses corantes, cada cromossomo mostra zonas brilhantes e escuras, ou bandas, que são específicas em tamanho e localização para este cromossomo.

Peñaloza e Pozzobon (2007), em revisão sobre o assunto, abordam algumas

importantes contribuições da citogenética vegetal, das quais pode-se citar: a) auxilia na caracterização molecular de genótipos, por meio da localização de sequências específicas de DNA; b) permite a avaliação de plantas regeneradas *in vitro* e de plantas geneticamente transformadas; c) possibilita estudos sobre instabilidades cromossômicas em material conservado, além da identificação de possíveis modificações no número e estrutura dos cromossomos; e d) fornece apoio em trabalhos de pré-melhoramento e de melhoramento genético, através de análises em híbridos interespecíficos que utilizaram parentais silvestres.

Citogenética de trigo e espécies afins

Em virtude de possuir constituição cromossômica complexa, o trigo tem uma peculiaridade especial: nas suas células, coexistem os genomas de três espécies primitivas diferentes, resultantes das hibridizações naturais, que lhe confere excelente capacidade de adaptação às mais variadas condições ecológicas. Assim sendo, o conhecimento dos padrões de herança, bem como a localização dos caracteres nos cromossomos, têm permitido ao melhoramento genético avanços na incorporação de genes de importância econômica entre os genótipos promissores.

As espécies conhecidas de trigo formam uma série poliploide, e suas relações dentro da tribo Triticeae foram extensivamente estudadas por meio da análise de genomas. A subtribo Triticinae é formada pelos gêneros *Triticum*, *Aegilops*, *Agropyron*, *Secale* e *Haynaldia*, os quais apresentam origem relativamente recente. A hibridação entre esses gêneros é possível, permitindo que ocorra a introgressão gênica. Consequentemente, constituem valiosos recur-

so genéticos para a prospecção de genes, e posterior uso no melhoramento do trigo cultivado. As relações entre tais espécies são estudadas pela análise dos respectivos genomas (MORAES-FERNANDES et al., 2000).

Gupta et al. (2008) publicaram uma extensa revisão sobre trigo, considerando a sua origem e a relação com as demais espécies de Triticeae. Destacam-se trigos diploides, *Triticum monococcum* L. ($2n=2x=14$, AA), tetraploides, *T. turgidum* L. ($2n=4x=28$, AABB) e hexaploides, *T. aestivum* L. em Thell ($2n=6x=42$ AABBDD). No caso desta última, a combinação dos três genomas, oriundos das três espécies diploides distintas mas relacionadas geneticamente, permite que se intercrizem e que gerem híbridos férteis, embora, em alguns casos, haja a necessidade de procedimentos especiais como o resgate de embriões imaturos e o uso da cultura de tecidos. Contudo, se por um lado, o trigo é uma das espécies de cereais com maior genoma e com grande complexidade genética, por outro é possível explorar recursos citogenéticos, através do uso de modernas ferramentas biotecnológicas, como a citogenética molecular, associadas à citogenética clássica e à engenharia cromossômica.

Moraes-Fernandes et al. (2000) enfatizam que o conhecimento das relações citotaxonomias, estrutura citogenética e história evolutiva das espécies envolvidas nos cruzamentos também são importantes para a escolha da espécie doadora. A obtenção de cultivares de trigo com características agrônomicas desejáveis, através de cruzamentos, pode ser mais rápida e eficiente com a combinação do uso de técnicas citogenéticas e seleção agrônômica, pois permitem ao melhorista, conjuntamente com o citoge-

neticista, analisar, mediante testes de progênes, a influência do genótipo quanto à ocorrência de anormalidades cromossômicas, bem como anomalias na estrutura dos grãos de pólen, principalmente quando se apresentam vazios (Figura 1). Essas anormalidades afetam a fertilidade, são responsáveis pela ocorrência de progênes desuniformes nos cruzamentos e prejudicam a adaptação de cultivares.

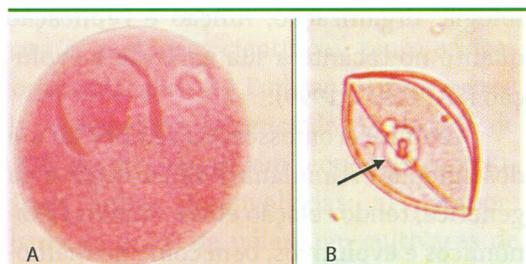


Foto: Sandra Patussi Brammer

Figura 1. Grãos de pólen de trigo normal (A) e vazio (B), evidenciando apenas a presença do poro (seta). Aumento de 1000 X.

Conforme relatado por Angra (1995), em um processo normal de polinização, o grão de pólen adere ao estigma e, após sua hidratação, a atividade metabólica inicia com a germinação do tubo polínico. No caso de genitores totalmente incompatíveis, a reação da calose na superfície do estigma e a formação de tubos polínicos distorcidos revelam a ocorrência de uma barreira pré-zigótica. Portanto, a escolha certa dos genitores é, sem dúvida, um dos fatores determinantes para o sucesso dos cruzamentos.

Além do mencionado, a introgressão de genes pode ser incrementada por procedimentos eficientes para a detecção de cromossomos ou segmentos cromossômicos (JIANG et al., 1994), na caracterização de diferentes acessos de uma mesma espécie, na identificação de linhas de adição e de subs-

tuição (FRIEBE et al., 1993) e na detecção de alterações estruturais, como deleções, inversões e translocações (GILL et al., 1991), pois o estado híbrido de uma planta pode ser determinado pelo número somático de cromossomos e pelo comportamento meiótico (SHARMA; GILL, 1983; SETHI, 1989). As técnicas de bandeamento cromossômico “expandiram” os horizontes da citogenética, e a primeira aplicação do bandeamento deu-se no pareamento cromossômico. Essas técnicas têm possibilitado compreender melhor as alterações cromossômicas que se estabelecem em cada genótipo (GUERRA, 1988).

Citogenética molecular

Na citogenética molecular, a análise cromossômica tem sido de grande importância para o entendimento da evolução, genética e estabilidade cariotípica dos materiais estudados. Por muito tempo, a caracterização cromossômica foi baseada, especialmente, em parâmetros morfológicos, como o tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias. Com a implantação de técnicas de bandeamento, que permitem a visualização de blocos de coloração diferenciada (bandas), a caracterização cromossômica foi melhorada significativamente (BRASILEIRO-VIDAL; GUERRA, 2002).

Os marcadores citogenéticos, como os marcadores de DNA, têm sua expressão independente das variações ambientais ou da ativação gênica, tornando-os caracteres muito confiáveis. Atualmente, grande ênfase está sendo dada para a técnica de Hibridização *In Situ* (HIS) ou *In Situ Hybridization* (ISH), sendo que seu desenvolvimento marcou a transição da era da citogenética clássica para a era da citogenética molecular.

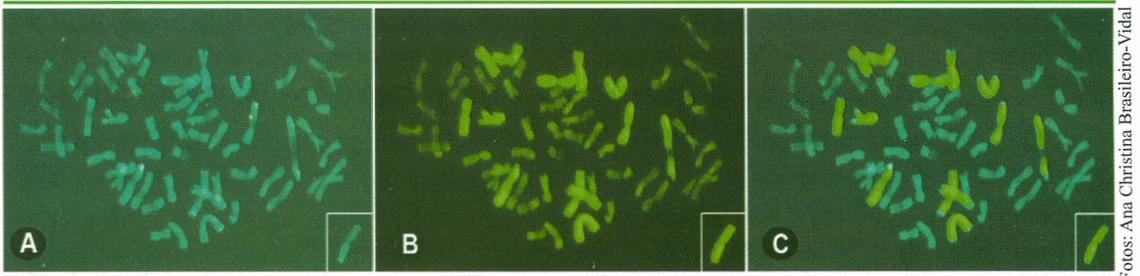
Esse método, descrito por Pardue e Gall (1969), permite a detecção de sequências de DNA em cromossomos mitóticos ou meióticos, em núcleos interfásicos e em fibras de cromatina estendidas. A técnica proporciona a interação entre conhecimento da biologia celular, citogenética clássica e genética molecular (ROGATTO; RAINHO, 2000) e consiste, basicamente, no pareamento, ou hibridização, de um determinado fragmento de DNA, RNA ou RNA complementar, situado dentro da célula do organismo que está sendo estudado. O objetivo é verificar se a célula ou tecido possui essa sequência de nucleotídeos e, em alguns casos, conhecer também a sua exata localização na célula ou no cromossomo. A técnica baseia-se no fato do DNA ser formado por duas fitas complementares, as quais podem ser facilmente desnaturadas e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Se, no momento da renaturação das fitas de DNA houver fragmentos de DNA marcados (sonda) disponíveis, os mesmos hibridizarão na região de homologia dentro da célula, permitindo a sua localização precisa. Com a utilização dos fluorocromos, a técnica de HIS começou a ser chamada também por FISH - *Fluorescent In Situ Hybridization* (MORAES, 2007). A detecção dessas sequências de DNA tem originado grandes avanços na citogenética de trigo, cujas pesquisas estão focadas no mapeamento físico, na investigação detalhada da estrutura cromossômica, no acompanhamento da quantidade de cromatina introgridida em cruzamentos interespecíficos, e na análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas. No trigo hexaploide (AABBDD), os três genomas podem ser distinguidos, simultaneamente, com o uso de sondas genômicas oriundas de suas espécies ance-

trais, além de sondas de oligonucleotídeos específicos detectados por FISH (CARDOSO, 2007). Ressalta-se que os avanços nessa área vêm permitindo maior disponibilidade de sondas e de diferentes protocolos, facilitando as análises e ampliando o seu uso nas investigações de regiões genômicas de interesse, em escala de uma única célula (FRIEBE et al., 1992; ROGATTO; RAINHO, 2000). Além do mencionado, as bibliotecas de DNA genômico representam uma importante fonte de sequências para o mapeamento físico, análise estrutural do genoma, genômica comparativa e sequenciamento do genoma, além de ser uma fonte de sequências únicas para o mapeamento cromossômico (HASTEROK et al., 2006). Porém, quando se objetiva a detecção e a integração em mapas genéticos de sequências de pequeno tamanho, como os marcadores moleculares e os genes de cópia única, um fator que interfere na visualização dos sinais é o nível de condensação dos cromossomos mitóticos, que impede uma melhor resolução das sequências separadas a menos de 1 Mb (mega pares de base). Uma alternativa para aumentar o nível de resolução é o uso de cromossomos meióticos na fase de paquíteno, pois estes apresentam-se de sete a 40 vezes mais estendidos que os cromossomos mitóticos. Outro procedimento auxiliar no mapeamento por FISH é a técnica de “fibras estendidas”, que permite uma resolução acima de 0,7 kb (quilo pares de base). Nesta técnica, o núcleo interfásico é lisado e as fibras de DNA do núcleo são espalhadas na superfície da lâmina, sendo que a hibridização *in situ* é feita nessas fibras (BRASILEIRO-VIDAL; GUERRA, 2002; MUKAI, 2005).

A HIS pode também utilizar como sonda o DNA genômico total de uma espécie,

proporcionando a marcação de todos os seus cromossomos. Esse tipo de hibridização é denominado de GISH - *Genomic In Situ Hybridization*. Neste caso, pode-se distinguir os cromossomos oriundos de diferentes parentais em híbridos interespecíficos ou em espécies aloploiploides, bem como em estudos de similaridade genômica (BRASILEIRO-VIDAL; GUERRA, 2002). Considerando-se especificamente os cruzamentos interespecíficos e/ou intergenéricos, que visam introgressões de genes de resistência a doenças, a técnica de GISH está sendo amplamente empregada, uma vez que utiliza como sonda o DNA genômico total de uma espécie, proporcionando a distinção dos cromossomos oriundos dos diferentes parentais, nos híbridos interespecíficos ou em espécies aloploiploides, bem como em estudos de similaridade genômica (MUKAI, 2005). Exemplos desta aplicação prática podem ser verificados para as espécies *Thinopyrum intermedium* e *Th. ponticum*, as quais têm sido extensivamente hibridizadas com *T. aestivum*, visando a introgressão de genes agronomicamente importantes, principalmente genes que conferem resistência à ferrugem da folha (CHEN et al., 1998; FEDAK et al., 2000; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2003; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2005).

Outro exemplo bem característico desta metodologia pode ser visualizado na Figura 2, a qual apresenta uma célula de triticales hexaploide ($2n = 42$) apresentando 14 cromossomos oriundos de centeio (*Secale cereale*) e 28 cromossomos do trigo (*T. durum*). Essa célula foi hibridizada com DNA bloqueio de trigo e com sonda de centeio marcada com digoxigenina e detectada com o fluorocromo fluoresceína (FITC). Seus cromossomos foram contracolorados com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol).



Fotos: Ana Christina Brasileiro-Vidal

Figura 2. Hibridização genômica *in situ* em célula de triticale hexaplóide ($2n = 42$), usando DNA de centeio como sonda (verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) (azul). A mesma célula está representada em A (DAPI), B (FITC - isotiocianato de fluoresceína) e C (sobreposição das imagens A e B). O detalhe em A, B e C mostra o décimo quarto cromossomo de centeio da referida célula. Aumento de 1.000x.

Cultura de tecidos: desenvolvimento de plantas duplo-haploides

Dentro das mais diversas aplicações das técnicas de cultura de tecidos, a produção de plantas haploides (haploidização) vem se destacando como uma das mais importantes ferramentas no estabelecimento de programas de melhoramento genético, mostrando-se também bastante eficiente nos estudos básicos e aplicados da genética vegetal (SANTOS; ZANETTINI, 2002; JAUHAR et al., 2009).

— Vários métodos já foram descritos como exemplos para obtenção de plantas haploides, sendo a hibridização interespecífica ou intergenérica (gimnogênese) e a androgênese (via cultura de anteras ou micrósporos purificados) os mais usados em cereais (PALMER; KELLER, 2005).

A obtenção de linhagens homocigotas puras, tão necessárias para estudos genéticos e para geração de novas cultivares alcançadas pelo processo de haploidização, faz deste método uma interessante ferramenta para o melhoramento genético vegetal (SANTOS; ZANETTINI, 2002). Comparando as técnicas de obtenção de plantas duplo-haploides (para dar origem às linhagens homocigotas) com as técnicas convencionais

adotadas nos programas de melhoramento, verificamos, nesta última, uma certa limitação na identificação de variabilidade genética de gerações com alta segregação, havendo a necessidade de trabalhar-se com um grande número de plantas (MORAES-FERNANDES et al., 2002; JAUHAR et al., 2009). No sistema convencional de melhoramento de plantas autógamas, o processo usado para fixação de genes (obtenção da homocigose) é bastante lento, sendo necessários de sete a oito ciclos de autofecundação para a obtenção de linhagens puras. A técnica de haploidização pode acelerar este processo, permitindo a obtenção de plantas completamente homocigotas em uma única geração, diminuindo o tempo necessário na obtenção das linhagens, assim como os custos de mão de obra e de produção (MORAES-FERNANDES et al., 2002; BRAMMER et al., 2004; JAUHAR et al., 2009).

O processo de obtenção de plantas haploides via gimnogênese compreende as etapas de resgate e manutenção de embriões imaturos *in vitro*, obtidos por meio da polinização (artificial) com espécies distantemente relacionadas. O método “bulbosum” foi, no passado, o mais largamente utiliza-

do (KASHA; KAO, 1970). Este método consiste no uso do pólen de *Hordeum bulbosum* L. para polinização da espécie cultivada de cevada (*Hordeum vulgare* L.). Atualmente, o pólen mais usado como doador para produção de haploides em cereais (em trigo, principalmente) é o de milho (*Zea mays* L.), sendo a primeira descrição feita por Laurie e Bennett (1986).

A cultura de anteras, por meio do processo da androgênese, também tem sido largamente empregada para a obtenção de plantas haploides em cereais. A androgênese é o processo definido como uma rota de desenvolvimento alternativa à embriogênese zigótica, onde um grão de pólen ou micrósporo (célula gamética masculina jovem) consegue modificar sua rota de desenvolvimento, de gametofítica para esporofítica, dando origem à um esporófito haploide, sem que haja a fertilização (SANTOS; ZANETTINI, 2002). Considerando especificamente esta técnica, destacam-se o desenvolvimento e lançamento da cultivar de Trigo BR 43 pela Embrapa Trigo, fato este que representou um diferencial tecnológico para a Embrapa, uma vez que esta cultivar foi a primeira do Brasil e a quarta no mundo a ser desenvolvida via haploidização (MORAES-FERNANDES et al., 2002).

De uma maneira geral, as plantas obtidas via androgênese (originadas de um grão de pólen jovem) são haploides e possuem somente a metade do seu genoma, sendo consequentemente estéreis (SANTOS; ZANETTINI, 2002). Neste caso, a duplicação de seu lote cromossômico faz-se necessária, podendo ser de forma espontânea ou induzida pela aplicação de agentes antimitóticos, recuperando a condição diploide e restaurando sua fertilidade (SANTOS; ZANETTINI, 2002). Após duplicação dos cromossomos, a planta assim originada, chamada de du-

plo-haploide, será totalmente homozigota, uma vez que cada cromossomo foi fielmente duplicado (MORAES-FERNANDES et al., 2002).

A potencialidade da androgênese e gimnogênese

Tanto o cultivo *in vitro* de embriões imaturos, resultantes da hibridização com pólen de milho, como a cultura de anteras tornaram-se métodos largamente adotados para formação de populações homozigotas e deixaram de ser apenas uma ferramenta alternativa dentro dos programas de melhoramento genético vegetal. Entretanto, algumas vantagens de cada técnica são determinantes para a adoção de cada uma delas. A cultura de anteras tem o potencial de produzir mais de uma centena de plantas originadas de uma única antera, sendo que o método via gimnogênese é limitado a uma planta por espiguetta (KRUCZKOWSKA et al., 2002; LIU et al., 2002). Por outro lado, a capacidade de regeneração através do cultivo *in vitro* de anteras é uma característica genótipo-dependente, restringindo seu uso a um grupo limitado de germoplasma responsivo a esta técnica (HU et al., 1995; CHAUDHARY et al., 2003; KIM; BAEZINGER, 2005). Por esta razão, com o objetivo de ampliar a variabilidade genética disponível ao melhorista nos programas de melhoramento genético vegetal, a cultura de anteras em trigo foi aos poucos sendo substituída pelo cultivo de embriões imaturos. Este embrião imaturo é obtido da polinização de ovários das plantas de trigo com pólenes de outras espécies (cruzamentos interespecíficos) ou de outros gêneros (intergenéricos), ocorrendo a eliminação dos cromossomos da espécie doadora do pólen. O embrião formado, resultante desta fecundação artificial, é resgatado *in vitro*, dando origem a uma planta haploide,

que posteriormente terá seus cromossomos duplicados (TORRES et al., 1999; BRAMMER; IORCZESKI, 2002). Cabe ressaltar aqui que a Embrapa Trigo é destaque na obtenção de linhas duplo-haploides de trigo por estes métodos, sendo que, desde o início da implementação desta técnica, já foram obtidas aproximadamente mais de trinta mil linhas homocigotas. Além da cultivar de BR 43, obtida via androgênese, destacam-se também outras duas cultivares de trigo já lançadas pela Embrapa, BRS Canela, BRS 254 e BRS Tangará, obtidas via gimnogenese (ALBRECHT et al., 2008; SÓ E SILVA et al., 2008).

Apesar da existência de protocolos bem estabelecidos, as duas técnicas previamente mencionadas (cultura de anteras e resgate de embriões imaturos) apresentam fortes limitações, sendo o baixo número de plantas regeneradas e o grande número de plantas albinas (Figura 3) algumas delas, fazendo com que o potencial quantitativo de regeneração de plantas verdes por espiga não seja totalmente alcançado. Por essa razão, métodos mais eficientes de obtenção de plantas haploides vêm sendo pesquisados, e a cultura de micrósporos isolados vem, aos poucos substituindo os demais métodos de haploidização.

Cultivo *in vitro* de micrósporos isolados

Mais recentemente, os métodos de obtenção de plantas haploides, via cultivo de anteras e via gimnogenese, vêm sendo substituídos, em diversos laboratórios, pela cultura de micrósporos isolados (*Isolated Microspore Culture*), oferecendo um maior número de plantas verdes regeneradas e espontaneamente duplicadas. O crescente número de trabalhos publicados com esta metodologia demonstra a importância e a eficiência desta técnica na produção de plantas duplo-haploides (HU; KASHA, 1997; LIU et al., 2002; PATEL et al., 2004; RODRIGUES et al., 2004; CISTUÉ et al., 2009).

Os processos de obtenção de plantas haploides, via cultura de anteras ou pela cultura de micrósporos isolados, possuem um denominador comum, o micrósporo uninucleado jovem. No entanto, algumas peculiaridades da segunda técnica fazem dela o seu diferencial. No cultivo de anteras, os micrósporos são estabelecidos *in vitro*, e envolvidos por camadas de células dos diferentes tecidos que formam as anteras (tapete, endotécio, epiderme). Estes tecidos apresentam pouca capacidade totipotente. No entanto, mesmo não se proliferan-

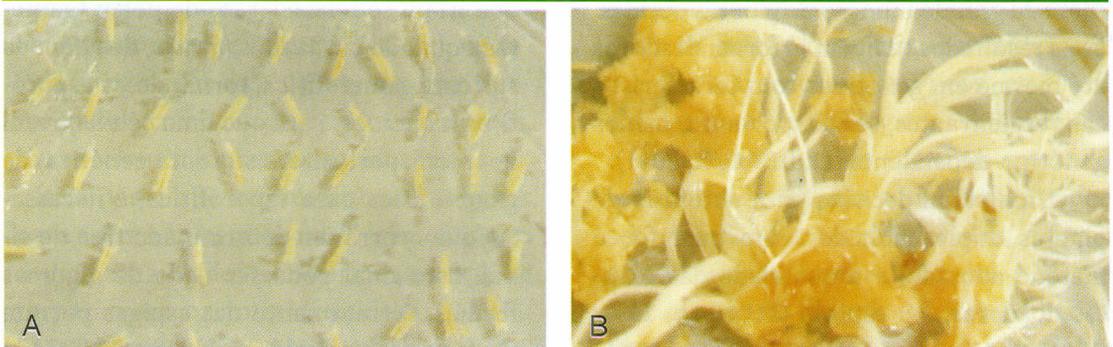


Figura 3. Limitações da técnica de cultura de anteras: A) anteras plaqueadas em meio de cultura específico, porém não responsivas. B) anteras responsivas, porém com formação de um grande número de plantas albinas.

do *in vitro*, os tecidos das anteras poderiam ter um efeito inibitório ou seletivo sobre a embriogênese dos micrósporos, dificultando ou impedindo a regeneração destes (RODRIGUES et al., 2004). Além disso, na cultura de micrósporos isolados os tratamentos são aplicados diretamente sobre as células-alvo de cultivo (os próprios micrósporos), diferindo da cultura de anteras, onde a presença dos tecidos pode retardar ou neutralizar os efeitos dos tratamentos. Assim, a composição dos diferentes meios de cultura e seus efeitos propiciam uma resposta muito mais imediata (HOLME et al., 1999; RODRIGUES et al., 2004).

A preferência pelo método do cultivo de micrósporos isolados para obtenção de plantas duplo-haploides está principalmente associada ao maior número de embriões obtidos e pela maior frequência de plantas verdes regeneradas, tendo, como exemplos, rendimentos de até 5.500 plantas verdes por espiga (RITALA et al., 2001; LIU et al., 2002; LABBANI et al., 2007). Uma elevada taxa de duplicação espontânea dos cromossomos também é uma característica positiva observada na cultura de micrósporos isolados, sendo que, em alguns casos, foi observada a ocorrência de até 80% de plantas espontaneamente diploides (ZIAUDDIN et al., 1992; LIU et al., 2002). Além do grande número de plantas obtidas, bons resultados também já foram descritos até mesmo em genótipos com características recalcitrantes, sendo, portanto, menos genótipo-dependente (LI; DEVAUX, 2001).

Uma etapa decisiva para obtenção de plantas duplo-haploides, seja qual for o método adotado, é a qualidade das plantas doadoras das espigas (LU et al., 1991; ORSHINSKY; SADASIVAIAH, 1997; ZHENG, 2003; CISTUÉ et al., 2009). Por isso, especial atenção deve ser dada às condições

ambientais nas quais as plantas doadoras desenvolvem-se, podendo afetar o número total de micrósporos que entrarão em divisão celular e que poderão regenerar uma nova planta. Assim, o número de micrósporos com capacidade de se dividir e seguir a rota embriogênica pode variar dentro de um mesmo genótipo, graças às condições ambientais em que as plantas doadoras foram desenvolvidas. Desta forma, o desenvolvimento das plantas doadoras deverá ser feito em condições controladas, sendo a temperatura, intensidade luminosa e qualidade de luz, fotoperíodo, sanidade das plantas e nutrientes do solo, fatores imprescindíveis ao desenvolvimento das plantas. A fim de se estabelecer um sistema de cultura com reprodutibilidade, as plantas doadoras devem ser desenvolvidas em casas de vegetação ou em câmaras de crescimento, onde serão mantidas livres de doenças, pragas e outros estresses ambientais (JÄHNE; LÖRZ, 1995; CISTUÉ et al., 2009).

Como relatado anteriormente, o fenômeno da androgênese preconiza a conversão de determinadas células vegetais em embriões (e posteriormente em plantas), e depende de circunstâncias extraordinárias que irão agir diretamente sobre estas células ou tecidos. Como um mecanismo de sobrevivência estratégico, micrósporos que iriam se tornar grãos de pólen (gametas), quando cultivados *in vitro*, desviam da sua rota gametofítica, tornando-se esporófitos haploides. Para que uma célula jovem de micrósporo altere sua rota genética, de gametofítica para esporofítica, é necessário que ocorra um determinado tipo de sinal. Este sinal pode ser dado de algumas formas. O tratamento das espigas por um período de frio (*cold shock*) tem sido usado em diferentes espécies vegetais para indução da androgênese (SHARIATPANAHÍ et

al., 2006) e tem, como principal objetivo, desviar a rota gametofítica dos micrósporos (JÄHNE; LÖRZ, 1995). Em alguns casos, foi demonstrado que a duração adequada do tratamento de frio é genótipo-dependente, e seu prolongamento pode levar a um maior aumento na formação de plantas albinas (JÄHNE; LÖRZ, 1995). Outros métodos podem ser usados, alternativamente, para o pré-tratamento das espigas, como o uso de manitol, manitol e frio, temperaturas altas (*heat shock*) e até colchicina. Etanol, ácido abscísico, choque hipertônico e pressão atmosférica reduzida também já foram descritos, sendo mais usados em genótipos recalcitrantes (SHARIATPANAHI et al., 2006). Os métodos de pré-tratamento de choque pelo frio e pelo manitol são os mais utilizados com sucesso, na cultura de micrósporos isolados de trigo e de cevada (KASHA et al., 2001; LI; DEVAUX, 2005; OLESZCZUK et al., 2006; LABBANI et al., 2007) e, com raras exceções, o ácido hidroxinicotínico (LIU et al., 2002).

Além de sua notável e consagrada aplicação no melhoramento genético vegetal, acelerando a formação de populações homocigotas para os mais variados fins (ZHANG et al., 2008), a cultura de micrósporos isolados também vem sendo usada como uma ferramenta atrativa no desenvolvimento e nos estudos de organismos geneticamente modificados (OGMs). Os tecidos originados das culturas de micrósporos, assim como os próprios micrósporos, são excelentes fontes na transformação genética, visto que a transferência de genes para estas células ou tecidos vai dar origem a plantas haploides transformadas, e que se tornarão homocigotas diploides (FOLLING; OLESEN, 2001). Com a otimização do método, a seleção de características agrônomicas desejáveis pode ser feita *in vitro*, tornando

possível acelerar ainda mais o processo de obtenção de um novo genótipo. Além disso, esses avanços científicos podem ter um impacto significativo no processo de obtenção de novas cultivares, contribuindo e simplificando a evolução dos programas de melhoramento genético vegetal.

Atualmente, o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo vem atuando de forma a otimizar o cultivo *in vitro* de micrósporos isolados de trigo e cevada, para uso posterior junto aos programas de melhoramento genético destas culturas. As principais etapas desta técnica estão ilustradas na Figura 4 e envolvem a coleta e assepsia das espigas, pré-tratamento, extração e purificação dos micrósporos, cultivo das células e estruturas embrionárias nos meios de cultura específicos, e transferências das plantas obtidas para vermiculita.

Marcadores genéticos

Marcadores genéticos são marcas que evidenciam diferenças entre indivíduos, que sejam reproduzidas nas progênes e que possam ser utilizadas para correlacionar com outras características de interesse. A aplicação desses marcadores pode ser para estudos básicos de genética, para estimar a diversidade genética ou para seleção assistida das plantas melhoradas por meio de seleção indireta, entre outras inúmeras utilizações.

Os marcadores genéticos estão divididos em morfológicos, bioquímicos e moleculares ou de DNA. Os marcadores morfológicos são aqueles que podem ser visualizados ou mensurados, e foram os primeiros a serem utilizados pelo melhoramento de plantas. No caso do trigo, alguns exemplos são: a altura da planta, presença de arista e cor do grão. Os marcadores bioquímicos incluem variantes

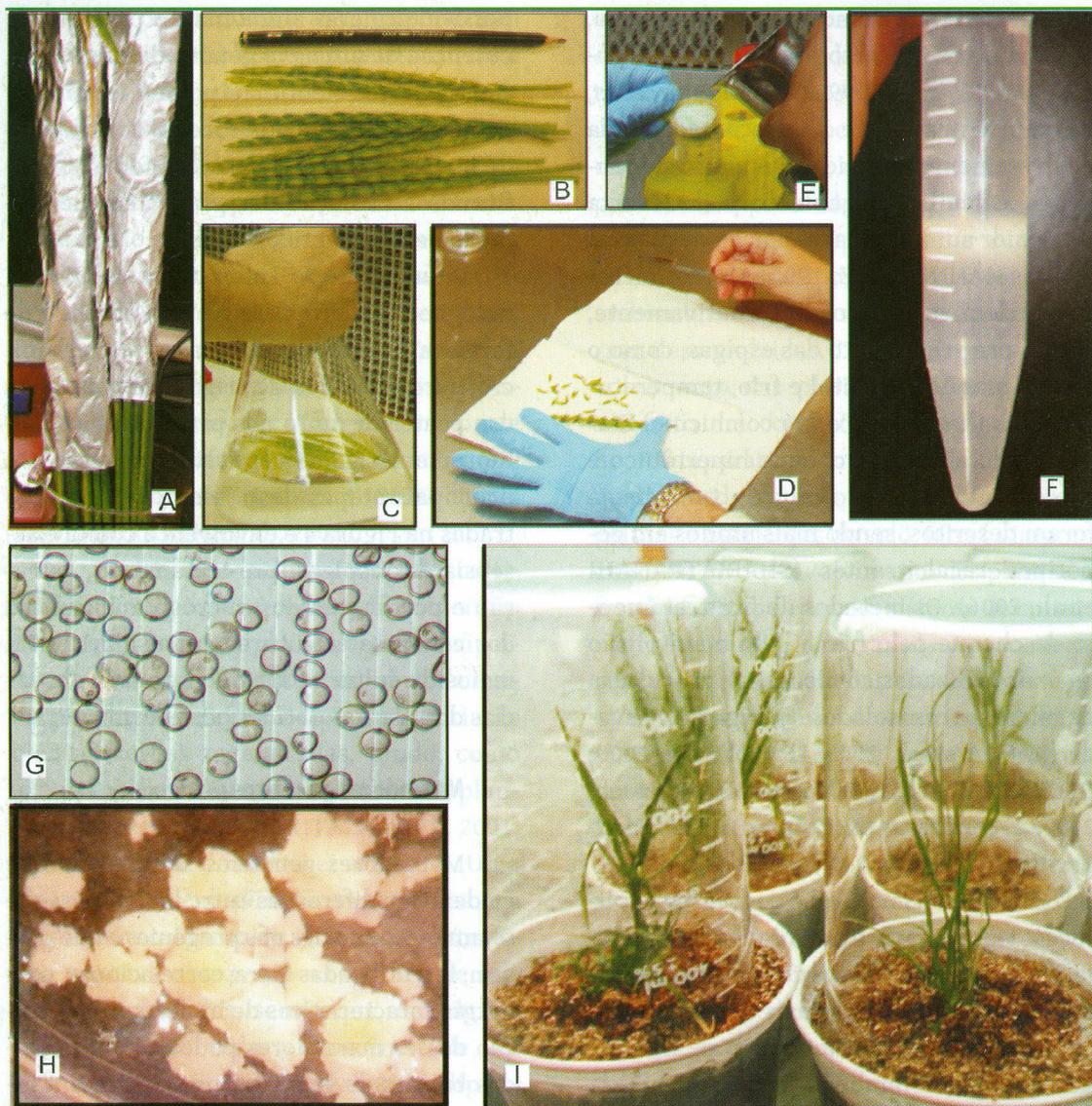


Figura 4. Diferentes etapas da técnica de cultura de micrósporos isolados: A) pré-tratamento das espigas, B) remoção das folhas e aristas, C) assepsia, D) retirada das glumas externas de cada espigueta, E) extração e filtragem dos micrósporos, F) formação de banda após centrifugação, contendo micrósporos uninucleados, G) solução de micrósporos purificados, H) desenvolvimento das estruturas embrionárias, e I) plantas verdes transferidas para vermiculita.

alélicas de enzimas, as isoenzimas. Também podem ser obtidos por análises eletroforéticas de proteínas, como as gluteninas, em trigo. A utilização desses dois tipos de marcadores é muito útil para a pré-seleção, mas é limitada pelo número, pela influência de fatores ambientais ou

pelo estágio de desenvolvimento da planta (WINTER; KAHL, 1995).

Dentre as inúmeras técnicas biotecnológicas, os marcadores moleculares são ferramentas modernas que contribuem para o melhoramento de plantas. Eles diferenciam os indivíduos em nível do DNA e,

como vantagem, não apresentam as limitações citadas anteriormente para os marcadores morfológicos e bioquímicos. Eles surgiram nas décadas de 1980 e 1990, sendo que, a partir de então, inúmeros tipos foram e estão sendo desenvolvidos.

Principais marcadores moleculares

A primeira geração de DNA refere-se àqueles comumente utilizados em análises genéticas, mas que, na grande maioria, não envolviam a expressão de genes e etapas de sequenciamento automatizado. O primeiro marcador desenvolvido foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTSTEIN et al., 1980), em que apresenta polimorfismo do DNA, ou seja, diferencia o DNA dos indivíduos entre si através da digestão por enzimas de restrição, separação dos fragmentos gerados via eletroforese, transferência destes para uma membrana de nylon e hibridização com uma sonda marcada, radioativa ou não. A visualização de tais marcas de tamanhos diferentes, após exposição e revelação em filmes específicos, demonstra a diversidade genética para o loco analisado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Após o desenvolvimento dos RFLPs, surgiram os marcadores baseados na técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) refere-se à amplificação de fragmentos não específicos, onde os produtos da PCR são produzidos em regiões ao acaso no genoma, flanqueadas por dois sítios complementares a oligonucleotídeos iniciadores (WILLIAMS et al., 1990). Os polimorfismos são detectados pela presença ou ausência de fragmento amplificado em um dos indivíduos em relação ao outro. Em 1995, Vos e colaboradores desenvolveram

um marcador considerando as vantagens tanto de RFLP como do RAPD. Este marcador, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) baseia-se na digestão do DNA genômico, combinado com a amplificação por PCR e, devido ao grande número de fragmentos obtidos, é realizada uma outra amplificação seletiva por PCR com a adição de nucleotídeos arbitrários na extremidade 3' do iniciador, propiciando o aumento da seletividade do iniciador e a redução da complexidade dos produtos amplificados. Os fragmentos de DNA, no final do processo, são detectados pelo fracionamento em géis de sequenciamento. Outros marcadores, ainda muito utilizados, são os SSR (*Simple Sequence Repeats*), também conhecidos como microssatélites (LITT; LUTY, 1989). Consistem em uma subclasse de DNA repetitivo, formada por pequenas sequências (dois a seis nucleotídeos) repetidas em tandem, tais como (AT)_n, (ATT)_n, por exemplo. A variação do número de repetições dessas sequências gera uma grande quantidade de polimorfismo, favorecendo sua utilização em estudos genéticos (Figura 5). Contudo, na escolha e uso de tais marcadores, deve-se considerar o objetivo da pesquisa, características da técnica e condições disponíveis para sua utilização. As principais vantagens e limitações desses marcadores estão sintetizadas na Tabela 1.

Com o desenvolvimento e automatização de técnicas como o sequenciamento de DNA, uma nova geração de marcadores surgiu ou se adaptou a partir da primeira geração. Estes permitem identificar alelos específicos e/ou formas alternativas de alelos para genes importantes. Os marcadores PCR-específicos podem ser obtidos por: 1) conversão a partir de marcadores já existentes e, após seu desenvolvimento, tem como vantagens o custo reduzido e prati-

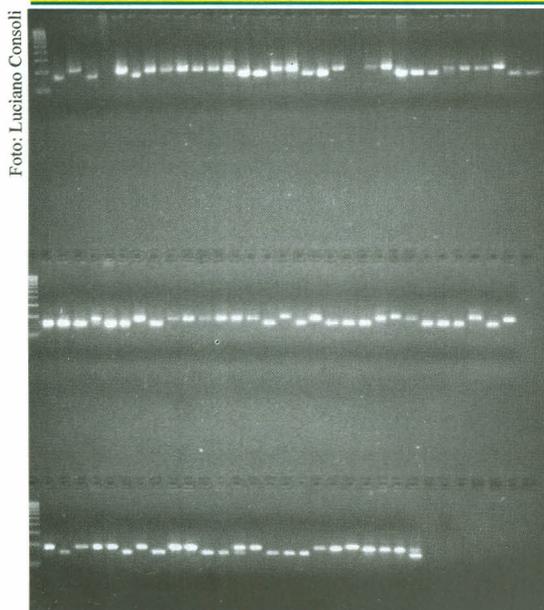


Foto: Luciano Consoli

Figura 5. Marcadores microssatélites de trigo em gel de agarose a 3% de concentração e visualizados com brometo de etídio.

cidade aumentada. Exemplos destes são os marcadores de sítio de sequência marcada (STS - *Sequence Tagged Site*) (PARAN; MICHELMORE, 1993), que foram definidos por estes autores como sequências de DNA curtas e de cópia única, que podem ser identificadas mediante amplificação, por meio de PCR e/ou hibridização, e não possuem DNA repetitivo em sua constituição. Conforme Milach (1998), em geral, os STS são amplificados a partir de *primers* obtidos da conversão de marcadores RFLPs. Paralelamente, há as regiões amplificadas de sequências caracterizadas, ou SCARs, as quais Paran e Michelmore (1993) definiram como sendo sequências identificadas somente por PCR, podendo conter DNA repetitivo. Em geral, os marcadores SCAR são amplificados a partir de primers obtidos da conversão de outros

Tabela 1. Principais marcadores moleculares, características, vantagens e limitações.

Marcador molecular	Tipo ⁽¹⁾	Vantagem	Limitação
RFLP	C	<ul style="list-style-type: none"> - Número de marcadores alto - Cobre a totalidade do genoma 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de bibliotecas de sondas - Problemas envolvendo vários passos intensivos em mão de obra - Custo é relativamente alto
RAPD	D	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicidade e rapidez - Quantidade mínima de DNA necessária - Possibilidade de explorar genomas anônimos - Custo relativamente baixo 	<ul style="list-style-type: none"> - Marcador dominante - Problemas de repetibilidade
AFLP	D	<ul style="list-style-type: none"> - Grande número de fragmentos gerados e resolvidos em um único gel - Não requer conhecimento prévio da sequência de DNA - Maior robustez do ensaio AFLP comparado ao RAPD 	<ul style="list-style-type: none"> - Marcador dominante - Complexidade da técnica - Exigência de extração de DNA bastante puro
SSR	C	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado conteúdo de polimorfismo devido à expressão codominante - São frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo cobertura total de qualquer genoma 	<ul style="list-style-type: none"> - Grande quantidade de trabalho é necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores

⁽¹⁾C: Codominante, D: Dominante

Fonte: Ferreira e Grattapaglia (1996).

marcadores de PCR, como RAPD; 2) sequências expressas e/ou depositadas em bancos de dados, integrando-se às ferramentas da bioinformática, podem ser obtidas por meio de polimorfismo de sequência expressa marcada (ESTP – *Expressed Sequence Tag Polymorphism*). Este tipo de marcador pode ser desenvolvido a partir de sequências diferencialmente expressas, identificadas por técnicas como o *Differential Display*, *Microarray*, cDNA AFLP, entre outros. Entretanto, o polimorfismo de um nucleotídeo (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) tem sido o mais utilizado, atualmente, pela alta especificidade e robustez na caracterização de indivíduos (MILACH et al., 2002). SNP é um marcador que diferencia indivíduos através da variação de um nucleotídeo, detectadas em sequências de DNA que codificam um gene ou não. Este marcador pode ocorrer por transição (base púrica substituída por base púrica), ou por transversão (base púrica substituída por base pirimídica, ou vice-versa). Podem ser encontrados de duas maneiras no genoma: SNPs individuais ou na estrutura de haplogrupos, ou seja, num conjunto de mutações dentro de uma sequência de DNA, as quais, em decorrência de sua proximidade, são geralmente herdadas juntas (BROOKES, 1999).

Aplicação dos marcadores de DNA

A aplicação dos marcadores moleculares é muito ampla, mas as principais linhas que têm contribuído para os programas de melhoramento são a caracterização de germoplasma, estudos de variabilidade e diversidade genética entre acessos, linhagens ou cultivares, desenvolvimento de mapas genéticos, associação com caracteres quantitativos e seleção assistida, principalmente quanto à resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos.

Considerando-se a cultura do trigo quanto à sua produção e à qualidade tecnológica, estas são fortemente afetadas por estresses bióticos (ferrugem da folha, brusone, giberela, etc.) e abióticos (seca, germinação pré-colheita, alumínio, etc.). Embora exista considerável variabilidade genética para resistência/tolerância a esses estresses nos bancos de germoplasma do País, existe uma grande demanda por estoques genéticos bem caracterizados e a obtenção de cultivares com maior resistência genética torna-se a alternativa mais viável para evitar perdas por esses estresses.

Dessa forma, o grande avanço tecnológico no Brasil na área de biotecnologia, nas últimas décadas, intensificou os estudos genéticos no sentido de aprofundar o conhecimento do germoplasma gerado, a partir dos estudos moleculares de plantas relacionados aos estresses ambientais que causam perdas significativas às principais culturas, entre as quais o trigo.

Alguns exemplos das aplicações dos marcadores moleculares, citados anteriormente, foram obtidos em genótipos de trigo brasileiros, tanto na Embrapa Trigo como em outras instituições de pesquisa do Brasil e do exterior, mas em parceria com a Embrapa, os quais destaca-se a seguir: a) estudos de diversidade genética entre cultivares e linhagens de trigo foram estimados por RAPD (BERED, 1999), AFLP (ROSA, 2001) e por SSR entre trigo cultivado, *T. aestivum* e *Ae. tauschii* (doador do genoma D de *T. aestivum* e que constitui importante fonte de genes agronomicamente úteis, principalmente para resistência a patógenos) (ALMEIDA, 2006); b) pesquisas conduzidas em relação à resistência não-específica à ferrugem da folha na cultivar Toropi. Nesta linha, ressalta-se a identificação de

dois novos genes recessivos, com designação temporária de *Trp-1* e *Trp-2* (BARCELLOS, 1994; BARCELLOS, et al., 2000), os quais foram mapeados nos cromossomos 1A e 4D através de uma série aneuploide e SSR (BRAMMER, 2000; SILVA, 2002). Ainda com relação à *Toropi*, foram desenvolvidos dois marcadores do tipo AFLP (BRAMMER, 2000) e a posterior conversão destes em marcadores SCAR (SILVA, 2002); c) identificação e validação de marcadores, caracterização de mecanismos moleculares associados a genes diferencialmente expressos quanto à resistência à ferrugem da folha em trigo (SILVA, 2006); d) estudos preliminares de caracterização molecular através de microssatélites e genotipagem automatizada (Figura 6), bem como a construção de mapa genético de populações segregantes, visando à associação de genes de resistência de planta adulta à ferrugem da folha e à tolerância à germinação na pré-colheita, numa parceria entre Brasil e França (MOREL et al., 2007).

Expressão gênica

Metodologias de estudo de variações de expressão (tanto transcricionais como traducionais) são independentes da planta em estudo. O termo genômica funcional refere-se à função dos genes e à regulação de sua expressão. Ela engloba tanto as análises de expressão (transcricional) como os estudos de proteínas.

Expressão gênica - análises transcricionais

Existe uma diferença de expressão dos genes, tanto em função dos tecidos quanto em função do tempo, seja em resposta a um determinado tratamento ou ao longo do desenvolvimento do organismo considerado. Por meio do estudo de variações de quantidades de transcritos, é possível a realização de arranjos de cDNAs, a preparação de mapas de transcritos ou, ainda, o desenvolvimento de marcadores moleculares funcionais (GUPTA et al., 2008).

Metodologias de análise do perfil diferencial têm seus méritos e deméritos.

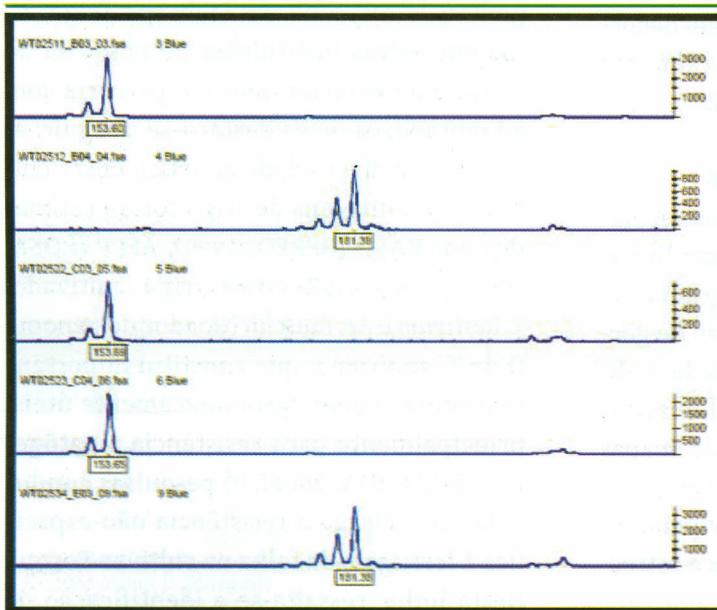


Foto: Ana Lídia Variiani Bonato

Figura 6. Sequenciador automático (acima) para genotipagem de indivíduos da população segregante, através da análise de produtos da reação de polimerase em cadeia (PCR) e a detecção dos alelos realizada de forma automatizada pela emissão de fluorescência (à esquerda).

A grande maioria dos métodos objetiva a obtenção de uma “fotografia” de padrões globais de expressão gênica em determinados tipos de células, tecidos, órgãos ou tratamentos (YOUNG et al., 2008).

Historicamente, o uso do *screening* diferencial de bibliotecas de cDNA foi amplamente difundido para a pesquisa de genes regulados transcricionalmente. Inicialmente, o método consistia na hibridização comparativa de uma determinada sonda com duas bibliotecas (A e B), cada uma delas preparada a partir de duas condições distintas. Esta é uma técnica de fácil execução e confiável, que possibilitou a identificação de grande número de clones obtidos a partir de genes abundantemente expressos. No entanto, ela não permitia a identificação de RNAs mensageiros raros. Este problema foi parcialmente resolvido pelo emprego da técnica de hibridização subtrativa (HEDRICK et al., 1984). Os cDNAs de uma das bibliotecas (por exemplo, biblioteca A) são marcados com biotina. Os cDNAs das bibliotecas A e B são hibridizados, sendo eliminados aqueles marcados, ou seja aqueles provenientes exclusivamente da biblioteca A, ou resultado da geração de cDNAs híbridos (A-B, com somente uma das fitas marcadas). Esta técnica é trabalhosa e necessita de grandes quantidades de RNA para que vários ciclos sucessivos de subtração sejam realizados.

Paralelamente a estes estudos, projetos de sequenciamento sistemático de cDNAs (ESTs) foram desenvolvidos em espécies-modelo, tais como *Arabidopsis thaliana* (BEVAN et al., 1999) e arroz (GOFF, 1999) visando a elucidar a porção do genoma que é expressa (genoma funcional). No caso do sequenciamento sistemático de ESTs, considera-se que a frequência da EST de uma determinada biblioteca corresponda à taxa de acúmulo do RNA mensageiro correspondente.

Esta abordagem é restrita a RNAs mensageiros abundantes, e permitiu a identificação de genes super e sub-expressos em certas condições ambientais. Em trigo, é crescente o número de projetos voltados ao sequenciamento de ESTs.

A partir de informações sobre ESTs, a busca por sequências de microsatélites (SSR) e SNPs de trigo foi realizada, massivamente, por diferentes equipes de pesquisa no mundo (GUPTA et al., 2003; YU et al., 2002; PENG; LAPITAN, 2005; PARIDA et al., 2006; USDA, 2006). Estes marcadores possibilitam não somente estudos de mapeamento genético e de clonagem posicional de genes como a identificação de marcadores para uso em seleção assistida junto ao melhoramento genético.

RNAs mensageiros de menor expressão passaram a ser identificados graças ao emprego de técnicas de *fingerprinting* de RNA. Estas técnicas permitem a detecção de fragmentos de DNA derivados dos RNAs, utilizando-se a síntese de cDNAs e subsequente amplificação por PCR (McCLELLAND et al., 1995). Desenvolvidas por grupos de pesquisa independentes, elas foram denominadas de DDRT-PCR, *Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (LIANG; PARDEE, 1992) e RAP-PCR, *RNA Fingerprinting by Arbitrary Primed PCR* (WELSH et al., 1992). Na primeira delas, a primeira fita de cDNA é sintetizada graças a um *primer poly-dT*, contendo duas bases de ancoragem do tipo MN, na posição 3'. Em seguida, a população de cDNAs gerada é submetida a ciclos de amplificação por PCR, utilizando-se o mesmo *poly-dT* e oligonucleotídeos arbitrários em posição 5' (LIANG; PARDEE, 1992). O RAP-PCR, por sua vez, emprega *primers* arbitrários tanto para a síntese do cDNA como para a amplificação por PCR (WELSH et al., 1992). Am-

bas as técnicas requerem temperaturas de anelamento baixas durante os ciclos de amplificação, de modo a obter-se produtos visíveis em géis. Em qualquer uma destas técnicas, fragmentos de DNA diferencialmente expressos são subsequentemente clonados e sequenciados, para a identificação das sequências.

A RDA e a SSH seguem o princípio de técnicas de PCR subtrativa. A técnica de RDA (*Representational Difference Analysis*) foi originalmente desenvolvida para identificar diferenças entre populações de DNA genômico (LISITSYN et al., 1993). Esta metodologia foi então modificada para permitir a análise de diferenças em populações de mRNA expressos (HUBANK; SCHATZ, 1994). Baseado em passos sucessivos de hibridização subtrativa seguida de PCR, a RDA enriquece e permite o isolamento de mRNA expresso diferencialmente, enquanto que, simultaneamente, reduz a representação de sequências não diferencialmente expressas. Este é um método sensível, que permite o isolamento tanto de genes que apresentam aumento do acúmulo de transcritos como diminuição destes, entre duas populações de cDNAs consideradas.

A SSH (*Suppressive Subtractive Hybridization*) é baseada no princípio da PCR supressiva e combina a normalização e a subtração dos cDNAs de interesse numa única etapa. Com base em modelo teórico, a SSH enriqueceria em até mil vezes a quantidade de transcritos raros, com um ciclo de hibridização subtrativa (DIATCHENKO et al., 1996).

Bachem et al. (1996) desenvolveram metodologia de RNA *fingerprinting* baseada na técnica de AFLP (VOS et al., 1995). A técnica de cDNA AFLP é particularmente in-

teressante para a detecção de transcritos raros, diferencialmente regulados. Originalmente empregada para análise de DNA genômico (VOS et al., 1995), o AFLP é baseado no uso de condições de PCR altamente estridentes, adicionando-se adaptadores dupla-fita às extremidades de fragmentos de restrição, que servirão à amplificação por PCR. A amplificação seletiva de fragmentos é obtida graças à adição de uma ou mais bases aos primers PCR, que promoverão a extensão dos fragmentos somente se o fragmento flanqueando o sítio de restrição possuir a sequência complementar ao primer. A técnica de cDNA AFLP é particularmente interessante para a detecção de transcritos raros, diferencialmente regulados.

SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) baseia-se no princípio de que pequenas etiquetas (do inglês, *tags*) de sequência são suficientes para a identificação de um transcrito gênico, visto elas estarem localizadas em posições conhecidas do gene em estudo (VELCULESCU et al., 1995). Esta técnica de análise de expressão gênica corresponde a uma versão acelerada do sequenciamento de ESTs. A etiqueta do SAGE inclui nove bases anteriores ao sítio de reconhecimento de uma endonuclease em um transcrito específico. Múltiplos tags são ligados, uns aos outros, em um vetor de clonagem, tal qual uma reação de sequenciamento de 300 pares a 500 pares de bases, gerando sequências de 20 tags a 30 tags. Diferenças de expressão baseiam-se na abundância relativa de tags específicos. Em relação à DDRT-PCR, por exemplo, esta técnica apresenta como vantagem, o fato de ser quantitativa e cumulativa. Por outro lado, ela apresenta como limitação, a identificação restrita a genes representados pelos tags de

sequências, além do inconveniente potencial da identificação incorreta dos *tags*.

No contraponto de sistemas abertos de estudo das variações de expressão gênica, como a DDRT-PCR e o AFLP de cDNA (nos quais não se tem conhecimento prévio das sequências de cDNAs analisados), estão os chamados sistemas fechados, tais como microarranjos, onde um grande conjunto pré-definido de genes é analisado simultaneamente. Os arrays podem ser resultantes do depósito de pequenos volumes de cDNA (ou oligonucleotídeos) sobre um suporte, utilizando-se um robô, ou lançam mão do uso de fotolitografia para a síntese de sondas de oligonucleotídeos *in situ* (como é o caso dos arrays produzidos pela companhia Affimetrix) (FODOR et al., 1993; LIPSCHUTZ et al., 1999).

Os grandes fragmentos de DNA usados para os microarranjos de cDNAs geralmente têm reação cruzada com transcritos de múltiplos membros de famílias, fortemente relacionadas. Este fato é particularmente importante no caso do trigo hexaploide, onde os três genes homólogos de um dado loco podem ser todos expressos. O custo de cada array pode restringir seu uso, ou ainda limitá-lo a hibridizações com finalidade exploratória de identificação de genes candidatos, os quais seriam estudados através de técnicas de menor escala (LEADER, 2005).

Os arrays Affymetrix apresentam vantagens significativas sobre os arrays de cDNAs, em termos de qualidade dos dados e facilidade de comparação entre as amostras. As múltiplas e menores sondas utilizadas por esta plataforma permitiriam a distinção entre genes homólogos do trigo que apresentem especificidades espaciais e temporais (POOLE et al., 2007).

No caso de grãos de trigo e de cevada, a transcriptômica tem sido usada para relacionar a abundância de transcritos a mudanças ao longo do desenvolvimento. Foram empregados estudos do tipo microarranjos de cDNA para trigo (LAUDENCIA-CHINGCUANCO et al., 2007) e de macroarranjo de cevada para se estudar partes do transcriptoma (SREENIVALSULU et al., 2006). Alternativamente, sistemas abertos baseados na contagem de sequências têm sido aplicados (KAWAURA et al., 2005). Estes autores classificaram os padrões de expressão de dois grupos de genes de proteínas de reserva, a partir de dados de abundância de ESTs. McIntosh et al. (2007), por sua vez, usaram o SAGE para o estudo do grão de trigo em desenvolvimento. Ambas as técnicas são complementares. Os arrays permitem grande resolução das diferenças de expressão e facilidade de comparação a partir de uma plataforma fixa, enquanto que sistemas abertos, entre eles abordagens de sequenciamento, possibilitam a descoberta de novos transcritos.

No presente texto, foram apresentados os princípios e exemplos das principais técnicas empregadas para estudos de expressão gênica. As referências apresentadas anteriormente, para cada técnica de análise de expressão, dizem respeito à primeira descrição do método. É importante salientar que todas estas técnicas foram sofrendo, ao longo do tempo, uma série de modificações de seu modelo original, visando à implementação de melhorias na identificação e no isolamento de genes, diferencialmente expressos. Além de melhorias das técnicas citadas, outras técnicas baseadas em PCR foram desenvolvidas (LIEVENS; GOORMACHTIG, 2001).

Expressão gênica – estudos de proteínas

Análise de classes específicas de proteínas

Apesar da importância dos estudos de expressão gênica baseados na análise de transcritos (ESTs) na identificação de novos genes, é frequente a ausência de correlação entre a quantidade de um transcrito e a quantidade da proteína correspondente. O interesse em estudar proteínas está fundamentado na importância dessas moléculas como determinadoras do fenótipo, desempenhando funções de sinalização, enzimáticas, regulatórias e estruturais.

No caso específico de grãos de trigo, o estudo científico de proteínas teve início no século 19. T.B. Osborne (1859-1929), considerado o pai da química de proteínas vegetais, desenvolveu uma classificação destas proteínas em função de sua solubilidade em diferentes solventes (SHEWRY; HALFORD, 2002). Apesar desta classificação, as proteínas do grão são atualmente divididas em três grupos: proteínas de reserva, proteínas estruturais e metabólicas, e proteínas de proteção. Cerca de 10% a 15% do peso seco do grão é composto por proteínas, sendo a metade de proteínas de reserva.

As gliadinas e gluteninas são as principais proteínas de reserva do endosperma do trigo. São extremamente polimórficas, permitindo a mutação dos seus genes codificadores em várias formas alélicas (PAYNE, 1987). As gliadinas, extraídas a partir da fração do glúten solúvel em álcool, podem ser separadas em grupos, de acordo com sua mobilidade eletroforética: α - β , γ e ω . As gluteninas são classificadas como de alto peso molecular (HMW-GS, *high-molecular-weight glutenins*) e de baixo peso molecular (LMW-GS, *low-molecular-weight glu-*

tenins), e formam um macropolímero no glúten, graças à formação de pontes de dissulfeto (GRAS et al., 2001).

Tanto as α - β gliadinas como as HMW-GS são importantes para a qualidade do glúten, mas a caracterização de cada multigene não é simples, pois muitos deles são transcritos, traduzidos e modificados pós-traducionalmente, ao longo do processo de maturação do grão (SHEWRY et al., 2003).

Estas proteínas de reserva têm grande impacto sobre a qualidade de uso final dos produtos derivados de trigo. Neste contexto, assumem particular importância os polímeros de gluteninas. Está estabelecido o conceito de que farinhas com alta força de glúten (altamente viscoelásticas) contêm grandes proporções destes polímeros (FIELD et al., 1983). Já no ano de 1987, houve uma quebra de paradigma quando Payne e colaboradores demonstraram que a variação alélica da composição em gluteninas de alto peso molecular estava fortemente correlacionada com diferenças de qualidade de panificação de trigos europeus (PAYNE, 1987). Foi a partir desta associação que estudos conduzidos nos mais diferentes países do mundo são dedicados ao entendimento das relações entre a estrutura das subunidades de HMW-GS e as propriedades da farinha de trigo (BRANLARD et al., 2001; TOHIDFAR et al., 2004).

Desde o final da década de 1980, a Embrapa Trigo realiza análises de determinação do perfil de HMW-GS de linhagens de trigo, desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético. A identificação dos alelos protéicos de gluteninas é realizada em géis de SDS-PAGE (Figura 7), graças à análise comparativa com cultivares internacionais de trigo, cujo perfil de gluteninas é conhecido.

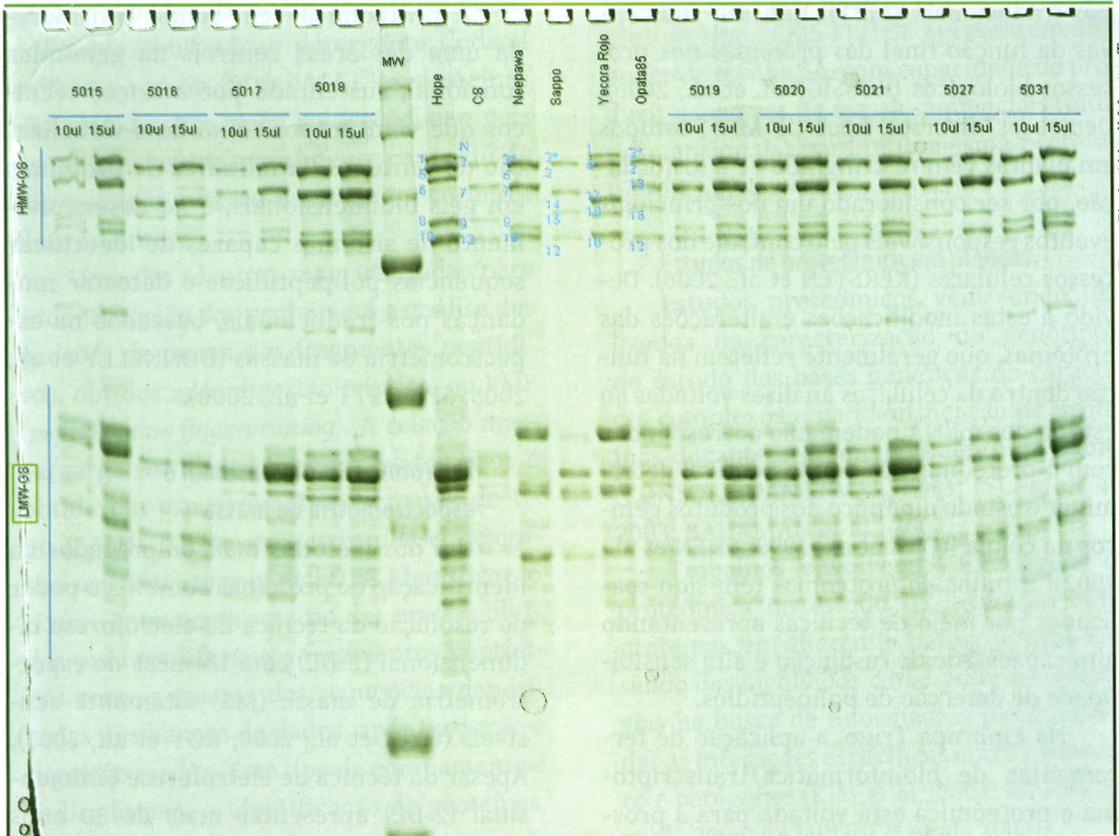


Figura 7. SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio) de gluteninas de linhagens de trigo do programa de melhoramento da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. Os números indicam a nomenclatura utilizada para as HMW-GS (*high-molecular-weight glutenins*). Cultivares de trigo utilizadas como referências de leitura: Hope, Chinese Spring (CS), Neepawa, Sappo, Yecora Rojo, Opata 85. Linhagens de trigo avaliadas: 5015, 5016, 5017, 5018, 5019, 5020, 5021, 5027 e 5031, para as quais foram aplicados volumes diferentes de extratos de gluteninas.

Análise de misturas complexas de proteínas

O estudo em larga escala das proteínas produzidas nas células e tecidos é definido como proteômica. Esta abordagem possibilita estabelecer relações diretas entre a característica de interesse (resistência/tolerância a doenças, geada e seca, precocidade, qualidade de uso final, eficiência na assimilação/translocação de nutrientes, etc.), nível de expressão e função protéica.

O termo proteoma surgiu no final de 1994, sendo caracterizado pelas proteínas expressas de forma complementar ao geno-

ma das células e subsequentes modificações pós-traducionais (WILKINS et al., 1996). Pode-se concluir que o sucesso de abordagens voltadas para a identificação de interações gênicas, envolvendo cascatas de sinais, depende tanto do aumento do conhecimento das áreas de genômica quanto de proteômica. Enquanto a genômica coloca à disposição um grande número de sequências, seja por meio do sequenciamento completo de genomas, ou pela obtenção em larga escala de ESTs, a proteômica pode ser considerada como a melhor ferramenta disponível na identificação de proteínas e de modificações

pós-traducionais (MPT), que são indicativas da função final das proteínas nos processos biológicos (ROSSIGNOL et al., 2006). Dentre os diversos tipos de MPT, estudos em plantas vêm restringindo-se à fosforilação, por ser considerado um dos principais eventos responsáveis pelo controle dos processos celulares (KERSTEN et al., 2006). Devido a estas modificações e alterações das proteínas, que geralmente refletem na função dentro da célula, as análises voltadas ao estudo dos mRNA podem não corresponder com o proteoma, não sendo possível determinar o estado dinâmico dos produtos gênicos na célula (GYGI et al., 1999; CHEN et al., 2002). Estudos de proteomas têm sido realizados por meio de técnicas apresentando alta capacidade de resolução e alta sensibilidade de detecção de polipeptídeos.

Na Embrapa Trigo, a aplicação de ferramentas de bioinformática/transcriptoma e proteômica está voltada para a prospecção de genes de interesse, relacionados à resposta a processos biológicos e a estresses bióticos e abióticos, gerando subsídios para a valoração dos genótipos existentes no banco ativo de germoplasma, assim como o desenvolvimento de novas cultivares de trigo. Em outras palavras, a prospecção gênica tem os recursos genéticos como material de estudo, e ferramentas da biologia moderna como instrumentos de trabalho. Ela visa à identificação de “genes candidatos”, definidos como aqueles associados a características de interesse do ponto de vista agrônomo e industrial.

Assim, uma abordagem de proteômica, entendida como o estudo em larga escala das proteínas expressas pelo genoma, torna-se interessante no estudo destes mecanismos, tendo em vista a possibilidade de identificação de alterações ocorridas diretamente nas proteínas.

A proteômica vem sendo considerada uma das áreas centrais da genômica funcional, sustentada por avanços técnicos que vêm proporcionando a visualização de centenas ou milhares de proteínas em géis bidimensionais, e no desenvolvimento de sistemas capazes de identificar sequências polipeptídicas e detectar mudanças pós-traducionais, baseados na espectrometria de massas (DONNELLY et al., 2005; SPICKETT et al., 2006).

Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa

Um dos métodos mais empregados na identificação de proteínas combina o poder de resolução da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) com técnicas de espectrometria de massa (MS) altamente sensíveis (GYGI et al., 2000; KOY et al., 2003). Apesar da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) apresentar mais de 30 anos (O'FARRELL, 1975), pode ser considerada, ainda hoje, uma das melhores para separação de misturas complexas de proteínas, fornecendo informações sobre pI (ponto isoelétrico), massa molecular, quantidade relativa e modificações pós-traducionais pela alteração da mobilidade eletroforética (WITTMAN-LIEBOLD et al., 2006).

A separação das proteínas durante a 2-DE ocorre em duas etapas, considerando-se duas características inerentes às moléculas protéicas. Na primeira etapa, as moléculas são separadas em função do pH (focalização isoelétrica), em um gradiente de pH imobilizado em um gel de poli(acrilamida) (BJELLQVIST et al., 1982), até atingirem uma posição estacionária (eletroforese em equilíbrio), ou carga total igual a zero. O pH no qual a proteína apresenta carga zero é chamado de ponto isoelétrico (pI). Na segunda etapa, as proteínas são separadas pelo

peso molecular, também em gel de poliacrilamida contendo o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas são visualizadas após coloração dos géis de poliacrilamida, geralmente com azul de coomassie, nitrato de prata ou corantes fluorescentes.

Uma das técnicas mais utilizadas para a identificação das proteínas é a análise dos padrões de massa dos fragmentos peptídicos, obtidos após digestão trípica, ou PMF (*peptide mass fingerprinting*). A relação massa/carga (m/z) dos fragmentos trípticos é obtida em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*). A identificação ocorre com a comparação das massas obtidas para os diferentes fragmentos peptídicos com as massas das sequências depositadas nos bancos de dados, após tradução e digestão *in silico*. Este tipo de equipamento é indicado para a identificação de proteínas, em organismos onde o genoma já tenha sido sequenciado ou apresentando grande quantidade de sequências de cDNAs. Para organismos com genomas pouco estudados, aparelhos de espectrometria com câmaras de colisão (IT - *ion trap*), permitem a obtenção de novos fragmentos peptídicos, após digestão trípica (ESI-MS/MS - *electrospray ionization-tandem mass spectrometry*), fornecendo mais informações estruturais e, consequentemente, aumentando a probabilidade de identificação das proteínas (ZIVY; DE VIENNE, 2000). O desenvolvimento de espectrômetros de massa cada vez mais sensíveis e precisos intensificou-se nos últimos anos. Basicamente, estes equipamentos apresentam diferentes combinações de três componentes básicos de um espectrômetro: i) fonte de íons (MALDI ou ESI); ii) analisador de massa (TOF ou quadrupole) e iii) detector acoplado com equipamentos de cromato-

grafia líquida (LC) ou gasosa (GC). Combinações do tipo LCMS-IT-TOF apresentam alto poder de resolução, com capacidade de produzir espectros de massa sequenciais (multidimensionais) para uma mesma proteína (SPARKMAN, 2005).

Estudos de proteômica em plantas

Estudos proteômicos vêm sendo utilizados na caracterização de genótipos, no estudo das bases genéticas de caracteres complexos e na identificação de proteínas durante o desenvolvimento da planta (CONSOLI; DAMERVAL, 2001; ISLAM et al., 2003; BAHRMAN et al., 2004).

Trabalhos envolvendo abordagens de proteômica no estudo da interação entre proteínas, em diferentes patossistemas, vêm sendo desenvolvidos como parte de estratégias na busca de informações para desvendar as interações específicas entre hospedeiro e patógenos (KIM et al., 2004; MAHMOOD et al., 2006; RAMPITSCH et al., 2006).

No trabalho de Kim et al. (2004), os autores extraíram proteínas de folhas de arroz nos tempos 24, 48 e 78 horas após inoculação com *Magnaporthe grisea*. Foram identificadas oito proteínas induzidas na folha pela presença do fungo, usando géis de eletroforese bidimensional e espectrometria por MALDI-TOF. Dentre estas oito proteínas, foram identificadas duas receptoras de quinases (RLK), duas glucanases, taumatina (TLP), uma peroxidase (POX), uma proteína induzida por probenazole (PBZ1) e uma proteína relacionada à patogênese (PR10). Estes resultados sugerem que a indução precoce destes genes, antes mesmo das plantas apresentarem sintomas da doença, pode estar relacionada com a resistência apresentada pela planta.

Rampitsch et al. (2006) investigaram alterações no padrão de géis 2-DE duran-

te o desenvolvimento da ferrugem da folha em plantas suscetíveis de trigo, causada por *Puccinia triticina*. Um total de 32 proteínas apresentando aumento de expressão foi identificado após nove dias de infecção. Destas proteínas, sete foram do hospedeiro com funções relacionadas com o *turnover* de proteínas, além de proteínas envolvidas na resposta de estresses bióticos e abióticos (proteínas 14-3-3). Como esperado, a maioria das alterações na expressão de proteínas (25 proteínas) nos géis do material suscetível for identificada como fúngica. Estes resultados confirmam a sensibilidade da espectrometria de massa para a identificação de proteínas em extratos complexos.

Estudos envolvendo análises de géis de eletroforese bidimensional de proteínas de folhas foram realizados no mutante de arroz blm - *blast lesion mimic* (JUNG et al., 2005, 2006). Este mutante apresenta reação de hipersensibilidade a várias raças de *M. grisea*, indicando a presença de resistência não específica a raças (JUNG et al., 2005). Jung et al. (2006) identificaram 26 proteínas não redundantes, diferencialmente expressas entre as folhas do genótipo mutante e do genótipo controle. Estas proteínas foram agrupadas em quatro categorias funcionais, relacionadas com a alteração do padrão protéico durante a formação das lesões, envolvendo redução da fotossíntese e do metabolismo energético. Foram identificadas quatro proteínas relacionadas com respostas de defesa, apresentando grande potencial como marcadores de desenvolvimento de lesão em arroz. Estes estudos vêm demonstrando o potencial da proteômica na identificação de genes candidatos relacionados com estresses bióticos.

Bioinformática

A bioinformática caracteriza-se pela interdisciplinaridade, utilizando conhecimentos das Ciências da Computação, Biológicas, Matemáticas e a Estatística, para o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem melhor e mais rápida interpretação na busca de soluções de problemas biológicos. Com este fim, a bioinformática tem um papel importante tanto na análise quanto na organização de informações, permitindo o agrupamento, a identificação e a comparação de dados de uma espécie ou entre espécies. A combinação de ferramentas de bioinformática possibilita a aquisição de informações que podem levar, em tempo hábil, ao entendimento e ao delineamento de novas estratégias para a solução de problemas. Isto é fundamental em tempos onde a velocidade na aquisição, interpretação e uso destes dados pode representar ganhos significativos em culturas com importância mundial, como a do trigo e outros cereais de inverno.

Fazendo um breve histórico desta nova área da biotecnologia: em maio de 2000 existiam apenas nove sequências de trigo depositadas no GenBank, um dos maiores repositórios de sequências de domínio público do mundo (LAZO et al., 2004). O avanço nas técnicas da biologia molecular e o uso de diferentes abordagens trouxeram um grande aumento no volume de dados, permitindo um salto quantitativo e qualitativo na obtenção de informações em busca da seleção de genótipos assistida por marcadores.

Consórcios internacionais para o estudo de trigo e outras gramíneas foram formados (GUPTA et al., 2008), como por exemplo o *International Triticeae Mapping Initiative* (USDA, 1989), que teve como objetivo, a geração de marcadores RFLP em culturas de

trigo e cevada, culminando com a estruturação do banco de dados GrainGenes. Atualmente, este sítio inclui centeio, aveia e cana de açúcar, entre outras espécies, e disponibiliza dados de mapas físicos, genéticos e de deleção, marcadores moleculares, sondas, iniciadores e sequências, entre outros serviços. Em 1998, foi lançado o *International Triticeae EST Cooperative* (ITEC), com o objetivo de gerar dados para o estudo funcional do trigo. Com o sequenciamento completo do genoma do arroz (YU et al., 2002; GOFF et al., 2002), foi estruturado o banco de dados Gramene, integrando as informações existentes e oferecendo análises comparativas entre os dados disponíveis de gramíneas (WARE et al., 2002). Com a diversidade de abordagens, surgiram novos consórcios: microssatélites (ITMI-EST/SSR; Genoplante/INRA Wheat SSR Club); transposons (ITMI-TREP); etiquetas de sequências expressas (CR_EST, KOMUGI, wEST). Os endereços dos sítios mencionados estão listados na Tabela 2.

Bioinformática em gramíneas

Estudos de comparação em mapas genéticos de baixa resolução mostram uma extensa conservação no conteúdo e ordem gênica entre os cereais. Foram estabelecidas relações entre arroz, cana de açúcar, sorgo, milho, trigo, cevada, centeio e aveia (DEVOS et al., 2000). O arroz foi escolhido como organismo modelo, por possuir o menor genoma entre as gramíneas (aproximadamente 430 Mb) e como substituto para a clonagem posicional de genes importantes dos genomas maiores, tendo como base a microcolinearidade. Entretanto, pequenas

Tabela 2. Endereços eletrônicos contendo dados de gramíneas.

CEREALIMMUNITY	http://www.generationcp.org/subprogramme3.php
CR_EST	http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/index.php
ETGI	http://pgrc.ipk-gatersleben.de/etgi/
Genoplante/INRA	http://www.genoplante.com/
GrainGenes	http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml
Gramene	http://www.gramene.org/
IMGC	http://imgc.inibap.org/
ITEC	http://wheat.pw.usda.gov/genome/
ITMI	http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/
ITMI-EST/SSR	http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/
ITMI-TREP	http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats/
IWGSC	http://www.wheatgenome.org/
KOMUGI	http://shigen.lab.nig.ac.jp/wheat/komugi/top/top.jsp
NCBI - GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI - Taxonomy	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Taxonomy
wEST	http://wheat.pw.usda.gov/wEST/
Wheat SSR Club	http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/

translocações, deleções, inversões e duplicações impossibilitam o processo (SORRELLS et al., 2003; GILL et al., 2004). Já havia sido demonstrado que ocorre baixa colinearidade para genes de resistência, devido a sua rápida evolução entre as gramíneas (LEISTER et al., 1998). Estes fatos iniciaram as discussões em 2002, para o sequenciamento do genoma do *T. aestivum*, e em seguida à formação do *International Wheat Genome Sequencing Consortium* (IWGSC) (GILL et al., 2004). Também em 2004, foi lançado o CEREALIMMUNITY, proposta do *Generation Challenge Programme*, quando, em um de seus subprojetos, procurou-se elucidar a resistência aos fungos *M. grisea* e *P. triticina* em arroz e trigo. A área de biotecnologia da Embrapa Trigo participou deste projeto e também do Projeto *Mygene*, parte do *International Mycosphaerella Genomics Consortium*, que visa à análise comparativa entre *Mycosphaerella graminicola*

e *Mycosphaerella fijiensis*. É esperado, portanto, um grande acréscimo de informação a médio prazo, possibilitando grandes avanços no melhoramento genético de cereais, principalmente trigo, arroz e milho.

Varshney et al. (2005, 2006) sugerem que uma abordagem computacional de genômica comparativa, entre espécies com alto grau de colinearidade, pode resultar na transferência de informação de espécies modelo, e com alto índice de cultivo, para espécies menores. Esta abordagem permitiria a transferência da informação a um custo reduzido e com alto índice de retorno. O arroz, o milho e o trigo possuem o potencial para serem explorados.

Dados de cereais de inverno depositados em bancos mundiais

Atualmente, o total de sequências de gramíneas depositadas no GenBank ultrapassa os dez milhões. A tribo Triticeae ultrapassa 1,6 milhão e destas, aproximadamente 1,1 milhão – cerca de 10% do total – são de *T. aestivum*. Comparando-se a cultura do trigo com a do triticales, é possível

notar que esta última encontra-se em posição semelhante à do trigo, dez anos atrás: 49 sequências (Tabela 3). Nota-se, também, que trigo, milho, sorgo e arroz representam juntos cerca de 69% de todas as sequências depositadas, e um grande número de projetos genoma de gramíneas está em andamento, devido à importância destas culturas. O grande aumento de sequências expressas (ESTs) de trigo deve-se à complexidade de seu grande genoma – aproximadamente 16 Gb (giga pares de base) de tamanho – sendo cerca de 80% deste total composto por regiões repetitivas. A identificação de sequências expressas em diferentes condições de cultivo ainda permanece uma excelente estratégia para desvendar os mecanismos bioquímicos e fisiológicos que regem o comportamento da planta frente a estresses bióticos e abióticos.

Aplicação de ferramentas da bioinformática no estudo de gramíneas

A grande quantidade e diversidade de dados gerados impulsionou a bioinformática

Tabela 3. Informações sobre gramíneas depositadas no banco de dados GenBank (NCBI).

Espécie/tribo/família	EST	GSS	Proteína	Projetos genoma	UniGenes	Total* (%)
Triticeae	1.640.539	61.908	18.415	8	64.334	16,21
<i>Triticum spp</i>	1.093.369	51.878	8.450	3	41.256	10,90
<i>Triticum aestivum</i>	1.051.304	51.830	5.318	1	41.256	10,01
<i>Hordeum vulgare</i>	502.895	2.034	5.395	1	23.078	4,81
<i>Secale cereale</i>	9.298	2.906	259	1	-	0,1162
<i>Avena sativa</i>	7.633	1.000	232	1	-	0,0727
<i>Aegilops spp</i>	4.446	5.056	1.666	2	-	0,0905
<i>Triticosecale</i>	49	-	3	-	-	0,0005
<i>Sorghum bicolor</i>	209.814	794.962	4.757	1	13.895	9,57
<i>Oryza sativa</i>	1.220.877	286.566	224.371	1	40.762	14,35
<i>Zea mays</i>	1.464.859	2.092.360	22.023	1	71.014	33,87
Poaceae	5.430.761	5.072.452	280.729	35	205.599	100

* Relativo à soma das sequências nucleotídicas (ESTs e GSSs). Dados obtidos em 23/09/2008.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>.

ca no desenvolvimento de ferramentas para análise. Há alguns anos atrás, seria suficiente analisar, sequenciar e identificar genes através de *pipelines*, para verificação de qualidade, clusterização e identificação por similaridade (KOSKI et al., 2005) de sequências. Os *pipelines* ainda são imprescindíveis e capazes de fornecer importantes informações, como Lazo et al. (2004), que produziram mais de 116 mil sequências de ESTs para a obtenção de sondas, conseguindo mapear 16 mil *locus* em mapas de deleção, utilizando bioinformática na estratégia experimental. Do mesmo modo, Somers et al. (2003) obtiveram sucesso na amplificação, em 20 linhagens da variedade *Chinese Spring* do trigo, de regiões de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), após análise com ferramentas de bioinformática de 90 mil sequências de ESTs. Hattori et al. (2005) que, através de análise de similaridade de nucleotídeos e sequência traduzida em proteína de mais de 186 mil sequências de trigo e 237 mil sequências de cevada, tendo como base os dados de arroz e *Arabidopsis*, encontraram mais de 2.000 sequências desconhecidas, sendo 1.275 delas com similaridade apenas para a cevada, possíveis novos genes específicos de Triticeae.

Além disso, é imprescindível que a caracterização seja a mais completa possível, envolvendo colocalização em locos de características quantitativas (QTL - *quantitative trait loci*), vias metabólicas e suas possíveis relações com a resposta ao fenômeno estudado. O grande desafio enfrentado é a diferença de for-

mato dos dados gerados, que muitas vezes dificultam ou até impedem o agrupamento de informações importantes para o entendimento, o delineamento experimental adequado e a obtenção de respostas. Foram desenvolvidos verdadeiros *workflows*, compostos por ferramentas capazes de analisar diferentes tipos de dados, mas cujo formato padrão de saída de resultados possibilita sua comparação e o agrupamento das informações em uma única base de dados, como o Projeto GMOD (*Generic Model Organism Database*). As ferramentas disponibilizadas por este projeto, de domínio público, são amplamente utilizadas em bases de dados por todo o mundo, com os mais variados tipos de dados e organismos.

A Tabela 4 apresenta algumas das ferramentas mais utilizadas para análise em bioinformática e seus respectivos endereços eletrônicos: *phrap*, *SeqClean* e *VecScreen* para identificação e eliminação de ve-

Tabela 4. Endereços eletrônicos de ferramentas de bioinformática amplamente utilizadas.

Bioconductor	http://www.bioconductor.org
BioPerl	http://www.bioperl.org/wiki/Main_Page
BioPython	http://biopython.org/wiki/Main_Page
Cap3	http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php
Gene Ontology	http://www.geneontology.org/
GMOD	http://gmod.org/wiki/Main_Page
Interproscan	http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/
KEGG	http://www.genome.jp/kegg/pathway.html
NCBI - Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
NCBI - ORFinder	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
Perl	http://www.cpan.org/
phred, phrap, Consed	http://www.phrap.org
Python	http://www.python.org
R	http://cran.r-project.org/
RepeatMasker	http://www.repeatmasker.org/
SeqClean	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/
VecScreen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html

tores; *RepeatMasker*, para mascaramento de regiões repetitivas; *phred*, *phrap* e *conseq* (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON et al., 1998) e *Cap3* (HUANG; MADAN, 1999) para clusterização (agrupamento) de sequências; *Blast* (ALTSCHUL et al., 1990) para identificação de sequências por similaridade; *ORFinder*, para identificação de quadros abertos de leitura; *Interproscan*, (QUEVILLION et al., 2005), para identificação de domínios e motivos protéicos; *Gene Ontology*, para identificação de função, e *KEGG*, para identificação das vias metabólicas. A maioria destas ferramentas e bancos de dados são do tipo *software* livre, e podem ser instaladas localmente, em uma máquina com capacidade computacional adequada.

As linguagens de programação *Perl* e *Python* (*CPAN*, *Python*) são amplamente utilizadas para a automação e execução de análises, possuindo módulos específicos para o tratamento de dados biológicos (*BioPerl* e *BioPython*). Métodos para análise estatística foram implementados utilizando o *software* R (IHAKA; GENTLEMAN, 1996), por meio do Projeto Bioconductor. Uma grande quantidade de *scripts* (programas), bem como documentação, está disponível ao domínio público, seguindo a filosofia GNU (*General Public License*). Estas lingua-

gens de programação possuem uma sintaxe (o modo de escrever um programa) relativamente simples, facilitando a compreensão por profissionais das áreas biológicas, e tornando possível o desenvolvimento e a adaptação de *scripts* específicos, quando necessário.

Recentemente, foi publicado o mapa físico do maior cromossomo do trigo - 3B, com aproximadamente 1Gb (PAUX et al. 2008). Resultado do Projeto Genoplante (INRA), onde as regiões ricas em genes deste cromossomo foram clonadas em cromossomos artificiais de bactéria (BACs), o próximo passo é o sequenciamento em larga escala. O sucesso desta abordagem, considerada impossível a pouco mais de quatro anos, permitirá, com o auxílio das novas tecnologias (454, *Solexa* e *Solid*), a obtenção completa dos genes do genoma do trigo e de outras gramíneas de grande interesse econômico.

Na Embrapa Trigo, os esforços estão voltados para a compilação dos dados disponíveis publicamente, de modo a estruturar um banco de dados que contenha o maior e mais coerente número de informações referentes aos cereais de inverno - principalmente trigo - para auxiliar tanto o delineamento de novas estratégias quanto as pesquisas em desenvolvimento.

Referências

- ALBRECHT, J. C.; SÓ E SILVA, M.; SCHEEREN, P. L.; ANDRADE, J. M. V. de; TRINDADE, M. da G.; SOARES SOBRINHO, J.; SOUSA, C. N. A. de; BRAZ, A. J. B. P.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; SOUZA, M. A. de; FRONZA, V.; YAMANAKA, C. H. **BRS 254 - trigo melhorador: cultivar com alta qualidade industrial para a Região do Cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 19 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 228).
- ALMEIDA, A. B. de. **Identificação e caracterização de fontes de resistência à ferrugem da folha em *Triticum tauschii* Coss. Schmal**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH W.; MILLER W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANGRA, D. C. **Transferência da resistência à ferrugem da folha através de cruzamentos intergenéricos entre *Triticum aestivum* e *Agropyron elongatum***. 1995. 68 p. Tese (Mestrado em Fitomelhoramento) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- BACHEM, C. W. B.; HOEVEN, R. S.; BRUIJN, S. M. de; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R. G. F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 745-753, 1996.
- BAHRMAN, N.; NEGRONI, L.; JAMINON, O.; LE GOUIS, J. Wheat leaf proteome analysis using sequence data of proteins separated by two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 9, p. 2672-2684, 2004.
- BARCELLOS, A. L. **Genética de resistência de planta adulta à ferrugem da folha na cultivar brasileira de trigo Toropi (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. 1994. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BARCELLOS, A. L.; ROELFS, A. P.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Inheritance of adult plant leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar Toropi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 90-93, 2000.
- BERED, F. **Variabilidade genética em trigo hexaplóide estimada através de caracteres morfológicos, coeficiente de parentesco e RAPD**. 1999. 105 f. (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BEVAN, M.; BANCROFT, I.; MEWES, H. W.; MARTIENSSEN, R.; MCCOMBIE, R. Clearing a path through the jungle: progress in Arabidopsis genomics. **Bioessays**, Cambridge, v. 21, n. 2, p. 110-120, 1999.
- BJELLQVIST, B.; EK, K.; RIGHETTI, P. G.; GIANAZZA, E.; GÖRG, A.; WESTERMEIER, R.; POSTEL, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 317-339, 1982.
- 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.
- BRAMMER, S. P. **Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. Em Thell)**. 2000. 105 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BRAMMER, S. P.; FERNANDES, M. I. B.; BARCELLOS, A. L.; MILACH, S. C. K. Genetic analysis of adult-plant resistance to leaf rust in a double haploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell) population. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 432-436, 2004.
- BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 404 p.
- BRANLARD, G.; DARDEVET, M.; SACCOMANO, R.; LAGOUTTE, F.; GOURDON, J. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. **Euphytica**, Wageningen, v. 199, n. 1/2, p. 59-67, 2001.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; ISEPPON, M. B.; GUERRA, M. Molecular cytogenetic characterization of parental in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 2, p. 308-313, 2005.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; ZANATTA, A. C.; PRESTES, A. M.; FERNANDES, M. I. B.; GUERRA, M. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae - Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 505-510, 2003.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI,

E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.

CARDOSO, M. B. **Análises citogenéticas em linhagens sintéticas de *Triticum aestivum* (*T. durum* X *T. tauschii*) e seus cruzamentos com cultivares de trigo, visando à introgressão de resistências à ferrugem da folha**. 2007. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CHAUDHARY, H. K.; DHALIWAL, I.; SINGH, S.; SETHI, G. S. Genetics of androgenesis in winter and spring wheat genotypes. **Euphytica**, Wageningen, v. 13, n. 2, p. 311-319, 2003.

CHEN, G.; GHARIB, T. G.; HUANG, C. C.; TAYLOR, J. M.; MISEK, D. E. KARDIA, S. L.; GIORDANO, T. J.; IANNETTONI, M. D.; ORRINGER, M. B.; HANASH, S. M.; BEER, D. G. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. **Molecular and Cellular Proteomics**, Maryland, v. 1, n. 4, p. 304-313, 2002.

CHEN, X. M.; LINE, R. F.; LEUNG, H. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 3, p. 345-355, 1998.

CISTUÉ, L.; ROMAGOSA, I.; BATTLE, F.; ECHÁVARRI, B. Improvements in the production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, n. 5, p. 727-735, 2009.

CONSOLI, L.; DAMERVAL, C. Quantification of individual zein isoforms resolved by two-dimensional electrophoresis: genetic variability in 45 maize inbred lines. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, n. 14, p. 2983-2989, 2001.

DEVOS, K. M.; PITTAWAY, T. S.; REYNOLDS, A.; GALE, M. D. Comparative mapping reveals a complex relationship between the pearl millet genome and those of foxtail millet and rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 190-198, 2000.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F. C.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKA, Y. A. N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 9, p. 6025-6030, 1996.

DONNELLY, B. E.; MADDEN, R. D.; AYOUBI, P.; PORTER, D. R.; DILLWITTH, J. W. The wheat (*Triticum aestivum* L.)

leaf proteome. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 6, p. 1624-1633, 2005.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FEDAK, G.; CHEN, Q.; CONNER, R. L.; LAROCHE, A.; PETROSKI, R.; ARMSTRONG, K. W. Characterisation of wheat-*Thinopyrum partial* amphiploids by meiotic analysis and genomic *in situ* hybridization. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 4, p. 712-719, 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FIELD, J. M.; SHEWRY, P. R.; MIFLIN, B. J. Solubilization and characterization of wheat gluten proteins; correlations between the amount of aggregated proteins and baking quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 34, n. 4, p. 370-377, 1983.

FODOR, S. P.; RAVA, R. P.; HUANG, X. C.; PEASE, A. C.; HOLMES, C. P.; ADAMS, C. Multiplexed biochemical assays with biological chips. **Nature**, London, v. 364, n. 6437, p. 555-556, 1993.

FOLLING, L.; OLESEN, A. Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, n. 7, p. 629-636, 2001.

FRIEBE, B.; TULEEN, N.; JIANG, J.; GILL, B. S. Standard karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *T. aestivum*. **Genome**, Ottawa, v. 36, n. 4, p. 731-742, 1993.

FRIEBE, B.; ZELLER, F. J.; MUKAI, Y.; FORSTER, B. P.; BARTOS, P.; MCINTOSH, R. A. Characterization of rust-resistant wheat *Agropyron* intermedium derivatives by C banding, *in situ* hybridization and isozyme analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, n. 6/7, p. 775-782, 1992.

GILL, B. S.; APPELS, R.; BOTHA-OBERHOLSTER, A. M.; BUELL, R.; BENNETZEN, J. L.; CHALHOUB, B.; CHUMLEY, F.; DVORÁK, J.; IWANAGA, M.; KELLER, B.; LI, W.; MCCOMBIE, R.; OGIHARA, Y.; QUETIER, F.; SASAKI, T. A Workshop report on wheat genome sequencing: international genome research on wheat consortium. **Genetics**, Maryland, v. 168, n. 3, p. 1087-1096, 2004.

GILL, B. S.; FRIEBE, B.; ENDO, T. R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in

- wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, Ottawa, v. 34, n. 5, p. 830-839, 1991.
- GOFF, S. A. Rice as a model for cereal genomics. **Current Opinion Plant Biology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 86-89, 1999.
- GOFF, S. A.; RICKE, D.; LAN, T. H.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M.; GLAZEBROOK, J.; SESSIONS, A.; OELLER, P.; VARMA, H.; HADLEY, D.; HUTCHISON, D.; MARTIN, C.; KATAGIRI, F.; LANGE, B. M.; MOUGHAMER, T.; XIA, Y.; BUDWORTH, P.; ZHONG, J.; MIGUEL, T.; PASZKOWSKI, U.; ZHANG, S.; COLBERT, M.; SUN, W. L.; CHEN, L.; COOPER, B.; PARK, S.; WOOD, T. C.; MAO, L.; QUAIL, P.; WING, R.; DEAN, R.; YU, Y.; ZHARKIKH, S.; SHEN, R.; SAHASRABUDHE, S.; THOMAS, A.; CANNINGS, R.; GUTIN, A.; PRUSS, D.; REID, J.; TAVTIGIAN, S.; MITCHELL, J.; ELDREDGE, G.; SCHOLL, T.; MILLER, R. M.; BHATNAGAR, S.; ADEY, N.; RUBANO, T.; TUSNEEM, N.; ROBINSON, R.; FELDHAUS, J.; MACALMA, T.; OLIPHANT, A.; BRIGGS, S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*). **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 92-100, 2002.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.
- GRAS, P. W.; ANDERSSON, R. S.; KEENTOK, M.; BÉKES, F.; APPELS, R. Gluten protein functionality in wheat flour processing: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 52, n. 11/12, p. 1311-1323, 2001.
- GUERRA, M. Heterocromatina e bandeamento cromossômico. In: GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. p. 31-34.
- GUPTA, P. K.; MIR, R. R.; MOHAN, A.; KUMAR, J. Wheat genomics: present status and future prospects. **International Journal of Plant Genomics**, p. 1-36, 2008.
- GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; SHARMA, S.; SINGH, R.; KUMAR, N.; BALYAN, H. S. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 270, n. 4, p. 315-323, 2003.
- GYGI, S.; CORTHALS, G. L.; ZHANG, Y.; ROCHON, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 17, p. 9390-9395, 2000.
- GYGI, S.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, 1999.
- HASTEROK, R.; MARASEK, A.; DONNISON, I. S.; ARMSTEAD, I.; THOMAS, A.; KING, I. P.; WOLNY, E.; IDZIAK, D.; DRAPER, J.; JENKINS, G. Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence in situ hybridization. **Genetics**, Maryland, v. 173, n. 1, p. 349-362, 2006.
- HATTORI, J.; OUELLET, T.; TINKER, N. A. Wheat EST sequence assembly facilitates comparison of gene contents among plant species and discovery of novel genes. **Genome**, Ottawa, v. 48, n. 2, p. 197-206, 2005.
- HEDRICK, S. M.; COHEN, D. I.; NIELSEN, E. A.; DAVIS, M. M. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. **Nature**, London, v. 308, n. 5955, p. 149-153, 1984.
- HOLME, I. B.; OLESEN, A.; HANSEN, N.; ANDERSEN, S. B. Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. **Plant Breeding**, Berlin, v. 118, n. 2, p. 111-117, 1999.
- HU, T. C.; KASHA, K. J. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 8, p. 520-525, 1997.
- HU, T. C.; ZIAUDDIN, A.; SIMION, E.; KASHA, K. J. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined media. Effects of pretreatment, isolation methods, and hormones. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, Gaithersburg, v. 31, n. 1, p. 79-83, 1995.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, New York, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.
- HUBANK, M.; SCHATZ, D. G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 25, p. 5640-5648, 1994.
- IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. (1996). R: A language for data analysis and graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, Alexandria, v. 3, n. 5, p. 299-314, 1996.
- ISLAM, N.; TSUJIMOTO, H.; HIRANO, H. Proteome analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat: Towards understanding genome interaction in protein expression. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, n. 4, p. 549-557, 2003.
- JÄHNE, A.; LÖRZ, H. Cereal microspore culture. **Plant Science**, Limerick, v. 109, n. 1, p. 1-12, 1995.
- JAUHAR, P. P.; XU, S. S.; BAEZINGER, S. Haploidy in cultivated wheats: induction and utility in basic and applied research. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 3, p. 737-755, 2009.
- JIANG, J.; FRIEBE, B.; GILL, B. S. Recent advances in alien gene transfer in wheat. **Euphytica**, Wageningen, v. 73, n. 3, p. 199-212, 1994.
- JUNG, Y. H.; LEE, J. H.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R.;

- KIM, J. A.; SHIM, J. K.; LEE, S. K.; JEON, J. S.; KOH, H. J.; LEE, Y. H.; IWAHASHI, H.; JWA, N. S. The rice (*Oryza sativa*) Blast Lesion Mimic Mutant, blm, may confer resistance to blast pathogens by triggering multiple defense-associated signaling pathways. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 4, p. 397-406, 2005.
- JUNG, Y. H.; RAKWAL, R.; AGRAWAL, G. K.; SHIBATO, J.; KIM, J. A.; LEE, M. O.; CHOI, P. K.; JUNG, S. H.; KIM, S. H.; KOH, H. J.; YONEKURA, M.; IWAHASHI, H.; JWA, N. S. Differential expression of defense/stress-related marker proteins in leaves of a unique rice Blast Lesion Mimic mutant (blm). **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 5, n. 10, p. 2586-2598, 2006.
- KASHA, K. J.; KAO, K. N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Nature**, London, v. 288, n. 5274, p. 874-876, 1970.
- KASHA, K. J.; SIMION, E.; ORO, R.; YAO, Q. A.; HU, T. C.; CARLSON, A. R. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, n. 3, p. 379-385, 2001.
- KAWAURA, K.; MOCHIDA, K.; OGIHARA, Y. Expression profile of two storage-protein gene families in hexaploid wheat revealed by large-scale analysis of expressed sequence tags. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 139, n. 4, p. 1870-1880, 2005.
- KERSTEN, B.; AGRAWAL, G. K.; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. Plant phosphoproteomics: a long road ahead. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 20, p. 5517-5528, 2006.
- KIM, K. M.; BAENZIGER, P. S. A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Gaitheburg, v. 41, p. 22-27, 2005.
- KIM, S. T.; KIM, S. G.; HWANG, H.; KANG, S. W.; KIM, H. J.; LEE, B. H.; LEE, J. J.; KANG, K. Y. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 11, p. 3569-3578, 2004.
- KOSKI, L. B.; GRAY, M. W.; LANG, B. F.; BURGER, G. AutoFACT: an automatic functional annotation and classification tool. **BMC Bioinformatics**, London, v. 166, n. 1, p. 151, 2005.
- KOY, C.; MIKKAT, S.; RAPTAKIS, E.; SUTTON, C.; RESCH, M.; TANAKA, K.; GLOCKER, M. O. Matrix-assisted laser desorption/ionization-quadrupole ion trap-time of flight mass spectrometry sequencing resolves structures of unidentified peptides obtained by in-gel tryptic digestion of haptoglobin derivatives from human plasma proteomes. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, n. 6, p. 851-858, 2003.
- KRUCZKOWSKA, H.; PAWLOWSKA, H.; SKUCINSKA, B. Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v. 43, n. 3, p. 287-296, 2002.
- LABBANI, Z.; DE BUYSER, J.; PICARD, E. Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp *durum* cv. "Jenna Khetifa". **Plant Breeding**, Berlin, v. 126, n. 6, p. 565-568, 2007.
- LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D. L.; STAMOVA, B. S.; YOU, F. M.; LAZO, G. R.; BECKLES, D. M.; ANDERSON, O. D. Transcriptional profiling of wheat caryopsis development using cDNA microarrays. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 63, n. 5, p. 651-668, 2007.
- LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. Wheat x maize hybridization. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 28, n. 2, p. 313-316, 1986.
- LAZO, G. R.; CHAO, S.; HUMMEL, D. D.; EDWARDS, H.; CROSSMAN, C. C.; LUI, N.; MATTHEWS, D. E.; CAROLLO, V. L.; HANE, D. L.; YOU, F. M.; BUTLER, G. E.; MILLER, R. E.; CLOSE, T. J.; PENG, J. H.; LAPITAN, N. L. V.; GUSTAFSON, J. P.; QI, L. L.; ECHALIER, B.; GILL, B. S.; DILBIRLIGI, M.; RANDHAWA, H. S.; GILL, K. S.; GREENE, R. A.; SORRELLS, M. E.; AKHUNOV, E. D.; DVORÁK, J.; LINKIEWICZ, A. M.; DUBCOVSKY, J.; HOSSAIN, K. G.; KALAVACHARLA, V.; KIANIAN, S. F.; MAHMOUD, A. A.; MIFTAHUDIN, X. F. M.; CONLEY, E. J.; ANDERSON, J. A.; PATHAN, M. S.; NGUYEN, H. T.; MCGUIRE, P. E.; QUALSET, C. O.; ANDERSON, O. D. Development of an expressed sequence Tag (EST) resource for wheat (*Triticum aestivum* L.): EST generation, unigene analysis, probe selection and bioinformatics for a 16,000-locus bin-delineated map. **Genetics**, Maryland, v. 168, n. 2, p. 585-593, 2004.
- LEADER, D. J. Transcriptional analysis and functional genomics in wheat. **Journal of Cereal Science**, London, v. 41, n. 2, p. 149-163, 2005.
- LEISTER, D.; KURTH, J.; LAURIE, D. A.; YANO, M.; SASAKI, T.; DEVOS, K.; GRANER, A.; SCHULZE-LEFERT, P. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 1, p. 370-375, 1998.
- LI, H.; DEVAUX, P. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, n. 6, p. 475-481, 2001.
- LI, H.; DEVAUX, P. Isolated microspore culture overperforms anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 611-619, 2005.
- LIANG, R.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, n. 5072, p. 967-971, 1992.
- LIEVENS, S.; GOORMACHTIG, S. M. H. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back

- and looking forward. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 17, p. 3459-3468, 2001.
- LIPSHUTZ, R. J.; FODOR, S. P. A.; GINGERAS, T. R.; LOCKHART, D. J. High density synthetic oligonucleotide arrays. **Nature Genetics**, London, v. 1, p. 20-24, 1999. Suplemento.
- LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WRIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, Washington v. 259, n. 5097, p. 946-951, 1993.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a unicleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.
- LIU, W.; ZHENG, M.; POLLE, E.; KONZAK, C. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 686-692, 2002.
- LU, C. S.; SHARMA, H. C.; OHM, H. W. Wheat anther culture: effect of genotype and environmental conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 233-236, 1991.
- MAHMOOD, T.; JAN, A.; KAKISHIMA, M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of bacterial blight defense-responsive proteins in rice leaf blades. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 22, p. 6053-6065, 2006.
- McLELLAND, M.; MATHIEU-DAUDE, F.; WELSH, J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. **Trends in Genetics**, London, v. 11, n. 6, p. 242-246, 1995.
- McINTOSH, S.; WATSON, L.; BUNDOCK, P.; CRAWFORD, A.; WHITE, J.; CORDEIRO, G.; BARBARY, D.; ROOKE, L.; HENRY, R. SAGE of the developing wheat caryopsis. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 69-83, 2007.
- MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Ed. Autor, 1998. 140 p.
- MILACH, S. C. K.; SILVA, P. R.; SERAFIM, D. Novos marcadores na era do seqüenciamento de DNA. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 183-200.
- MORAES, A. P. **Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em Citrus e Poncirus**. 2007. 143 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- MORAES-FERNANDES, M. I. B. Citogenética. In: OSÓRIO, E. A. (Coord.). **Trigo no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1982. p. 95-144.
- MORAES-FERNANDES, M. I. B.; CAETANO, V. R.; SCHEEREN, P. L.; MOREIRA, J. C.; BRAMMER, S. P.; HAAS, J. C.; SILVA, S. A. Produção de linhagens duplo-haplóides e lançamento da cultivar BR 43 na Embrapa Trigo, através de seleção simultânea para capacidade androgenética e caracteres agronômicos. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 119-134.
- MORAES-FERNANDES, M. I. B.; ZANATTA, A. C.; PRESTES, A. M.; CAETANO, V. R.; BARCELLOS, A. L.; ANGRA, D. C.; PANDOLFI, V. Cytogenetics and immature embryo culture at Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease resistance from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). **Genetics and Molecular Biology**, Washington, v. 23, n. 3, p. 1051-1062, 2000.
- MOREL, J. B.; THARREAU, D.; NOTTÉGHM, J. L.; GUIDERDONI, E.; FERREIRA, M. E.; CAPDEVILLE, G.; SCAGLIUSI, S. M.; BONATO, A. L. V.; METHA, Y.; MACIEL, J. L.; SCHEEREN, P. L.; METHA, A.; CHAVES, M.; BRAMMER, S. Functional genomics of cross-species resistance to fungal diseases in rice and wheat (Cereal immunity). In: GENERATION CHALLENGE PROGRAMME CULTIVATING PLANT DIVERSITY FOR THE RESOURCE-POOR, 2007, Benoni. **Project mid-year and final reports: competitive and commissioned projects**. [S.l.]: Generation Challenge Programme, 2007. p. 30-37.
- MUKAY, Y. Perspectives in molecular cytogenetics of wheat. **Wheat Information Service**, n. 100, p. 17-31, 2005.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.
- OLESZCZUK, S.; SOWA, S.; ZIMNY, J. Androgenic response to preculture stress in microspore cultures of barley. **Protoplasma**, New York, v. 228, n. 1/3, p. 95-100, 2006.
- ORSHINSKY, B. R.; SADASIVAIAH, R. S. Effect of plant growth conditions, planting density, and genotype on anther culture response of soft white spring wheat hybrids. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 11, p. 758-762, 1997.
- PALMER, C. E.; KELLER, W. A. Overview of haploidy. In: PALMER, C. E., KELLER, W. A., KASHA, K. J. (Ed.). **Haploids in Crop Improvement II**. Berlin: Springer-Verlag, 2005. p.3-9.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.
- PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Molecular hybridization to radioactive DNA to the DNA of cytological

- preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 64, n. 2, p. 600-604, 1969.
- PARIDA, S. K.; RAJ KUMAR, K. A.; DALAL, V.; SINGH, N. K.; MOHAMMEDAPATRA, T. Unigene derived microsatellite markers for the cereal genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 5, p. 808-817, 2006.
- PATEL, M.; DARVEY N. L.; MARSHALL, D. R.; BERRY, J. O. Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 140, n. 3, p. 197-204, 2004.
- PAUX, E.; SOURDILLE, P.; SALSE, J.; SAINTENAC, C.; CHOLET, F.; LEROY, P.; KOROL, A.; MICHALAK, M.; KIANIAN, S.; SPIELMEYER, W.; LAGUDAH, E.; SOMERS, D.; KILIAN, A.; ALAUX, M.; VAUTRIN, S.; BERGÈS, H.; EVERSOL, K.; APPELS, R.; SAFAR, J.; SIMKOVA, H.; DOLEZEL, J.; BERNARD, M.; FEUILLET, C. A Physical map of the 1-Gigabase bread wheat chromosome 3B. **Science**, Washington, v. 322, n. 5898, p. 101-104, 2008.
- PAYNE, P. I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 38, p. 141-153, 1987.
- PEDROSA-HARAND, A.; GUERRA, M. Contribuições da Fish para a citogenética de plantas. In: GUERRA, M. **Fish: conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184 p.
- PEÑALOZA, A. D. P. S.; POZZOBON, M. T. Caracterização citogenética de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 309-342.
- PENG, J. H.; LAPITAN, N. L. V. Characterization of EST-derived microsatellites in the wheat genome and development of eSSR markers. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v. 5, n. 2, p. 80-96, 2005.
- POOLE, R.; BARKER, G.; WILSON, I. D.; COGHILL, J. A.; EDWARDS, K. J. Measuring global gene expression in polyploidy; a cautionary note from allohexaploid wheat. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 7, n. 3, p. 207-219, 2007.
- QUEVILLON, E.; SILVENTOINEN, V.; PILLAI, S.; HARTE, N.; MULDER, N.; APWEILER, R.; LOPEZ, R. InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 116-120, 2005.
- RAMPITSCH, C.; BYKOVA, N. V.; McCALLUM, B.; BEIMCIK, E.; ENS, W. Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 6, p. 1897-1907, 2006.
- RITALA, A.; MANNONEN, L.; OKSMAN-CALDENTY, K. Factors affecting the regeneration capacity of isolated barley microspores (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, n. 5, p. 403-407, 2001.
- RODRIGUES, L. R.; MARIATH, J. A.; ZANETTINI, M. H. Cultivo de anteras x cultivo de micrósporos isolados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 7, n. 33, p. 51-54, 2004.
- ROGATTO, S. R.; RAINHO, C. A. Citogenética molecular. In: ROGATTO, S. R. **Citogenética sem risco: biossegurança e garantia de qualidade**. São Paulo: FUNPEC, 2000. p. 134-152.
- ROSA, S. S. **Identificação e avaliação de variabilidade em cultivares e linhagens de trigo (*Triticum aestivum* L.) através de marcadores de AFLP e RAPD**. 2001. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- ROSSIGNOL, M.; PELTIER, J. B.; MOCK, H. P.; MATROS, A.; MALDONADO, A.M.; JORRIN, J. V. Plant proteome analysis: a 2004-2006 update. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 20, p. 5529-5548, 2006.
- SACCHET, A. M. O. F. Citogenética vegetal: instrumento de pesquisa e ponte como ensino médio e fundamental. In: SACCHET, A. M. O. F. (Org.). **Genética para que te quero?** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p. 87-95.
- SANTOS, K. E.; ZANETTINI, M. H. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 165-173, 2002.
- SETHI, G. S. Towards the introgression of rye genes into wheat. In: MUJEEB-KAZI, A.; SITCH, L. A. (Ed.). **Review of advances in plant biotechnology, 1985 – 1988**. Mexico: CIMMYT, 1989. p. 145-155.
- SHARIATPANAH, M.; BAL, U.; HEBERLE-BORS, E.; TOURAEV, A. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 127, n. 4, p. 519-534, 2006.
- SHARMA, H. C.; GILL, B. S. New hybrids between *Agropyron* and wheat. 2. Production, morphology and cytogenetic analysis of F1 hybrids and backcross derivatives. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 66, n. 2, p. 111-121, 1983.
- SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, 2002.
- SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; TATHAM, A. S.; POPINEAU, Y.; LAFIANDRA, D.; BELTON, P. S. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 45, p. 219-302, 2003.

- SILVA, P. R. da. **Identificação e conversão de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo**. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SILVA, P. R. da. **Identificação de marcadores e caracterização de mecanismos moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo**. 2006. 137 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SÓ E SILVA, M.; ALBRECHT, J. C.; CAIERÃO, E.; SCHEEREN, P.; SOBRINHO, J. S.; TRINDADE, M. G.; YAMANAKA, C. H.; FRONZA, V.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q.; NASCIMENTO JUNIOR, A. BRS 254 – Wheat cultivar for irrigated conditions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 96-98, 2008.
- SOMERS, D. J.; KIRKPATRICK, R.; MONIWA, M.; WALSH, A. Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. **Genome**, Ottawa, v. 46, n. 3, p. 431-437, 2003.
- SORRELLS, M. E.; LA ROTA, M.; BERMUDEZ-KANDIANIS, C.; GREENE, R. A.; KANTETY, R.; MUNKVOLD, J. D.; MAHMOUD, A.; MA, X.; GUSTAFSON, P. J.; QI, L. L.; ECHALIER, B.; GILL, B. S.; MATTHEWS, D. E.; LAZO, G. R.; CHAO, S.; ANDERSON, O. D.; EDWARDS, H.; LINKIEWICZ, A. M.; DUBCOVSKY, J.; AKHUNOV, E. D.; DVORAK, J.; ZHANG, D.; NGUYEN, H. T.; PENG, J.; LAPITAN, N. L. V.; GONZALEZ-HERNANDEZ, J. L.; ANDERSON, J. A.; HOSSAIN, K.; KALAVACHARLA, V.; KIANIAN, S. F.; CHOI, D. W.; CLOSE, T. J.; DILBIRLIGI, M.; GILL, K. S.; STEBER, C.; WALKER-SIMMONS, M. K.; McGUIRE, P. E.; QUALSET, C. O. Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. **Genome Research**, New York, v. 13, n. 8, p. 1818-1827, 2003.
- SPARKMAN, O. D. Mass spectrometry PittCon. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 16, n. 6, p. 967-976, 2005.
- SPICKETT, C. M.; PITT, A. R.; MORRICE, N.; KOLCH, W. Proteomic analysis of phosphorylation, oxidation and nitrosylation in signal transduction. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1764, n. 12, p. 1823-1841, 2006.
- SREENIVASULU, N.; RADCHUK, V.; STRICKERT, M.; MIERSCH, O.; WESCHKE, W.; WOBUS, U. Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling networks controlling programmed cell death and ABA-regulated maturation in developing barley seeds. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 310-327, 2006.
- TOHIDFAR, G.; MOHAMMADI, M.; GHAREYZAIE, B.; MOHAMMADI, S. A. Relationships between HMW-GS and breadmaking quality in advanced wheat lines. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v. 49, n. 1, p. 28-34, 2004.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPq, 1999. v. 2.
- USDA. **International Triticeae Mapping Initiative**. 1989. Disponível em: <http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/About_ITMI.html>. Acesso em: 13 nov. 2009.
- USDA. National Science Foundation. **Haplotype polymorphism in polyploid wheats and their diploid ancestors**. US NSF Plant Genome Research Project. 2006. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov/SNP/new/index.shtml>>. Acesso em: 13 nov. 2009.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A. SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.
- VARSHNEY, R. K.; HOISINGTON, D. A.; TYGI, A. K. Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 11, p. 490-499, 2006.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, n. 5235, p. 484-487, 1995.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; RIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.
- WARE, D.; JAISWAL, P.; NI, J.; PAN, X.; CHANG, K.; CLARK, K.; TEYTELMAN, L.; SCHMIDT, S.; ZHAO, W.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S.; STEIN, L. Gramene: a resource for comparative grass genomics. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 1103-1105, 2002.
- WELSH, J.; CHADA, K.; DALAI, S. S.; CHENG, R.; RALPH, D.; MCCLELLAND, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 19, p. 4965-4970, 1992.
- WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHREY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 14, n. 1, p. 61-65, 1996.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WINTER, P.; KAHL, G. Molecular marker technologies for plant improvement. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 438-448, 1995.

WITTMANN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H. R.; POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 17, p. 4688-4703, 2006.

YOUNG, L.; GANESHAN, S.; FOWLER, D. B.; CHIBBAR, R. N. cDNA AFLP profiling of low-temperature-induced transcripts in winter and spring wheats. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 11., 2008, Brisbane, Australia. Disponível em: <<http://www.fccpventions.com.au/IWGS>>.

YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G. K.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J.; SUN, J.; TANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, X.; LIN, W.; YE, C.; TONG, W.; CONG, L.; GENG, J.; HAN, Y.; LI, L.; LI, W.; HU, G.; HUANG, X.; LI, W.; LI, J.; LIU, Z.; LI, L.; LIU, J.; QI, Q.; LIU, J.; LI, L.; LI, T.; WANG, X.; LU, H.; WU, T.; ZHU, M.; NI, P.; HAN, H.; DONG, W.; REN, X.; FENG, X.; CUI, P.; LI, X.; WANG, H.; XU, X.; ZHAI, W.; XU, Z.; ZHANG, J.; HE, S.; ZHANG, J.; XU, J.; ZHANG, K.; ZHENG, X.; DONG, S.; ZENG, W.; TAO, L.; YE, J.; TAN, J.; REN, X.; CHEN, X.; HE, J.; LIU, D.; TIAN, W.; TIAN, C.; XIA, H.; BAO, Q.; LI, G.;

GAO, H.; CAO, T.; WANG, J.; ZHAO, W.; LI, P.; CHEN, W.; WANG, X.; ZHANG, Y.; HU, J.; WANG, J.; LIU, S.; YANG, J.; ZHANG, G.; XIONG, Y.; LI, Z.; MAO, L.; ZHOU, C.; ZHU, Z.; CHEN, R.; HAO, B.; ZHENG, W.; CHEN, S.; GUO, W.; LI, G.; LIU, S.; TAO, M.; WANG, J.; ZHU, L.; YUAN, L.; YANG, H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 79-92, 2002.

ZHANG, K. P.; ZHAO, L.; TIAN, J. C.; CHEN, G. F.; JIANG, X. L.; LIU, B. A genetic map constructed using a doubled haploid population derived from two elite Chinese common wheat varieties. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 50, p. 941-950, 2008.

ZHENG, M. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*): doubled haploid production via induced embryogenesis. **Plant, Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 73, n. 3, p. 213-230, 2003.

ZIAUDDIN, A.; MARSOLAIS, A.; SIMION, E.; KASHA, K. Improved plant-regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n. 10, p. 489-498, 1992.

ZIVY, M.; DE VIENNE, D. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, n. 5, p. 575-580, 2000.