

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

ALANA MADUREIRA

**FENOTIPAGEM E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
RESPOSTA A GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA EM TRIGO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2018

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

ALANA MADUREIRA

**FENOTIPAGEM E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
RESPOSTA A GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA EM TRIGO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2018

ALANA MADUREIRA

**FENOTIPAGEM E ANÁLISE DE EXPRESSÃO
GÊNICA EM RESPOSTA A GERMINAÇÃO
PRÉ-COLHEITA EM TRIGO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto

Coorientador: Prof. Dr. Giovani Benin

PATO BRANCO

2018

Madureira, Alana

**Fenotipagem e análise de expressão gênica em resposta a
germinação pré-colheita em trigo/Alana Madureira.**

Pato Branco. UTFPR, 2018

48 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto

Coorientador: Prof. Dr. Giovani Benin

**Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade
Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. Pato Branco,
2018.**

Bibliografia: f. 41 – 45

**1. Agronomia. 2. Triticum aestivum L. 3. *Primers*. 4. Extração de RNA.
5. PCR Semi-quantitativa I. Finatto, Taciane orient. II Benin, Giovani
coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de
Agronomia. IV Título.**

CDD: 630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias
Curso de Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC

**FENOTIPAGEM E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
RESPOSTA A GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA EM TRIGO**

por

ALANA MADUREIRA

Monografia apresentada às nove horas do dia vinte e sete de novembro de 2018 como requisito parcial para obtenção do título de ENGENHEIRA AGRÔNOMA, Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo-assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Giovani Benin
UTFPR

Me. Anderson Simionato Milioli
UTFPR

Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto
UTFPR
Orientadora

Prof. Dr. Jorge Jamhour
Coordenador do TCC

A "Ata de Defesa" e o decorrente "Termo de Aprovação" encontram-se assinados e devidamente depositados na Coordenação do Curso de Agronomia da UTFPR Câmpus Pato Branco-PR, conforme Norma aprovada pelo Colegiado de Curso.

Dedico a minha família, bem mais precioso que podemos possuir, pois tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a minha família, cuja jornada não seria possível sem o apoio especial de cada um.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e proteção e bênçãos durante o caminho percorrido.

Aos meus pais Luiz Carlos Madureira e Marilei de Fátima Peron Madureira, base da minha existência, cujo amor, apoio, e exemplo construíram um porto seguro tornando possível sair em busca dos sonhos e metas de minha vida. Pelos valores transmitidos, caráter, honestidade, humildade, educação, além do apoio emocional e financeiro. Vocês são meus exemplos, muito obrigada.

As minhas irmãs, Maira e Amanda, pelo apoio e inspiração para seguir em frente, obrigada pela compreensão. A toda minha família mesmo distante me proporcionando amparo necessário.

Aos meus amigos, irmãos encontrados pelos caminhos da vida, presentes nas alegrias e dificuldades nesta etapa que permanecerão para sempre, mesmo que a vida nos leve novamente a caminhos distantes uns dos outros.

As minhas amigas da república Velho Casarão a onde foram minha segunda família, Heliatrissy, Josiane, Maria, Manu, Ale, Sarha, Simone, obrigada por toda ajuda e compreensão durante o convívio na agradação.

Aos amigos companheiros de Iniciação Científica e grupo de Fitomelhoramento, Lucas, Ana Cláudia, Cátia, Diego, Samuel, Luiz H. Sassi, Anderson S. Milioli, Matheus Todeschini, Matheus Stoco, Thiago Duarte, Josiane Conte, Andrei, Rodrigo Zanella, Leomar G. Woyann, dentre outros tantos que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Agradeço a meus professores do Curso de Agronomia da UTFPR pelos conhecimentos e exemplos repassados. Em especial agradeço aos professores pela orientação e paciência na formação acadêmica, Giovani Benin e Taciane Finatto.

Agradecimento também a toda equipe que forma a UTFPR – Câmpus Pato Branco, fornecendo o suporte para o desenvolvimento profissional.

Por fim, um agradecimento especial a todas as pessoas que convivi não citadas neste curto agradecimento, pequeno para transmitir cinco anos de intenso aprendizado, companheirismo e desafios.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa.

RESUMO

MADUREIRA, Alana. Fenotipagem e Análise de Expressão Gênica em Resposta a Germinação Pré-colheita em Trigo. 48 f. TCC (Curso de Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um cereal de grande importância econômica, por ser matéria-prima de inúmeros produtos na indústria alimentícia. Um dos fatores que afetam negativamente a cultura em nível de campo é a germinação pré-colheita, reduzindo a produtividade e qualidade dos grãos, a ponto de reduzir seu valor comercial e inviabilizar a sua utilização para alimentação humana. Desta forma, este trabalho teve o objetivo de fenotipar e analisar a expressão do gene da enzima metiltransferase, em cultivares suscetíveis e resistentes, a fim de identificar alterações na expressão gênica que possam estar associadas aos maiores níveis de resistência. Para a fenotipagem foi conduzido um experimento em casa de vegetação, onde foram avaliadas quatro cultivares de trigo contrastantes quanto à resistência a germinação pré-colheita. O plantio foi realizado em vasos, em delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições. Na maturidade fisiológica (Z90), foi realizada a coleta das espigas para fenotipagem, sendo utilizadas duas metodologias: BRASIL (2009) e Nörnberg (2015), também foram coletadas espigas para as análises moleculares. A extração de RNA foi realizada de acordo com o método descrito por Zeng e Yang (2002). Em seguida, o RNA foi tratado com a enzima DNase, onde realizou-se a síntese de cDNA para utilização na análise de PCR semi-quantitativa. Foi analisada expressão do gene codificador da enzima Metiltransferase como alvo, e o gene codificador da Tubulina como referência. A magnitude de expressão de cada gene foi avaliada por meio de densitometria das bandas amplificadas em gel de agarose. Os resultados encontrados demonstraram que o método de espiga debulhada de, Nornberg et al. (2015) propiciou uma melhor diferenciação das cultivares, e pode ser considerado mais eficiente para a caracterização dos genótipos quanto a germinação pré-colheita. E a análise de expressão gênica sugere que a manutenção do DNA metilado pode ser um fator que contribui para a resistência a germinação na pré-colheita em trigo, pois as cultivares resistentes apresentam maior acúmulo de transcritos do gene codificador da metiltransferase.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* L. *Primers*. Extração de RNA. PCR-semi-quantitativa.

ABSTRACT

MADUREIRA, Alana. Phenotyping and Gene Expression Analysis in Response to Pre-Harvest Germination in Wheat. 48 f. TCC (Course of Agronomy) - Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2018.

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a cereal of great economic importance, since it is the raw material for many products in the food industry. One of the factors that negatively affect field-level culture is pre-harvest twinning, reducing grain yield and quality, to the point of reducing its commercial value and making it unfeasible for human consumption. In this way, this work aimed to phenotype and analyze the expression of the methyltransferase enzyme gene in susceptible and resistant cultivars, in order to identify alterations in gene expression that may be associated to higher levels of resistance. The experiment was conducted under greenhouse conditions. Four contrasting wheat cultivars were evaluated for resistance to preharvest germination. Planting was carried out in pots, in a randomized complete block design with three replications. In the physiological maturation stage (Z90), the harvests were harvested for phenotyping, using two methodologies: BRASIL (2009) and Nörnberg (2015), the collection of spikes was also performed for molecular analyzes. RNA extraction was performed according to the method described by Zeng and Yang (2002). Then, the RNA was treated with the enzyme DNase, where cDNA synthesis was performed for use in semi-quantitative PCR analysis. The target gene of the enzyme Methyltransferase, and the Tubulin gene as a reference, were analyzed. The magnitude of expression of each gene was evaluated by means of densitometry of the amplified bands. The results show the importance of the joint execution of the phenotyping method for an efficiency during the classification process of new cultivars with germination resistant genes in the pre-harvest, and the analysis of genetic expression suggests that the maintenance of the methylated DNA can be a factor that contributes to the resistance to germination in the pre-harvest in wheat, because the resistant cultivars present greater accumulation of transcripts of the gene encoding methyltransferase.

Keywords: *Triticum aestivum* L. *Primers*. RNA extraction. PCR-semi-quantitative

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Comparação de médias de métodos de fenotipagem para quatro cultivares de trigo contrastantes e expostas ao molhamento contínuo na maturidade fisiológica, submetidas a dois diferentes métodos de germinação. Letras minúsculas comparam as cultivares dentro de cada método. Letras Maiúsculas comparam a mesma cultivar entre os dois métodos testados. UTFPR, Campus Pato Branco, 2018.....33
- Figura 2 – Fenotipagem segundo o método de Nornberg et al. (2015) de quatro cultivares contrastantes a germinação pré-colheita. UTFPR, Campus Pato Branco, 2018.....34
- Figura 3 – Fenotipagem segundo o método de Brasil (2009) de quatro cultivares contrastantes a germinação pré-colheita. UTFPR, Campus Pato Branco, 2018.....35
- Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose, com iniciadores dos genes Metiltransferase e Tubulina, para as cultivares Frontana, BRS 207 e Jadeite 11. Marcador de peso molecular: 100bp DNA *Ladder* para o gene Metiltransferase e 1 Kbp DNA *Ladder* para o gene Tubulina. UTFPR, Campus Pato Branco, 2018.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação das cultivares avaliadas, empresa obtentora, genealogia e resposta a germinação pré-colheita. UTFPR, Campus Pato Branco-PR, 2018.....	24
Tabela 2 – Enzimas, localização do gene no genoma, iniciadores forward e reverse, loco do gene e tamanho do fragmento amplificado. UTFPR, Campus Pato Branco-PR, 2018.....	26
Tabela 3- Resumo da análise da variância (ANOVA) para o percentual de germinação de quatro cultivares de trigo submetidas a dois testes de germinação. UTFPR, Pato Branco, 2018.	31
Tabela 4 – Comparação de médias de quatro cultivares de trigo expostas ao molhamento contínuo na maturidade fisiológica, e submetidas a dois diferentes métodos de germinação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2018	33
Tabela 5 – Análise de variância de três cultivares de trigo expostas ao molhamento contínuo na maturidade fisiológica, para a expressão gênica dos genes Metiltransferase (MET) e Tubulina (TUB). UTFPR, Pato Branco-PR, 2018.....	36
Tabela 6 – Comparação de médias para expressão gênica dos genes Metiltransferase (MET) e Tubulina (TUB) de três cultivares de trigo expostas ao molhamento contínuo na maturidade fisiológica. UTFPR, Pato Branco-PR, 2018.....	37

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization
ONU	Organização das Nações Unidas
PR	Unidade da Federação – Paraná
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ANOVA	Análise de Variância
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNase I	Deoxyribonuclease I
GA	Giberelina
MET	Metiltransferase
N	Nitrogênio Líquido
PCR	Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RCBPTT	Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Transcriptase reversa
TUB	Tubulina
UTRS	<i>Untranslated regions</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Percentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1 Cultura do trigo.....	18
3.2 Germinação pré-colheita.....	18
3.3 Fenotipagem e seleção para germinação pré-colheita.....	21
3.4 Análise da expressão genica por meio de PCR semi-quantitativa.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Condução do experimento.....	24
4.2 Fenotipagem.....	25
4.3 Análises moleculares.....	25
4.3.1 Desenho dos iniciadores (<i>Primers</i>).....	26
4.4 Coleta de sementes para extração de RNA.....	27
4.5 Extrações e quantificações de RNA.....	27
4.6 Síntese de cDNA (DNA complementar).....	29
4.7 Análise de PCR Semi-quantitativa.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos cereais mais produzidos a nível mundial, e apresenta grande importância para a sustentabilidade de pequenos, médios e grandes produtores. A produção nacional situasse na faixa de 4,3 milhões de toneladas, e tem os estados do PR e RS como maiores produtores. Na última safra, a cultura ocupou uma área superior a 1,8 milhão de hectares na região Sul do Brasil, demonstrando ser uma das principais opções de cultivo de inverno (CONAB, 2018).

Um dos principais problemas relacionados à produção nacional de trigo e que afeta negativamente a cultura é a germinação pré-colheita, sendo responsável por perdas consideráveis de produtividade, qualidade e valor comercial dos grãos (RASUL et al., 2012). Os grãos germinados, ou em vias de germinar, apresentam atividades amilásicas elevadas, o que afeta negativamente a qualidade da farinha para a indústria de produtos alimentícios, a ponto de reduzir o valor comercial e/ou inviabilizar sua utilização (BIDDULPH et al., 2008; MARES; MRVA, 2008; KUMAR et al., 2009). A ocorrência de chuvas antes da colheita tem sido responsável por perdas consideráveis por germinação, e muitas regiões produtoras apresentam essa limitação. A ocorrência de germinação pré-colheita é influenciada por diversos fatores, como temperatura, duração e intensidade de chuvas, presença de genes de resistência, dormência, entre outros (BASSOI, 2004).

A expressão da dormência em cereais retarda o processo de germinação, e ocorre quando as sementes, morfologicamente maduras e sadias, não germinam quando expostas a condições adequadas de umidade, temperatura, luz e oxigênio (CABRAL et al., 2014). No entanto, a ausência de dormência pode resultar na germinação prematura das sementes, se estas forem expostas a condição de alta umidade na maturidade fisiológica.

Frente as limitações existentes, o desenvolvimento de cultivares que apresentem níveis mais elevados de resistência é desejável (GAO et al., 2013), sendo fundamental para redução de perdas em áreas onde esse problema é favorecido (DEPAUW et al., 2012). No entanto, vale destacar, que a germinação pré-colheita é uma característica complexa e fortemente influenciada pelo ambiente, e

que existem muitas limitações relacionadas à seleção fenotípica, e técnicas mais apuradas e precisas são necessárias para aumentar a eficiência na seleção (FRANCO et al., 2009). Neste sentido, análises de expressão gênica podem ser importantes ferramentas para utilização em programas de melhoramento, pois permitem identificar variações na expressão gênica de genótipos, e com isso, aumentar a eficiência na seleção.

A técnica de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semi-quantitativa, proporciona uma maneira rápida e confiável de quantificação de mRNA (REY et al., 2000), permitindo a identificação de genes de interesse e o estudo de suas relações com os processos celulares (CASASSOLA et al., 2013). Isso possibilita identificar genes que estão sendo ativados e/ou desativados, gerando informações para a utilização em programas de seleção assistida por marcadores moleculares.

Dentre os genes que relacionados ao processo de dormência, pode ser destacada a enzima metiltransferase. Esta enzima não está diretamente ligada a via de sinalização, mas pode atuar metilando sequências de DNA regulatórias de vários genes simultaneamente, evitando assim que o processo de germinação seja iniciado. Pois a metilação do DNA é um do mecanismo epigenético que regula a expressão gênica (LE et al., 2014). Neste sentido, a identificação de genes associados a germinação pré-colheita e sua utilização em programas de melhoramento, podem contribuir para a obtenção de genótipos com maiores níveis de resistência.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Fenotipar e analisar a expressão do gene metiltransferase, em cultivares de trigo suscetíveis e resistentes a germinação pré-colheita.

2.2 ESPECÍFICOS

Fenotipar quatro cultivares de trigo quanto a resistência a germinação pré-colheita, utilizando duas metodologias distintas.

Avaliar a expressão dos genes codificadores da enzima metiltransferase após 24 horas de molhamento, em cultivares de trigo contrastantes para germinação pré-colheita.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CULTURA DO TRIGO

A cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) é de fundamental importância para o sistema produtivo da região Sul do Brasil, por ser uma das principais opções de cultivo de inverno e por contribuir para o sistema de plantio direto. Na última safra, a área cultivada com trigo no Sul do Brasil superou 1,8 milhão de hectares, demonstrando a importância da cultura para os produtores da região.

No Brasil, a produtividade média da cultura situa-se na faixa de 2.706 kg ha⁻¹, resultando na produção total de 4,9 milhões de toneladas de grãos na safra 2018. No entanto, essa quantidade é insuficiente para atender a demanda nacional, que atualmente é de 12 milhões de toneladas (CONAB, 2018), o que torna o país um grande importador deste cereal.

Os grãos de trigo são utilizados para a produção de inúmeros produtos na indústria alimentícia, por apresentarem elevados teores de nutrientes, carboidratos, vitamina B, proteínas, zinco e fibra alimentar, além de possuírem baixos teores de gordura e açúcares (MARQUES, 2012). Essa composição permite que os grãos sejam componentes de uma ampla diversidade de produtos, não só na alimentação humana, mas também na alimentação animal como componente de rações.

3.2 GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA

Um dos principais problemas que afetam a produtividade e qualidade da cultura do trigo a nível de campo é a germinação pré-colheita, a ponto de reduzir seu valor comercial e inviabilizar a sua utilização na alimentação humana (RASUL et al., 2012). Esse problema está relacionado a vários fatores, principalmente ambientais, como temperatura, umidade e radiação. Além dos fatores ambientais,

fatores relacionados a características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, também possuem influência sobre a germinação pré-colheita (CUNHA, 2004).

A ocorrência da germinação antes da colheita, é observada em cultivares que apresentam período de dormência curto ou inexistente, associada a condições climáticas favoráveis à germinação, como elevada umidade no período de maturação dos grãos (REIS, 1989; FELICIO et al., 2002; VAN EEDEN e LABUSCHAGNE, 2012). Nestas condições, tem sido observadas reduções de 10 a 50% na produtividade de grãos (LUNN et al., 2001; FRANCO et al., 2009). Todas as regiões tritícolas da região Sul do Brasil estão sujeitas a ocorrência de elevada precipitação nos momentos que antecedem a colheita, o que ressalta a importância da identificação de genótipos com elevados níveis de resistência.

Segundo Vilani (2016), os fatores meteorológicos, como precipitação pluviométrica na maturação fisiológica, além dos efeitos de altas, e baixas temperaturas, especificamente no momento da floração e do enchimento de grãos, podem resultar em altas incidências de doenças na espiga, germinação na espiga, assim, podendo alterar diretamente a qualidade de semente e seu rendimento.

Após o estágio de maturação fisiológica, a semente entra em estado de quiescência, que caracteriza-se pelo baixo nível de atividades metabólicas (MIRANDA, 2006). Para que a semente inicie o processo germinativo, é necessário um estímulo, que pode ser através da reidratação, em que ocorre a embebição de água pelas células do embrião e endosperma. Assim, ocorre a liberação de enzimas e reativação de organelas celulares, macromoléculas, e metabolismo das substâncias de reserva, com geração de energia metabólica através do sistema citocromo, propiciando o crescimento e divisão da célula (MEREDITH; POMERANZ, 1985; POPINIGIS, 1985). Neste caso, a dormência das sementes é causada por um bloqueio situado na própria semente ou na unidade de dispersão, ao contrário da quiescência, que é provocada pela ausência ou insuficiência de um ou mais fatores externos necessários à germinação (MIRANDA, 2006).

A dormência é geneticamente programada para se desenvolver junto à semente, como parte integrante da maturação, concomitante com o desenvolvimento de outros processos, especialmente com o aumento da matéria seca e redução do teor de água (CASTRO et al., 2004). A expressão da dormência

nos cereais ocorre quando as sementes, morfológicamente maduras e sadias, não germinam quando expostas a condições adequadas de umidade, temperatura, luz e oxigênio (HILHORST, 1995; CASTRO et al., 2004). A resistência à germinação pré-colheita, como consequência da dormência das sementes, é regulada pela concentração relativa de ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA) na semente. A presença de ABA inibe a síntese de enzimas hidrolíticas que são fundamentais para a hidrólise das reservas armazenadas, atuando de forma a inibir o processo de transcrição dos genes que são induzidos por GA, promovendo o estado de dormência. A superação desta dormência ocorre quando há redução na concentração de ABA em relação à GA (MARES, 1993; GONZALEZ-GUZMAN et al., 2002).

Muitos genes estão envolvidos e controlam a expressão da dormência nas sementes, sendo esta considerada uma característica complexa (LI; FOLEY, 1997; GUBLER et al., 2005). Além do elevado número de genes envolvidos, a resistência à germinação pré-colheita é dependente da região de cultivo e das interações dos genótipos com o ambiente (KING, 1993a; ANDERSON et al. 1993; FLINTHAM, 2000; FLINTHAM et al., 2002; BASSOI et al., 2006). A maturação de grãos sob condições de baixa temperatura condiciona maior nível de dormência do que grãos sob condições de alta temperatura (REDDY et al., 1985). Resultado similar foi observado por Mares (1993) que verificou maior dormência em cultivares expostas a regime de temperatura de 26,5 °C/8,5 °C em relação a aquelas expostas a 35,6 °C/17,5 °C. O que dificulta a avaliação e seleção fenotípica deste caractere. Neste sentido, a adoção de técnicas mais apuradas e precisas se tornam necessárias para aumentar a eficiência na seleção.

Estudos tem relatado que o gene codificador da enzima metiltransferase está associado com a germinação pré-colheita em trigo, e estas pesquisas têm ressaltado sobre a importância do estudo do gene codificador da enzima responsável pela metilação do DNA, e que interfere no processo do estímulo à geminação (OGÉ et al., 2008 e LI et al., 2008). Neste processo, a enzima metiltransferase catalisa a transferência de um grupo metil para uma molécula aceptora, como o DNA (SINGH, 2013). Frente as limitações existentes, a resistência a germinação pré-colheita têm sido uma característica cada vez mais buscada pelos

programas de melhoramento de trigo, visando a manutenção da produtividade e qualidade industrial dos grãos, e a aplicação de técnicas mais eficientes para a seleção de genótipos resistentes são necessárias.

3.3 FENOTIPAGEM E SELEÇÃO PARA GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA

A caracterização de genótipos quanto a resposta à germinação pré-colheita, pode ser realizada com o uso de diversas metodologias, incluindo simuladores de chuva (McMASTER; DERERA, 1976), germinadores com elevada umidade (WEILENMANN, 1976), simuladores de chuva associados a câmaras de germinação (CLARKE, 1983), e métodos de imersão de espigas em água com posterior acondicionamento em germinadores (REIS; CARVALHO, 1989). E para a avaliação posterior dos genótipos, pode-se utilizar escalas de notas (McMASTER e DERERA, 1976), espectrofotometria para determinação da atividade da enzima alfa-amilase (MARES, 1983), e o índice de queda ou "*Falling Number*" (ROSA, 1999). Dentre estas metodologias, as mais utilizadas são os simuladores de chuva e o número de queda ou "*Falling Number*".

Existem vários outros métodos para identificação da germinação na espiga, e dentre eles pode-se citar a avaliação visual com a determinação da quantidade de grãos germinados. Segundo Okuyama (2013), a percentagem de grãos germinados possibilita uma melhor classificação dos genótipos para resistência a germinação pré-colheita.

Já o número de queda ou "*Falling Number*", é um método utilizado pelas indústrias e moinhos, para quantificar os danos ocasionados pela germinação pré-colheita. Este método mensura indiretamente a atividade da enzima α -amilase, que representa a expressão bioquímica da germinação na espiga (FINNEY, 1985).

Entretanto, existem outros métodos menos conhecidos, como o método de viscosímetros como a amilografia e o *Rapid Visco Analyser – RVA*. A amilografia é um teste realizado no amilógrafo *Brabender*, utilizado para a determinação do efeito da α -amilase, e método de *Rapid Visco Analyser – RVA* é baseado na capacidade da enzima α -amilase em liquefazer um gel de amido. A atividade da enzima é medida com a agitação de uma suspensão por três minutos

até a liquefação (GUARIENTI; MIRANDA, 2004). No entanto, apesar dos diferentes métodos atualmente disponíveis para a caracterização fenotípica, técnicas mais eficientes são necessárias como as análises de expressão gênica, que são utilizadas para a identificação de genes de interferência no processo de germinação pré-colheita.

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GENICA POR MEIO DE PCR SEMI-QUANTITATIVA

A expressão gênica é o primeiro estágio de um processo que decodifica a informação contida no DNA de uma célula (BRAVIM, 2013). O processo inicia com a transcrição do gene, que dá origem a uma molécula intermediária, o *mRNA*. A informação transmitida do DNA cromossomal para o *mRNA* migra para o citoplasma, onde se encontra a maquinaria de síntese proteica, que traduz a informação contida no mRNA em proteínas (SAIKI et al., 1988).

A expressão de um gene na célula pode ser medida pelo número de cópias de um transcrito de mRNA. Para detectar e quantificar a expressão gênica de pequenas quantidades de RNA, a amplificação dos genes transcritos é necessária. Para isso, são utilizadas algumas técnicas, e dentre elas está a PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica foi desenvolvida em 1983 por Kary Mullis, e consiste na amplificação de sequências específicas de DNA *in vitro*. É um método utilizado para isolar rapidamente sequências específicas de DNA a partir da amplificação enzimática de dois oligonucleotídeos (*primers* ou iniciadores), que hibridam com fitas complementares de uma sequência de DNA molde (GRIFFITHS et al., 2009).

A partir da técnica convencional de PCR, foi desenvolvida a técnica de qRT-PCR (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*), que permite a quantificação da expressão dos genes avaliados em tempo real, apresentando um maior grau de sensibilidade comparativamente a PCR convencional (MONZÓN, 2015). Neste caso, a quantificação da expressão dos genes é feita de forma relativa, isto é, pela comparação da expressão entre um grupo exposto a um estímulo e outro não exposto, denominado de grupo controle (Zarlenga; Higgins, 2001). Outra técnica utilizada na análise de expressão gênica é a de microarranjos, onde é possível avaliar o nível de expressão de vários genes simultaneamente (ROSA, 2007).

Além das técnicas de análise de expressão gênica citadas anteriormente, existe também a técnica de RT-PCR semi-quantitativa, em que a amplificação do gene de interesse é realizada simultaneamente com um gene controle, sendo possível realizar a comparação entre ambos e com isso avaliar a expressão do gene estudado. Diversos autores têm utilizado esta técnica e relatam a obtenção de resultados positivos. Marone (2001) cita que as análises de expressão gênica através da técnica de RT-PCR semi-quantitativa fornecem informações confiáveis para avaliar os níveis de expressão gênica. Em um estudo recente com a cultura de feijão-caupi, Silva (2011) estudando a expressão gênica induzida por estresse abiótico sobre nódulos, observaram indução de genes pertencentes a diferentes categorias funcionais, como os da biossíntese do ácido abscísico. Os resultados do trabalho mostraram ainda expressão de genes em processos relacionados à proteção dos nódulos ao estresse abiótico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Pato Branco-PR, situada a 26°11'S e 52°40'W, a 700 metros de altitude. Foram utilizadas quatro cultivares de trigo, de diferentes empresas obtentoras e épocas de lançamento, contrastantes quanto à resistência a germinação pré-colheita (Tabela 1).

Tabela 1 – Identificação das cultivares avaliadas, empresa obtentora, genealogia e resposta a germinação pré-colheita. UTFPR, Campus Pato Branco-PR, 2018..

Cultivares	Empresa obtentora	Genealogia	Resposta à germinação pré-colheita	Ano de Lançamento
Taurum	OR Sementes	BB/NAC/VEE/3/BJY/COC	Suscetível	1998
BRS 207	Embrapa	SERI 82/PF 813	Suscetível	1999
Frontana	Iwar Beckman	Fronteira / Mentana	Resistente	1940
Jadeíte 11	OR Sementes	Campo Real/Vanguarda // Ônix	Resistente	2012

A semeadura foi realizada em vasos, em delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições. Cada unidade experimental foi composta por um vaso de 20L (30 x 35 cm). Foram utilizadas três épocas de semeadura, com intervalo de 20 dias entre épocas, com intuito de permitir a maturação escalonada dos genótipos para a aplicação dos tratamentos. O solo utilizado é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico Típico, que foi homogeneizado, peneirado e corrigido antes do plantio. Foram semeadas 40 sementes por unidade experimental, e posteriormente, realizado o raleio para 34 plantas, resultando na densidade de 350 plantas m⁻². A adubação de base (NPK) foi realizada de acordo com a análise de solo, e foram realizadas duas aplicações de nitrogênio em cobertura, na forma de ureia diluída, nos estádios Z2.2 e Z3.9 (ZADOKS et al., 1974), na dose de 50 kg N ha⁻¹. Os tratos culturais para o controle de pragas e doenças, foram realizados de acordo com as recomendações técnicas para a cultura (RCBPTT, 2017).

4.2 FENOTIPAGEM

Para a fenotipagem, foram utilizados dois métodos, um método com espiga inteira (NÖRNBERG et al., 2015) e outro com espiga debulhada (BRASIL, 2009). A coleta das espigas foi realizada quando as plantas atingiram a maturidade fisiológica (Z90) (ZADOKS et al., 1974).

Para o método de Nornberg et al. (2015), foi realizada a coleta de nove espigas por cultivar, correspondendo a três espigas por repetição. Após coletadas, as espigas foram submersas em água destilada pelo período de 18 horas, sendo em seguida envolvidas em papel germitest umedecido, e mantidas em câmara de germinação a 24 °C e 100% de umidade durante sete dias. Após este período, foi realizada a contagem das sementes germinadas, sendo obtidas as percentagens de germinação para cada cultivar.

Para o método de BRASIL (2009), também foi realizada a coleta de nove espigas por cultivar, correspondendo a três espigas por repetição. As espigas foram debulhadas e as sementes foram distribuídas em caixas de poliestireno transparente (11 x 11 x 3,5 cm), sobre duas camadas de papel germitest previamente umedecidas com água destilada. Posteriormente, as sementes foram colocadas para germinar em câmara de germinação a 24 °C e 100% de umidade, pelo período de quatro dias. Após o período citado, foi realizada a contagem de sementes germinadas, sendo obtidas as percentagens de germinação para cada cultivar.

A percentagem de germinação total para ambos os métodos, foi obtida pela análise do índice de germinação de cada repetição, e posteriormente obtida a percentagem média de germinação para cada cultivar. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e quando verificada significância, foi realizado o teste de comparação de médias de Tukey, a nível de 5 % de probabilidade de erro. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico WinStat (MACHADO:CONCEIÇÃO, 2003).

4.3 ANÁLISES MOLECULARES

4.3.1 DESENHO DOS INICIADORES (*PRIMERS*).

Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências transcritas depositadas no banco de dados *Phytozome* v11.0 (GOODSTEIN et al., 2012). Foram desenhados iniciadores para o gene alvo codificador da enzima metiltransferase (MET), e para o gene referência da Tubulina (TUB).

Para o desenho dos iniciadores, foi utilizado o programa computacional Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007). Foram considerados tamanhos de amplicons variando entre 200 e 400 bases, iniciadores de 20 nucleotídeos, e temperatura de anelamento de 60 °C. Para os genes alvo que ainda não tinham sido depositados no banco de dados do trigo no *Phytozome*, foi realizada a busca pelas sequências de aminoácidos no banco de dados do arroz (*Oryza sativa*). Esta espécie foi escolhida por ser uma gramínea similar ao trigo, e por apresentar seu genoma sequenciado com notação gênica avançada. Após identificadas as sequências de aminoácidos dos genes alvo em arroz, estas foram alinhadas contra as sequências depositadas no banco de dados do genoma do trigo no *Phytozome* v11.0. Para isso, foi utilizada a ferramenta tBLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), que realiza um alinhamento local de sequências de aminoácidos contra um banco de dados de nucleotídeos traduzidos (ALTSCHUL et al., 1990). Foram selecionadas as sequências homólogas em trigo, que apresentavam cobertura maior que 55% e e-values menores que e-10.

Tabela 2 – Enzimas, localização do gene no genoma, iniciadores *forward* e *reverse*, loco do gene e tamanho do fragmento amplificado. UTFPR, Campus Pato Branco-PR, 2018.

<i>Enzimas</i>	<i>Localização do gene no genoma</i>	<i>Iniciadores Forward e Reverse</i>	<i>Loco do Gene</i>	<i>Tamanho do Fragmento Amplificado (pb²)</i>
Metiltransferase (MET)	Cromossomo 7 D	ATTATGTGCGGCCAAAATTC	(Traes_7DS_996B0734B),	230
Metiltransferase (MET)	Cromossomo 7 D	GCCTTCAAGTCCACTCTTGC	(Traes_7DS_996B0734B),	230
Tubulina (TUB)	Cromossomo 6 A	ATACGGTCGTCCTGCTGTCT	(Traes_6AS_FAFAAF12)	234
Tubulina (TUB)	Cromossomo 6 A	GTATCAAGTCGCCACAGT	(Traes_6AS_FAFAAF12)	234

Buscou-se selecionar iniciadores que amplificavam regiões contendo *untranslated regions* (UTRs), aumentando com isso a probabilidade dos iniciadores serem únicos e amplificarem somente as regiões de interesse. Após o desenho dos iniciadores, foi utilizada a ferramenta BLAST para alinhar as sequências de

nucleotídeos desenhados com as sequências transcritas dos genes alvo, com o intuito de confirmar a posições dos iniciadores *forward* e *reverse* (Tabela 2).

4.4 COLETA DE SEMENTES PARA EXTRAÇÃO DE RNA

Quando as plantas atingiram a maturidade fisiológica (Z90), foi realizada a coleta das espigas. As mesmas foram debulhadas e as sementes distribuídas em caixas de poliestireno transparente (11 x 11 x 3,5 cm) sobre duas camadas de papel germitest, previamente umedecidas com água destilada. As sementes foram colocadas para germinar em câmara de germinação a 24 °C e 100% de umidade. Foi realizada a coleta de sementes secas (tratamento controle – T1) e 24 horas após o molhamento, que correspondem ao tratamento T2. Após coletadas, as sementes foram identificadas, acondicionadas em papel-alumínio, congeladas em N líquido, e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até o momento da extração de RNA.

4.5 EXTRAÇÕES E QUANTIFICAÇÕES DE RNA

As extrações de RNA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Bioquímica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco-PR. Para as extrações, foi utilizado o método do Zeng e Yang (2002).

Todos os materiais utilizados nas extrações (almofarizes, pistilos, espátulas, etc), foram tratados previamente com água DEPC 0,1% para evitar contaminações. As ponteiras e soluções utilizadas foram previamente autoclavadas a 120 °C (1atm) por 30 minutos, e as bancadas, pipetas e cubas, foram higienizadas com álcool 70% antes do uso.

Para as extrações, primeiramente foi pré-aquecido 15 mL de tampão de extração (CTAB 2%, PVP40 2%, 2 M NaCl, 25 mM EDTA, 300 mM Tris-HCl pH 8,0 e água qsp 15mL) em banho maria a 65 °C por 60 minutos. Antes do uso, foi adicionado 2% de β -mercaptoetanol ao tampão. As sementes previamente coletadas

e armazenadas a -80 °C, foram maceradas em N líquido utilizando almofariz e pistilo, até a formação de um pó fino. Posteriormente, foi transferido aproximadamente 100 mg do pó ainda congelado para um microtubo de 2 mL, contendo 750 µL de tampão de extração pré-aquecido.

As amostras foram imediatamente homogeneizadas com auxílio de vórtex, sendo posteriormente incubadas em banho maria a 65 °C por 10 minutos. Após esse período, foi adicionado na amostra 750 µL de solução de CIA (clorofórmio: álcoolisoamílico 24:1), e homogeneizado vigorosamente em vórtex por 10 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, re-extraído com igual volume de CIA, homogeneizado vigorosamente, e centrifugado novamente a 10000 g por 15 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, e as amostras foram centrifugadas a 29000 g por 20 minutos a 4°C, para peletar o material insolúvel. O sobrenadante foi então transferido novamente para um novo microtubo de 1,5 mL, sendo adicionados 0,6 volumes de isopropanol e 0,1 volumes de NaOAc 3M, agitados em vórtex e incubados por 25 minutos a -80 °C.

Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação a 29000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" de RNA foi ressuspensionado em 100µL de TE e 25µL de solução de precipitação de LiCl. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, e acondicionadas em geladeira a 4°C (overnight) para promover a precipitação do RNA.

Após 12 horas, as amostras foram centrifugadas novamente a 29000 g por 45 min a 4 °C. O pellet de RNA foi lavado três vezes com etanol 75%, e permaneceu em câmara de fluxo laminar por 20 minutos para evaporação do etanol restante. Depois de seco, o pellet foi ressuspensionado em 20µL de TE, sendo então adicionando 1 µL de inibidor de RNase (40 U/µL) à amostra.

As quantificações das amostras de RNA total foram realizadas em espectrofotômetro, a partir de leituras de absorbância a 260 e 280nm. Com base na absorbância obtida, foi realizado o cálculo da concentração de RNA total em ng/µL. A integridade do RNA extraído foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1,0

%, e as bandas do RNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas em equipamento de fotodocumentação.

4.6 SÍNTESE DE CDNA (DNA COMPLEMENTAR)

Inicialmente, o RNA extraído foi tratado com a enzima Dnase I (Amplification Grade Dnase I, Invitrogen™) para eliminação do DNA presente na amostra. Para isso, foram diluídos 2 µg de RNA em água ultrapura (q.s.p 7 µL), sendo então adicionado 1µL de buffer 10x e 2µL de DNase I a solução, homogeneizado gentilmente e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente (24 °C). Em seguida, foi adicionado 1µL de Stop Solution, e incubado em banho maria a 70 °C por 10 minutos, com o intuito de inibir a atividade da enzima DNase I.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, foram utilizados os 11µL da solução contendo o RNA tratado com a enzima DNase I. Foi realizada a transcrição reversa com a enzima transcriptase reversa (RT), e com o uso do iniciador Oligo dT (Invitrogen), sendo a fita de cDNA sintetizada a partir cauda poli-A da molécula de mRNA. Foram adicionados em um microtubo livre de RNase, os 11µL da solução contendo o RNA tratado com DNase I, 1,2 µL de dNTPs (concentração de 10mM), e 1,2 µL do iniciador Oligo dT. A solução foi homogeneizada e incubada a 70 °C por 10 minutos, sendo posteriormente, mantida em gelo seco por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado à solução 4,6 µL de buffer RT5x, agitado gentilmente e incubado a 50 °C por 2 minutos. Ao final do processo, foi adicionado 1,2 µL da enzima RT-MMLV e incubado a 50 °C por 50 minutos.

4.7 ANÁLISE DE PCR SEMI-QUANTITATIVA

Após a síntese do cDNA, foi realizada a análise de RT-PCR semi-quantitativa. As reações foram realizadas em termociclador, e para cada amostra foram utilizados: 1,25 µL de tampão da enzima (20mM Tris-HCl pH8.0), 0,375 µL de MgCl₂, 1,25 µL dos *primers forward e reverse* (concentração de 10mM), 0,25 µL de solução contendo os desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP- concentração

de 10 mM), 3,2 µL de cDNA, 0,125 µL da enzima Taq DNA Polimerase, e água ultrapura q.s.p. 12,5 µL.

As reações foram acompanhadas de um controle de contaminação, ausente de material genético, e o número de ciclos foi calculado de modo que a reação termine antes de atingir a fase platô, evitando assim falsa análise. Para a amplificação dos genes em termociclador, o mesmo foi programado com as seguintes etapas:

- 1ª Etapa – Desnaturação inicial: 95 °C por 3 minutos (1 ciclo);
- 2ª Etapa – Desnaturação: 95 °C por 45 segundos; Anelamento dos *primers*: 57 °C por 1 minuto; Extensão: 72 °C por 1 minuto (40 ciclos);
- 3ª Etapa – Extensão final: 72 °C por 10 minutos (1 ciclo).

Após a amplificação, os produtos finais foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, pelo período de duas horas a 80 volts. Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação.

A magnitude de expressão de cada gene foi avaliada por meio de densitometria das bandas amplificadas, a partir da utilização do software ImageJ-Fiji, desenvolvido por Wayne Rasband (2013). A expressão relativa foi obtida por: densidade da banda do gene alvo / densidade da banda do gene referência. Posteriormente, procedeu-se a análise da variância e comparação de médias pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade de erro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 RESULTADOS ANÁLISE DE FENOTIPAGEM

A partir da análise da variância (ANOVA), foi observada significância ($p < 0,01$) para a efeito de genótipo, método de fenotipagem e interação genótipo X método (Tabela 3), indicando que as cultivares e métodos de análise apresentam diferenças em relação a característica avaliada. O coeficiente de variação foi de 12,42%, caracterizando baixa magnitude, indicando elevada precisão experimental e confiabilidade nas interferências testadas.

Tabela 3- Resumo da análise da variância (ANOVA) para o percentual de germinação de quatro cultivares de trigo submetidas a dois testes de germinação. UTFPR, Pato Branco, 2018.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO
Genótipos	3	1346,03**
Método	1	204,75*
Genótipo X Método	3	1346,03**
Resíduo	14	13,58
Total	21	-
Média		29,67
CV (%)		12,42

*,.: significativo a 1 ($p < 0,01$) e 5% ($p < 0,05$) de probabilidade de erro pelo teste F. FV: Fontes de variação. GL: Graus de Liberdade. CV(%) coeficiente de variação.

Na tabela 4 e Figura 1, estão apresentados os resultados da análise de comparação de médias das cultivares, para os dois testes de germinação realizados. Pode ser observado que, no método da espiga inteira, a cultivar Frontana se destacou com a menor porcentagem de grãos germinados com valor de 0,33%, mas não diferindo-se estatisticamente das cultivares Jadeíte 11 e Taurum.

Entretanto, para o método de Brasil, a cultivar Frontana apresentou valores de 0,66% de germinação, diferindo estatisticamente das demais cultivares avaliadas, corroborando com os dados informados pelo obtentor, que a classifica está cultivar como altamente resistente a geminação pré-colheita. Segundo Franco (2009), a cultivar Frontana caracteriza-se como uma importante fonte de

introgressão de genes para conferir dormência aos genótipos, sendo o genótipo com o maior potencial para utilização no melhoramento genético em relação à resposta a germinação na pré-colheita. Outras pesquisas também classificaram a mesma como sendo uma cultivar de grande importância como fonte de resistência a germinação pré-colheita, e ao degrane natural (SOUZA, 1995).

Para ambos os métodos, a cultivar BRS 207 apresentou as maiores percentagens de germinação, com valores de 99% no método de Nomberg (2015) e 65,33% no método de Brasil (2009), confirmando a sua alta suscetibilidade a germinação pré-colheita, e corroborando com os dados apresentados pela empresa obtentora (RCBPTT, 2016).

Em estudo realizado por Castro (2015), com cultivares consideradas referências de suscetibilidade à germinação, os autores obtiveram resultados de germinação para cultivar BRS Louro de 76,1% e para cultivar BRS 328 de 89,6%, corroborando assim com resultados obtidos para a cultivar BRS 207 no presente trabalho.

Em relação a cultivar Taurum, esta apresentou resultado diferente para os dois métodos testados. No método de espiga inteira se destaca como sendo resistente à germinação. Porém, no método de espiga debulhada, apresenta elevado índice de germinação. Assim, o comportamento da cultivar Taurum em relação ao teste de fenotipagem com a espiga inteira se contrapõe com os dados obtidos pela empresa obtentora (RCBPT, 2016). Resultado semelhante foi obtido para a cultivar Jadeite 11, que no método de espiga inteira se destacou como resistente, mas no método de espiga debulhada foi classificada como suscetível, divergindo em relação a classificação apresentada pela empresa obtentora.

Estudos realizados por Gavazza (2010), analisando a percentagem de germinação em trigo com grãos retirados da espiga e grãos na espiga, também foram observadas diferenças entre os métodos para as cultivares BRS Pardela e BRS 220, que são consideradas suscetíveis, mas que apresentaram resistência no método de grão retirado da espiga, situação semelhante a ocorrida com a cultivar Taurum.

Esse fato pode estar relacionado às características do tegumento, que pode ter dificultado a absorção de água (KIGEL; GALILI, 1995; HILROST, 1995;

MARCOS FILHO, 2005), ou ainda, conter substâncias inibidoras do processo germinativo (KING; WETTSTEIN-KNOWLES, 2000), que podem impedir momentaneamente a germinação de alguns materiais (MARCOS FILHO, 2005).

No entanto, Gavazza (2010) descreve que o teste com o grão debulhado não possibilita a distinção segura dos dados obtidos quanto a germinação precoce. Portanto, em relação aos diferentes métodos testados, foram observadas respostas diferenciadas para cada cultivar, com exceção a cultivar Frontana que manteve o mesmo padrão de resistência.

Tabela 4 – Comparação de médias de quatro cultivares de trigo expostas ao molhamento contínuo na maturidade fisiológica, e submetidas a dois diferentes métodos de germinação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2018 .

GENÓTIPO	ESPIGA INTEIRA (Nornberg)	ESPIGA DEBULHADA (Brasil)
BRS 207	99 aA	65,33 aB
Taurum	5,93 bB	27,66 cA
Jadeite 11	1,7 bB	36,66 bA
Frontana	0,33 bA	0,66 dA

**Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras Maiúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade comparando os métodos de germinação.

Figura 1 – Comparação de médias de métodos de fenotipagem para quatro cultivares de trigo contrastantes e expostas ao molhamento contínuo na maturidade fisiológica, submetidas a dois diferentes métodos de germinação. Letras minúsculas comparam as cultivares dentro de cada método. Letras Maiúsculas comparam a mesma cultivar entre os dois métodos testados. UTFPR, Campus Pato Branco, 2018.

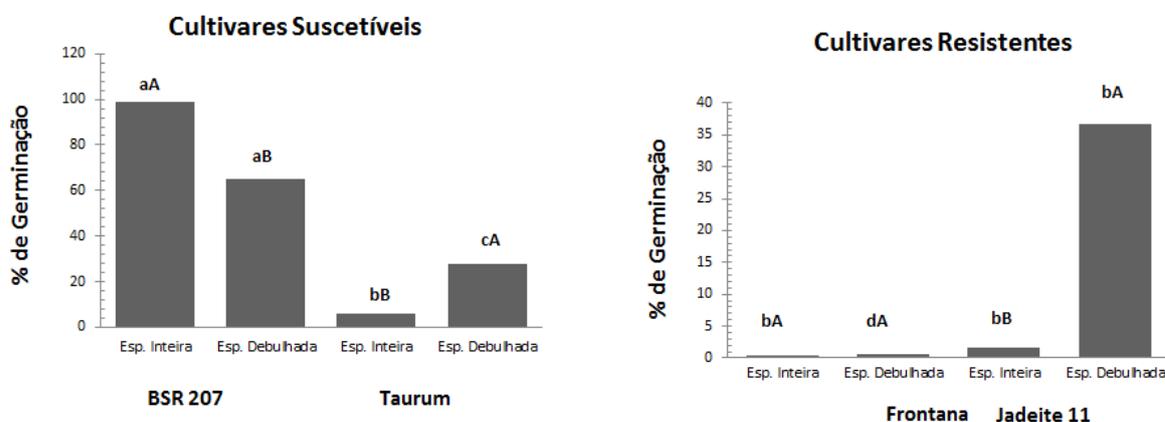


Figura 2 – Fenotipagem segundo o método de Nornberg et al. (2015) de quatro cultivares contrastantes a germinação pré-colheita. UTFPR, Campus Pato Branco, 2018.

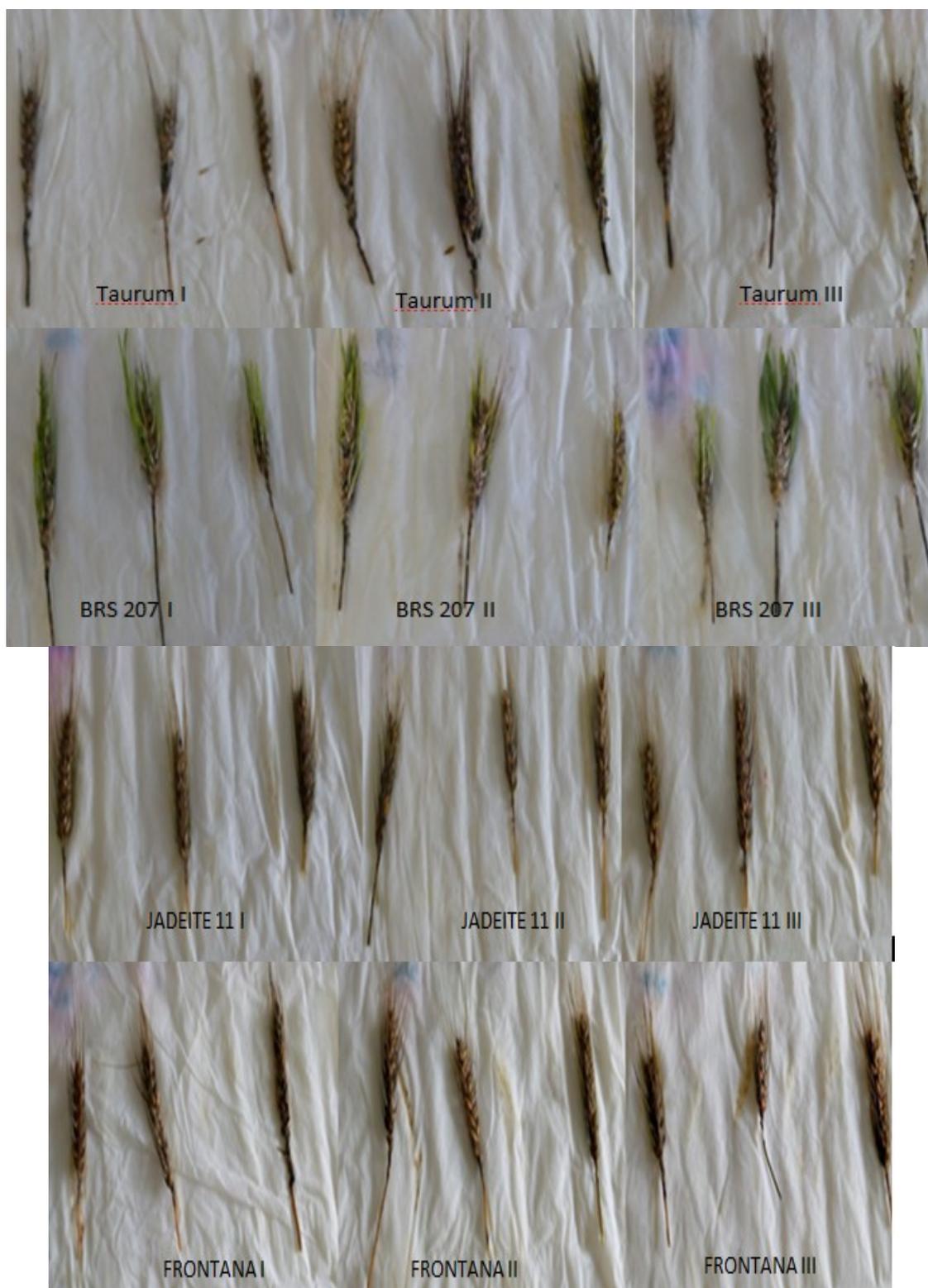
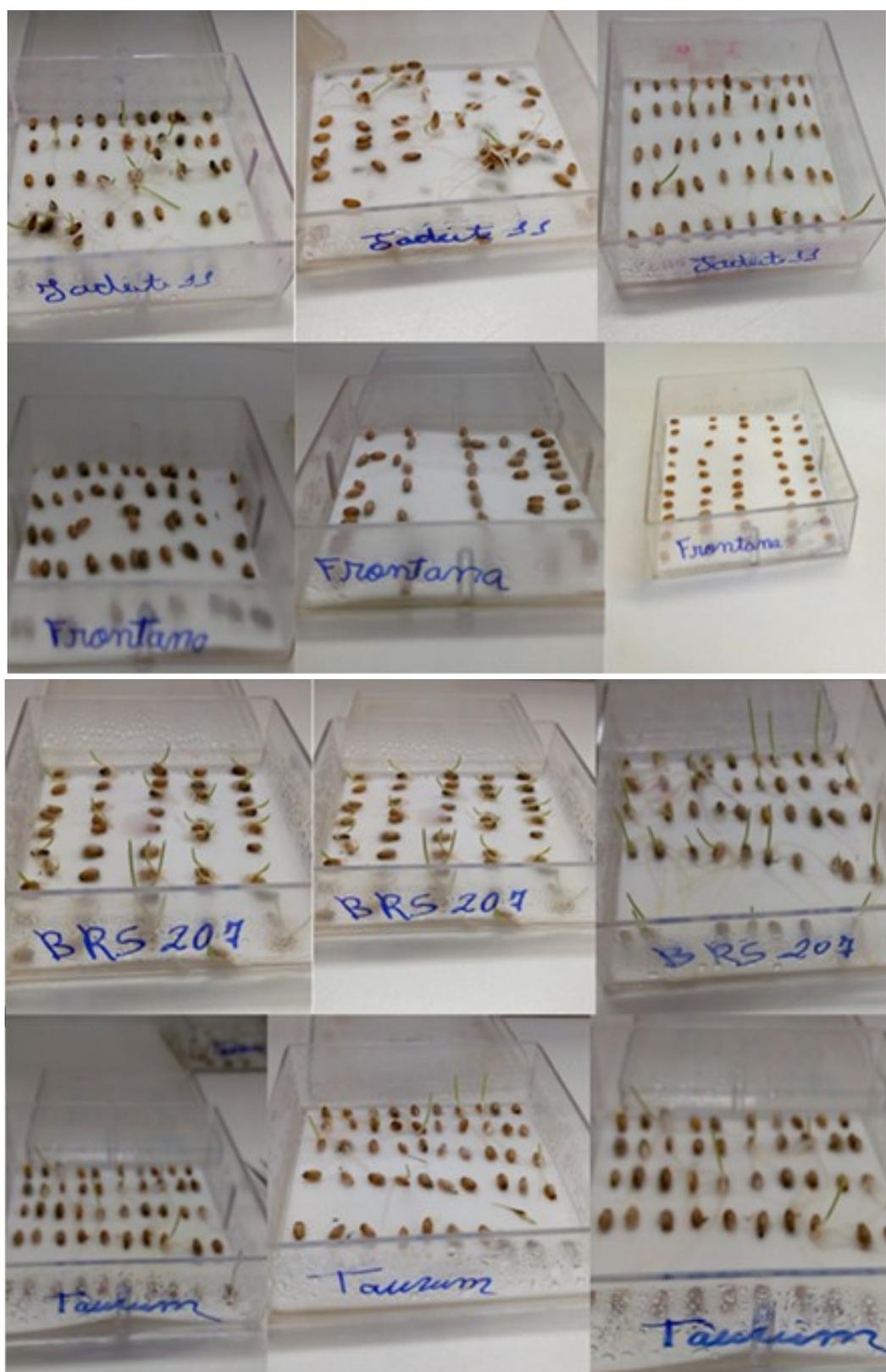


Figura 3 – Fenotipagem segundo o método de Brasil (2009) de quatro cultivares contrastantes a germinação pré-colheita. UTFPR, Campus Pato Branco, 2018.



5.2 RESULTADOS EXPRESSÃO GENICA

Em relação as amostras de RNA extraídos, somente a cultivar Taurum não atendeu aos parâmetros mínimos de integridade, verificados em gel de agarose. Desta forma, essa cultivar foi excluída das análises moleculares. Foi possível observar através da análise da eletroforese em gel de agarose, que após 24 horas molhamento, a cultivar Frontana seguida de Jadeite 11, obtiveram o maior acúmulo de transcritos para o gene codificador da enzima metiltransferase. A cultivar BRS 207 apresentou os menores níveis de expressão. Portanto observamos que a expressão do gene Metiltransferase foi maior nas cultivares resistentes comparativamente a cultivar suscetível. (Figura 4).

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose, com iniciadores dos genes Metiltransferase e Tubulina, para as cultivares Frontana, BRS 207 e Jadeite 11. Marcador de peso molecular: 100bp DNA *Ladder* para o gene Metiltransferase e 1 Kbp DNA *Ladder* para o gene Tubulina. UTFPR, Campus Pato Branco, 2018.

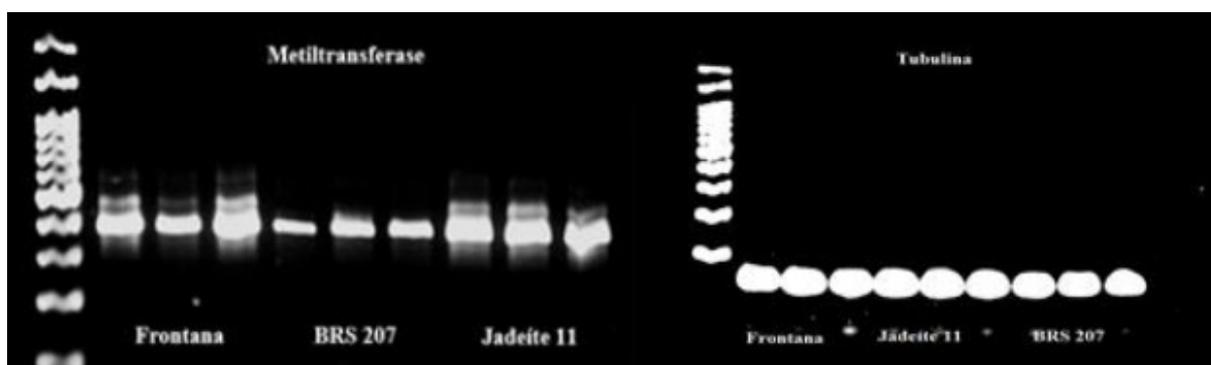


Tabela 5 – Análise de variância de três cultivares de trigo expostas ao molhamento contínuo na maturidade fisiológica, para a expressão gênica dos genes Metiltransferase (MET) e Tubulina (TUB). UTFPR, Pato Branco-PR, 2018.

FV	GL	TUB	MET
Blocos	2	398435	14.7
Tratamentos	2	8469989**	436.5*
Resíduo	4	260235	37.6
Total	8	9128659	488.8
Média		19100	37,61
CV (%)		2,67	16,31

** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade; respectivamente pelo teste F ns não-significativo; pelo teste F

Em relação a magnitude de expressão dos genes, foi possível verificar através da análise da variância (ANOVA), a presença de significância ($p < 0,01$) para o efeito de genótipos, indicando haver diferença significativa entre as cultivares resistentes e suscetíveis quanto aos níveis de expressão (Tabela 5). Os coeficientes de variação foram de 2,67% para o gene Tubulina e 16,31% para o gene metiltransferase, demonstrando boa precisão experimental.

A partir da análise de comparação de médias para a magnitude da expressão dos genes, foi possível identificar para o gene codificador da enzima metiltransferase, que as cultivar Jadeite 11 apresentou a maior magnitude de expressão, no entanto, não diferiu estatisticamente da cultivar Frontana. A cultivar BRS 207 apresentou os menores níveis de expressão, no entanto, não diferiu estatisticamente da cultivar Frontana. Assim, as cultivares consideradas resistentes a germinação pré-colheita, apresentaram maior magnitude de nível de expressão em relação a cultivar BRS 207, que é reconhecida como uma cultivar suscetível. Em relação a análise de magnitude para o gene referência Tubulina as cultivares Frontana e BRS 207 não diferiram estatisticamente entre si, mas se diferiram da cultivar Jadeite 11 (Tabela 6).

A análise geral dos resultados demonstra que a cultivar Frontana apresentou valores insignificantes de germinação na espiga. A expressão da dormência, citada por FLINTHAM (2000), parece ter sido o mecanismo mais evidente, pois os menores índices de germinação estiveram associados ao maior número de sementes dormentes.

Tabela 6 – Comparação de médias para expressão gênica dos genes Metiltransferase (MET) e Tubulina (TUB) de três cultivares de trigo expostas ao molhamento contínuo na maturidade fisiológica. UTFPR, Pato Branco-PR, 2018.

GENÓTIPO	TUB	MET
Frontana	19,54 a	41 ab
BRS 207	20,51 a	24 b
Jadeite 11	17,24 b	47 a

** Valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Segundo Kulwal (2012), os genes de resistência a germinação na pré-colheita estão presentes principalmente nos cromossomos 7BS e 7DS do trigo,

assim como identificamos em nosso estudo para o gene da enzima MET, que está localizado no cromossomo 7D (Tabela2).

De acordo, com os resultados de expressão gênica obtidos, pode-se verificar que a expressão do gene Metiltransferase em cultivares resistentes corrobora com estudos encontrados por Singh, (2013), que indicam que a metilação do DNA é importante para a aquisição de dormência, evitando a germinação das sementes na espiga.

Em estudo recente realizado por Li et al. (2013), os autores verificaram que a diminuição na expressão de um gene que codifica cafeoil-CoA O-metiltransferase por RNAi, leva à redução da produção de lignina na palha do milho. Outros trabalhos realizados com arroz, demonstraram que o gene que codifica cafeoil-CoA O-metiltransferase foi identificado sendo expresso em genótipo tolerante ao frio. (DAMETTO,2015). Apesar dos resultados obtidos no presente estudo, mais estudos envolvendo o gene da MET devem ser realizados, visando confirmar a sua atuação como um percussor responsável pela germinação pré-colheita de trigo.

6 CONCLUSÕES

A cultivar Frontana foi caracterizada como resistente à germinação pré-colheita. A cultivar BRS 207 foi caracterizada como suscetível. E as cultivares Jadeite 11 e Taurum, apresentaram, resistência intermediária.

O método de espiga debulhada de Nornberg et al. (2015) propiciou uma melhor diferenciação das cultivares, e pode ser considerado mais eficiente para a caracterização dos genótipos quanto a germinação pré-colheita.

A análise de expressão genica sugere que a manutenção do DNA metilado pode ser um fator que contribui para a resistência a germinação na pré-colheita em trigo, pois as cultivares resistentes apresentam maior acúmulo de transcritos do gene codificador da metiltransferase.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, o método de fenotipagem com espiga debulhada possibilita a discrepância das cultivares resistentes das suscetíveis na germinação pré-colheita, auxiliando nos programas de melhoramento genético para classificação de novas cultivares com genes de resistência a germinação na pré-colheita.

Em relação aos genes envolvidos nos processos de germinação pré-colheita, foi possível identificar maior expressão do gene da Metiltransferase em cultivares resistentes em comparação as suscetíveis, mas novos experimentos devem ser conduzidos para identificação de mais genes envolvidos nos processos da via de biossíntese do ácido abscísico e da rota da biossíntese da giberelina.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. **Basic local alignment search tool**. *Journal of molecular biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDERSON, J. A.; SORRELLS, M. E.; TANKSLEY, S. D. **RFLP analysis of genomic regions associated with resistance to preharvest sprouting in wheat**. *Crop Science*, v. 33, n. 3, p. 453-459, 1993.
- BASSOI, M. C. **Aspectos gerais da germinação pré-colheita e seu controle genético**. Cunha G. Germinação pré-colheita em trigo. Passo Fundo, EMBRAPA Trigo, p. 23-45, 2004.
- BASSOI, M.C; FLINTHAM, J.; RIEDE, C. R. **Analysis of preharvest sprouting in three Brazilian wheat populations**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 4, p. 583-590, 2006.
- BIDDULPH, T. B. et al. **Seasonal conditions influence dormancy and preharvest sprouting tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field**. *Field Crops Research*, v. 107, n. 2, p. 116-128, 2008.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária.—Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf> Acesso dia 26 de Maio de 2017
- BRAVIM, F. et al. **High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain**. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, n. 5, p. 2093-2107, 2013.
- CABRAL, A. L. et al. **Identification of candidate genes, regions and markers for pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.)**. *BMC plant biology*, v. 14, n. 1, p. 340, 2014..
- CASASSOLA A, et al. **Parental selection of wheat lines based on phenotypic characterization and genetic diversity**. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 13: 49-58, 2013
- CASTRO, R.D. BRADFORD, K.J. HILHORST, H.W.M. **Embebição e reativação do metabolismo**. In: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. (Orgs.). Germinação do básico ao aplicado. Porto Alegre, p.149-162, 2004.

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

CONAB-COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento safra brasileira de grão.** V.5 – Safra 2017/18,-Quinto Levantamento, Brasília, p. 1-132 janeiro,2018. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_11_14_17_49_graos_4_o_levantamento.pdf>Acesso 22/02/2018.

CUNHA, G. R.; PIRES, J. L. F.. **Germinação pré-colheita em trigo.**,2004.

DAMETTO, Andressa. **Identificação e caracterização de genes de arroz (Oryza sativa L. ssp. indica) importantes para a tolerância ao frio na fase de germinação.** 2016. Dissertação de Mestrado.

DE CASTRO, R. L.et al. **Germinação pré-colheita nas cultivares de trigo do Rio Grande do Sul, ano 2013.** In: Embrapa Trigo-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 8.; SEMINÁRIO TÉCNICO DO TRIGO, 9., 2014, Canela; REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 9.; SEMINÁRIO TÉCNICO DO TRIGO, 10., 2015, Passo Fundo. Anais.. Passo Fundo: Biotrigo Genética: Embrapa Trigo, 2015.

DEPAUW, R. M. et al.**Developing standardized methods for breeding preharvest sprouting resistant wheat, challenges and successes in Canadian wheat.** Euphytica, v. 188, p. 7-14, 2012.

FELICIO, J. C. et al. **Rendimento e processo germinativo do grão na espiga de genótipos de trigo.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v37, n.3, p.289-294, 2002.

FINNEY, P. L. **Effect of wheat variety on the relationship between falling numbers and alpha-amylase activity.** Cereal Chemistry, 62(4):258-262, 1985.

FLINTHAM, J.E. et al. **Mapping genes for resistance to sprouting damage in wheat.** Euphytica, v.126, p.39-45, 2002.

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

FRANCO, F. de A. et al. **Tolerância à germinação na espiga em cultivares de trigo colhido na maturação fisiológica.** Ciência Rural, Santa Maria, v.39, n.9, p.2396-2401, 2009.

GAO, X. et al. **Factors affecting pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): A review.** The Journal of Animal & Plant Sciences, v. 23, p. 556-565, 2013.

GAVAZZA, Melícia Ingredi Araújo. **Métodos para avaliação de genótipos de trigo quanto à germinação na espiga.** 2012.

GONZÁLEZ-GUZMÁN, Miguel et al. **The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde.** The Plant Cell, v. 14, n. 8, p. 1833-1846, 2002.

GOODSTEIN, D. M. et al. **Phytozome: a comparative platform for green plant genomics.** Nucleic Acids Research, v.40, p.1178-1186, 2012.

GUARIENTI, E. M.; MIRANDA, M. Z. Determinação da germinação pré-colheita em trigo. IN: CUNHA, G. R. & PIRES, J.L.F. **Germinação pré-colheita em trigo.** Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2004, P.291-308

GUBLER, F.; MILLAR, A.A.; JACOBSEN, J.V. **Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting.** Current Opinion in Plant Biology 8: 183-187, 2005.

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

IWGSC – The International Wheat Genome Sequencing Consortium. **A chromosomebased draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome.** Science, v.345, p. 286-298, 2014

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

KING, R. W.; WETTSTEIN-KNOWLES, P. **Epicuticular waxes and regulation of ear wetting and pre-harvest sprouting in barley and wheat.** Euphytica, v. 112, p. 157-166, 2000.

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

KULWAL, P. et al. **Mapeamento de associação para resistência à brotação pré-colheita em trigo branco de inverno.** Genética Teórica e Aplicada , v. 125, n. 4, p. 793-805, 2012.

KUMAR, A. et al. **QTL Analysis for Grain Colour and Pre-harvest Sprouting in Bread Wheat.** Plant Science, 177:114–122, 2009.

LI Y. et al. **The current opinions on the functions of tocopherol based on the genetic manipulation of tocopherol biosynthesis in plants.** Journal of Integrative Plant Biology, v. 50, n. 9, p. 1057–1069, 2008.

LI, B.; FOLEY, E. **Genetic and molecular control of seed dormancy.** Trends in Plant Science 2, 384-389, 1997.

LUNN, G.D. et al. **Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain in the U.K.** Journal of Cereal Science, v.33, p.313-329, 2001.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows: Winstat versão 2.0.** Pelotas: UFPel, 2003.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas.** Piracicaba: FEALQ, 1 ed. 2005. 495p.

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

MARES, D.J.; MRVA, K. **Late-maturity α -amylase: low falling number in wheat in the absence of preharvest sprouting.** J Cereal Science 47: 6-17, 2008.

MARONE, M. et al. **Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample.** Biol Proced Online, v. 3, n. 1, p. 19-25, 2001.

MARQUES, Joana. **A importância do trigo para a economia brasileira.** Jornal GGN. 2012. Disponível em:<<http://jornalgggn.com.br/blog/luisnassif/a-importancia-do-trigo-para-a-economia-brasileira>>. Acesso dia 01/05/2017.

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

MEREDITH, P.; POMERANZ, Y. 1985. **Sprouted grain.** Pages 239-320 in: Advances in Cereal Science and Technology, Vol. VII. Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN

MIRANDA, M. Z. de. **Trigo: germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 12 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 74). Disponível em:<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do74.htm>. Acesso dia 27/05/2017

MONZÓN, D. R. et al. **Perfil de expressão do gene fla 14 em tegumento de sementes de soja**. *Investigación Agraria*, 17(2), 108-115, 2015.

Nörnberg, R. et al. **Tolerance to preharvest sprouting and yield of wheat genotypes from different breeding programs**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50(8), 698-706, 2015

OGÉ L. et al. **Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1 is involved in both seed longevity and germination vigor in Arabidopsis**. *Plant Cell*, v. 20, n. 11, p. 3022– 3037, 2008.

OKUYAMA, Lauro Akio. **Germinação Pré-colheita em trigo (*Triticum aestivum* L.)** 2013. Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/agrometeorologia/20131099-Germinacao-A.pdf>. Acesso dia 14/04/2018.

POPINIGIS, Flavio. **Fisiologia da semente**. Brasília: Agiplan, v. 2, 1985.

RASBAND, W.S., do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland 2013. **ImageJ**. Maryland, <http://imagej.nih.gov/ij/>.

RASUL, G. et al. **Evaluation of preharvest sprouting traits in a collection of spring wheat germplasm using genotype and genotype x environment interaction model**. *Plant Breeding*, v. 131, p. 244-251, 2012.

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

REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE - RCBPTT. **Informações técnicas para Trigo e Triticale-Safra 2017**. Brasília, DF Embrapa, 2017.

Rey, A., Ziegler, J. C.; Jacobs, A. M. (2000). **Graphemes are perceptual reading units**. *Cognition*, 75, B1-B12.

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

ROSA. G. J.M. et al. **Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica**. *Revista Brasileira de Zootecnia*. Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 36, p. 186-209, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/30786>>. acesso dia 14/05/2017

SAIKI, R. K, et al. **Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase**. Science 239 (1988): 487-491

SILVA, H.A.p. et al. **Expressão Gênica induzida por estresses abióticos em nódulos de feijão-caupi**. Pesquisa Agropecuária. Brasil, Brasília, v47,n.6, p791-807;

SINGH, M. et al.. **Polymorphic homoeolog of key gene of RdDM pathway, ARGONAUTE4_9 class is associated with pre-harvest sprouting in wheat (*Triticum aestivum* L.)**. PloS one, 8(10), e77009. 2013. Disponível em:<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0077009>>Acesso 21/04/2017.

SOUZA, C.N.A.de. **Cultivares de trigo no Brasil**.I- Cultivares disponíveis antes de 1950. Passo Fundo: Embrapa-CNPT,1995.34p.(EMBRAPA-CNPT. Documentos,24.)

UNTERGASSER, A. et al.. **Primer3Plus**, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic acids research, 35(suppl 2), W71-W74. 2007.

VAN EEDEN, E.; LABUSCHAGNE, M.T. **Sprouting tolerance and falling number in South African hybrid bread wheat cultivars and their parent lines**. Journal of Cereal Science. 56(3). p.754, 2012.

VILANI, Ismael. **Avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes de cultivares de trigo**. 2016.

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

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAC, C. F. **A decimal code for the growth stages of cereals**. Weed Research, v. 14, p. 415-421, 1974.

ZARLENGA, D.S.; HIGGINS, J.. **PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology**. Veterinary Parasitology, v. 101, n. 3-4, p. 215-230, 2001.

ZENG, Y; YANG, T. **RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides**. Plant Molecular Biology Reporter, v.20, p. 417-421, 2002.