

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Análises citogenéticas em linhagens sintéticas de *Triticum aestivum* L. em Thell. (*T. durum* L. X *Aegilops tauschii* Coss) e seus cruzamentos com cultivares de trigo, visando a introgressão de resistência à ferrugem da folha.

Milena Barcelos Cardoso

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências

Orientadora: Maria Helena Bodanese-Zanettini

Co-orientador: Ariano Moraes Prestes

Porto Alegre, agosto de 2007.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**EMBRAPA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
CNPT - CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO**

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES (MADRID – ESPAÑA)
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA
LABORATORIO DE CITOGENETICA MOLECULAR**

**BOLSA DE DOUTORADO EM MODALIDADE SANDUÍCHE:
FUNDAÇÃO COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL
SUPERIOR
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
GOVERNO DO BRASIL**

Diz a sabedoria popular que só temos uma vida completa quando **plantamos uma árvore, escrevemos um livro e temos um filho**. Estou fazendo duas destas coisas praticamente juntas... Mas escrever este livro foi facilitado pela ótima gestação do meu filho. E por isso, ao **Bernardo ...**

Dedico

Seja Bem-Vindo!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dra. **Maria Helena Bodanese-Zanettini**, pelo incentivo na realização desse trabalho e por partilhar seus conhecimentos em citogenética de trigo, remetendo-a aos tempos de sua pós-graduação.

À Prof^a. Dra. **Eliane Kaltchuk-Santos** por todas as questões que envolvem a execução deste trabalho, mas especialmente por distinguir-me com sua amizade.

Ao Prof. Dr. **Ariano Moraes Prestes** por haver desenvolvido e concedido as sementes dos trigos sintéticos utilizados neste trabalho.

Aos estagiários e funcionários da EMBRAPA – Trigo de Passo Fundo, especialmente à Pesquisadora Dra. **Sandra Patussi Brammer** pela proposição do tema de pesquisa e pela compreensão e colaboração nas dificuldades circunstanciais decorrentes da execução de um trabalho à distância. Seus cuidados com as plantas e coleta do material na minha ausência tornaram possível a realização deste estudo. Às muitas pessoas, sempre disponíveis e solícitas que me auxiliaram na EMBRAPA, a minha gratidão.

Aos colegas e amigos do grupo de **Genética Vegetal** do Departamento de Genética da UFRGS, os quais seria impossível nomear... todos foram importantes seja pela colaboração, pelo apoio, ou pelos momentos de descontração que fazem parte de um bom ambiente de trabalho como o nosso. Agradeço especialmente ao aluno de Iniciação Científica que tive oportunidade de co-orientar, **Ricardo Augusto Felicetti**, pela contribuição na coleta de dados desta tese.

À Prof^a. Dra. **Angeles Cuadrado** da UAH, Espanha, pela orientação no trabalho desenvolvido no doutorado sanduíche, mas especialmente pela dedicação com que me recebeu até mesmo em sua família. Certamente todos os amigos que fiz neste período de estágio tornaram mais amenos os difíceis momentos de distância da família.

Aos familiares, especialmente meus pais, **Solismar** e **Gicelda**, e meu marido **Roberto** que continuamente me apóiam e fazem acreditar que sempre é possível crescer e crescer.

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	08
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	10
1.1. A importância econômica do trigo	11
1.2. A origem e evolução do trigo	13
1.3. Hibridação interespecífica em trigo	16
1.4. Espécies afins como fonte de resistência a doenças	18
1.4.1. <i>Aegilops tauschii</i>	21
1.5. Trigos sintéticos	22
1.6. A ferrugem da folha	24
1.6.1. O controle da ferrugem da folha	25
1.7. A citogenética em programas de melhoramento	28
1.7.1. Contribuições da hibridização <i>in situ</i> (HIS) para a citogenética de plantas	30
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	33
CAPÍTULO 3: ARTIGO - Cytogenetical analysis and leaf rust resistance evaluation in crosses between Brazilian wheat cultivars and synthetic hexaploids	35
CAPÍTULO 4: ARTIGO - Association of pollen size with ploidy level and pollen viability in <i>Triticum</i> species	64
CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO: ARTIGO - Novel physical markers for wheat chromosome identification using SSRs as probes for FISH	100

RESUMO

Uma estratégia bem reconhecida para aumentar o *pool* gênico do trigo consiste na introdução de genes de espécies selvagens afins. *Aegilops tauschii* Coss. possui muitas características agronomicamente desejáveis, não facilmente encontradas em trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell), tal como a resistência a patógenos. Com o objetivo de aumentar a resistência do trigo cultivado à ferrugem da folha, quatro hexaplóides sintéticos (PF844005, PF964001, PF964004 e PF964009), desenvolvidos a partir do cruzamento de *T. durum* L. (AABB) X *Ae. tauschii* (DD), foram cruzados com quatro cultivares brasileiras de trigo (AABBDD - BRSAngico, RS120, BRS209 e CD104). Foram realizadas análises citogenéticas visando avaliar a estabilidade meiótica dos hexaplóides sintéticos, cultivares e suas progênies F1, F2 e RC1F1. Nas cultivares, os índices meióticos variaram de 85,1 a 94,1 indicando uma estabilidade citológica relativamente alta. Três formas sintéticas apresentaram índices meióticos variando de 78,2 a 80,6, o que indica um comportamento meiótico razoavelmente regular. A quarta forma sintética apresentou um índice meiótico estatisticamente mais baixo (40,4). A meiose foi estudada em algumas plantas, mostrando que univalentes e retardatários são as causas da formação de micronúcleos. A frequência de grãos de pólen viáveis variou de 90,4 a 94,0% para as cultivares, enquanto as formas sintéticas exibiram viabilidade polínica variando de 79,9 a 92,0%. Assim como para o índice meiótico, a comparação das médias gerais mostrou que as frequências de grãos de pólen viáveis das cultivares são estatisticamente superiores às das formas sintéticas. O efeito da combinação de cruzamento bem como das gerações no índice meiótico e na viabilidade do pólen foi estatisticamente significativo. Entretanto, na viabilidade do pólen, houve uma interação significativa entre combinação de cruzamento X geração. Embora a análise estatística não tenha discriminado claramente as combinações genotípicas, uma tendência foi evidenciada nos dados de viabilidade do pólen e índice meiótico, sendo que os cruzamentos envolvendo a cultivar CD104 apresentaram repetidamente médias mais elevadas. Por outro lado, as combinações incluindo a cultivar BRS120 apareceram com as médias mais

baixas. A resposta à raça SPJ-RS de *Puccinia triticina* foi avaliada ao longo das gerações. Oito combinações genóticas exibiram resistência à ferrugem da folha em todas as gerações. Estes resultados confirmam que *Ae. tauschii* pode ser usado como fonte de recursos genéticos para aumentar a resistência à ferrugem da folha em cultivares comerciais, usando linhas hexaplóides sintéticas como ponte.

O tamanho do grão de pólen foi avaliado nos níveis diplóide ($2n=2X=14$, *Ae. tauschii* = *T. tauschii*, um acesso), tetraplóide ($2n=4X=28$, *T. durum*, quatro cultivares) e hexaplóide ($2n=6X=42$, *T. aestivum*, quatro cultivares brasileiras e quatro formas sintéticas). Grãos de pólen com o menor diâmetro (39,14 μm) foram encontrados na espécie diplóide *Ae. tauschii*. Os grãos maiores (55,82 a 59,87 μm) foram observados nas cultivares e sintéticos hexaplóides. Valores intermediários foram apresentados pelas cultivares tetraplóides de *T. durum* (46,57 a 47,64 μm). Além da associação entre tamanho de pólen e nível de ploidia, foi verificado em todos os genótipos que o diâmetro dos grãos de pólen viáveis foi significativamente maior do que aquele observado para os grãos inviáveis. A detecção de diferenças significativas no diâmetro dos grãos de pólen permitiria o uso de citômetro de fluxo para obter uma estimativa rápida tanto do nível de ploidia como da viabilidade do pólen em *Triticum*.

ABSTRACT

One well-recognized means to increase the wheat gene pool is to introduce genes from wild relatives. *Aegilops tauschii* Coss. possesses many agronomically identified desirable characteristics not readily found in wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell), such as resistance to pathogens. Aiming to improve the resistance of cultivated wheat to leaf rust, four synthetic hexaploids (PF844005, PF964001, PF964004 and PF964009), developed from *T. durum* L. (AABB) and *Ae. tauschii* (DD), were crossed with four Brazilian commercial wheat cultivars (AABBDD - BRSAngico, RS120, BRS209 and CD104). Cytogenetical analyses were performed aiming to evaluate the meiotic stability of the synthetic hexaploids, cultivars and their F1, F2 and BC1F1 progenies. Meiotic indices varied from 85.1 to 94.1, indicating a relatively high cytological stability of the cultivars. Three synthetic forms presented meiotic indices that varied from 78.2 to 80.6, indicating a quite regular meiotic behavior. The fourth synthetic form presented a statistically lower meiotic index (40.4). Meiosis was studied in some plants, showing that univalents and laggards were the causes of micronuclei formation. The frequency of viable pollen grains varied from 90.4 to 94.0% for *T. aestivum* cultivars and from 79.9 to 92.0% for synthetic forms. As well as for meiotic index, the comparison between general means showed that the frequencies of viable pollen grains are statistically higher in cultivars than in synthetic forms. The effect of cross combinations as well as generations on the meiotic index and pollen viability was highly significant. However, in pollen viability, statistical analysis showed that interaction between cross combinations and generations, as well as their simple effects were significant. Although the statistical analysis had not clearly discriminated the genotype combinations, there was a clear tendency in pollen viability and meiotic index data, with crosses involving CD104 cultivar showing up repeatedly with higher means. On the other hand, combinations including BRS120 cultivar appeared with the lowest means. The responses to the *Puccinia triticina* SPJ-RS race were evaluated over generations. Eight genotype combinations exhibited leaf rust resistance in all generations. These results confirm that *Ae.*

tauschii can be used as a good genetic source for improving leaf rust resistance in commercial cultivars, using synthetic hexaploid lines as a bridge.

Pollen grain size was evaluated in diploid ($2n=2X=14$, *Aegilops tauschii* = *T. tauschii*, one accession), tetraploid ($2n=4X=28$, *T. durum*, four commercial cultivars), and hexaploid ($2n=6X=42$, *T. aestivum*, four Brazilian cultivars, and four synthetic forms) levels. The pollen grains with the smallest diameter (39.14 μm) were found in *Ae. tauschii*, the diploid species. The largest pollen grains (55.82 to 59.87 μm) were observed in the hexaploids *T. aestivum* and synthetic forms. Intermediate values were presented by tetraploid cultivars of *T. durum* (46.57 to 47.64 μm). In addition to an association between pollen size and ploidy level, it was found that the mean diameter of viable grains was significantly larger than that of inviable grains for all the genotypes studied. The significant differences detected in pollen diameter could allow the use of particle counters to obtain a rapid estimation of ploidy level as well as pollen viability in *Triticum*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância econômica do trigo

O trigo foi uma das primeiras plantas domesticadas e por 8000 anos tem sido a base da alimentação das principais civilizações da Europa, Ásia e África. A partir da sua domesticação, nas lavouras do Sudoeste da Ásia, em 7000 a 9000 a.C., a cultura deste cereal sofreu uma grande expansão (Bell, 1987), sendo que, até a década de 80, a variabilidade encontrada era de nada menos de 25.000 cultivares disponíveis em todo mundo (Mota, 1982 apud Angra, 1995).

O trigo fornece cerca de 20% do total de calorias consumidas pela humanidade (FAO, 1998). Seu grão é uma excelente fonte de energia (carboidratos), proteínas e fibras. O seu grande trunfo é possuir um tipo de proteína com certa elasticidade, chamada de glúten, característica importante no processo de panificação e não encontrada em outros grãos. A farinha de trigo é utilizada no preparo de uma grande gama de produtos. Em forma de pão e de outros derivados, o trigo constitui um dos alimentos mais importantes da cesta básica brasileira (Silva *et al.*, 1996).

A produção mundial de trigo aumentou drasticamente durante o período de 1951-1990, desde quando permanece relativamente constante. No entanto, a área cultivada permanece praticamente inalterada. Isto pressupõe um aumento considerável na produtividade dessa cultura. Em 1950, a produção mundial era de cerca de 1 ton/ha, alcançando cerca de 2 ton/ha na década de 1980 (Curtis, 2002).

Atualmente, o trigo é cultivado em mais de 240 milhões de hectares, área esta maior do que a de qualquer outra planta cultivada, e mundialmente é maior que todas as demais culturas combinadas (Curtis, 2002). A produção mundial de trigo de 2006/07 está projetada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em 593,1 milhões de toneladas.

A China é o maior produtor mundial de trigo com cerca de 16,2 % do total. Os países da União Européia aparecem em segundo lugar, mas, individualmente, a posição é da Índia, seguida da Rússia, Estados Unidos, Ucrânia, Paquistão, Turquia, Canadá, Argentina e Cazaquistão, que detêm em torno de 50% da produção mundial (USDA, 2003).

Curtis (2002) aponta a China, a Rússia, o Egito, o Japão e o Brasil como os maiores importadores de trigo. O mesmo autor refere que os maiores exportadores são EUA, Canadá, França e Austrália.

O consumo médio de trigo no mundo é de 83 Kg/habitante/ano, enquanto que no Brasil cai para aproximadamente 51 kg/habitante/ano (Bacaltchuk, 2003). Assim, o Brasil, com uma população em torno de 170 milhões de habitantes, para atender a sua demanda interna de 10 milhões de toneladas de consumo de trigo, necessitava importar, anualmente, cerca de 6,5 a 7 milhões de toneladas, a um custo anual médio superior a um bilhão de dólares. No entanto, a produção anual apresentou um aumento de 76% em relação aos 2,9 milhões de toneladas da safra anterior, ficando em torno de 5 milhões de toneladas no ano de 2003 (Rodrigues, 2003).

Na safra 2005/2006 a área cultivada no Brasil foi de 2,361 milhões de hectares, com produção de 4,873 milhões de toneladas. O Estado do Rio Grande do Sul produziu 1,564 milhões de toneladas de trigo, com uma produtividade de 1,850 kg/ha (CONAB, 2007). Para a safra de 2006/2007 que se encontra já colhida, a área cultivada foi de 1,8 milhão de hectares, inferior a da safra anterior em 25,6%. Essa redução foi impulsionada pelos baixos preços do produto e pelas condições climáticas adversas na implantação da cultura (estiagem) e no período de floração e frutificação (geadas). Como resultado, a produtividade da safra caiu para 1271 Kg/ha, sendo inferior a da safra anterior em 38,4%. Em função da redução da área plantada e da produtividade, a produção foi de 2,23 milhões de toneladas (CONAB, 2007).

No Brasil, a produtividade é considerada baixa e instável devido a fatores tais como os solos ácidos, com altos níveis de alumínio e fixação de fósforo; severas pressões de enfermidades como ferrugens, septorioses, mancha marrom, mancha bronzeada, giberela e oídio, precipitações variáveis sendo excessivas no sul e escassas no centro; frios fora de época. As baixas temperaturas no período de floração e o excesso de chuvas na colheita podem reduzir severamente a produção (Curtis, 2002).

Nas últimas décadas, a cultura de trigo sofreu modificações significativas, especialmente no rendimento, arquitetura de planta, resistência aos estresses

bióticos e abióticos e qualidade de panificação. As modificações foram necessárias para que as lavouras alcançassem níveis adequados de produtividade e oferecessem garantias aos produtores, além de satisfazer as exigências da indústria e do mercado. Tais alterações foram obtidas através do esforço conjunto de programas de melhoramento genético no mundo todo, sendo que atualmente encontram-se disponíveis genótipos com excelentes características e com boa adaptabilidade às mais diversas condições. Porém, para que a triticultura nacional melhore sua competitividade, é necessário que os custos de produção e os custos que afetam a comercialização sejam reduzidos. Para que isso ocorra, é fundamental que novas tecnologias com maior exeqüibilidade e com menores riscos sejam disponibilizadas, possibilitando aumentos de produtividade.

1.2. A origem e evolução do trigo

O termo trigo é normalmente empregado para as espécies cultivadas do gênero *Triticum*, pertencente à tribo Triticeae da família Poaceae. Trabalhos clássicos de Nilsson-Ehle (1909) e Sakamura (1918) – citados por Gill & Friebe (2002) - demonstraram que os trigos são séries poliplóides agrupadas em três níveis de ploidia: diplóide, tetraplóide e hexaplóide, com números cromossômicos de 14, 28 e 42, respectivamente. Assim, o número cromossômico básico é 7, sugerindo que as espécies são todas derivadas de ancestral único em um passado distante.

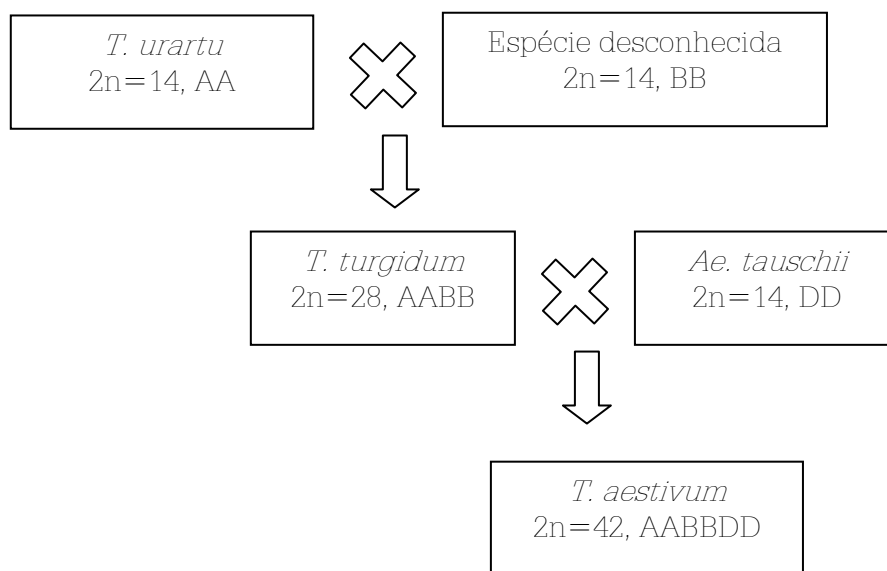
Seguindo os trabalhos básicos, diversos pesquisadores dedicaram-se a uma extensa investigação do trigo e espécies afins. Cruzamentos artificiais entre as espécies pertencentes aos três níveis de ploidia e o estudo do pareamento dos cromossomos na meiose dos híbridos, associados a outras evidências, permitiram a identificação das espécies que deram origem ao trigo atual (Moraes-Fernandes, 1985).

O conjunto haplóide de cromossomos, ou genoma, dos trigos diplóides é designado A. Sendo assim, as espécies diplóides são genomicamente assinaladas como AA. Na maioria, e possivelmente em todos os tetraplóides, há um conjunto de cromossomos de outra espécie diplóide, designado B,

constituindo-se, assim, como AABB os genomas dos trigos tetraplóides. Os hexaplóides apresentam a constituição completa dos tetraplóides com a adição do genoma de outra espécie diplóide, designado D. Conseqüentemente, os trigos hexaplóides apresentam constituição genômica AABBDD (Riley, 1960).

Apesar de um grande número de espécies ter sido cultivado ao longo do tempo, atualmente o cultivo é praticamente restrito ao trigo duro tetraplóide (*Triticum turgidum* L.) e ao trigo comum hexaplóide (*Triticum aestivum* L. em Thell) (Knott, 1989a). A origem do trigo cultivado, tal como conhecemos hoje, está relativamente bem documentada, e é o resultado da combinação do patrimônio genético de três espécies diplóides ancestrais. Dados moleculares tem indicado *T. urartu* Tum. ex. Gandil. como o doador do genoma A, apesar de análises citogenéticas não distinguirem entre *T. monococcum* L. e *T. urartu* (Dvórák *et al.*, 1988, 1993). McFadden & Sears (1944, 1946) e Kihara (1944) demonstraram que *Ae. squarrosa* (agora denominado *Ae. tauschii* Coss.) foi o doador do genoma D. Entretanto, a identidade conclusiva do doador do genoma B permanece não determinada, podendo estar a espécie doadora atualmente extinta ou seu genoma extensamente modificado por hibridações introgressivas com espécies silvestres (Knott, 1989a). Sarkar & Stebbins (1956), Riley *et al* (1958) apoiados por dados moleculares mais recentes de Dvórák & Zhang (1990) e Dvórák (1998) sugerem que o genoma B é altamente relacionado ao de *Aegilops speltoides* Tausch.

O gênero *Triticum* fornece um bom exemplo de evolução por anfiploidia, como esquematizado a seguir:



As três espécies ancestrais do trigo hexaplóide cultivado atualmente, embora distintas, são altamente relacionadas e, portanto, cada cromossomo em um genoma pode ser relacionado ou homeólogo a outro cromossomo em cada um dos demais genomas. Portanto, são sete grupos homeólogos de três cromossomos cada. Assim, muitos dos sistemas genéticos apresentam-se duplicados ou triplicados, modificando os padrões de segregação mendeliana (Moraes-Fernandes, 1985).

Apesar de serem funcionalmente e estruturalmente relacionados, e estarem essencialmente inalterados em comparação com sua condição nos diplóides (Riley, 1960), os cromossomos homeólogos do trigo não pareiam, formando-se apenas bivalentes na meiose. O pareamento dos cromossomos homeólogos dos três genomas do trigo hexaplóide é normalmente evitado pela ação de um alelo no loco *Ph1* no cromossomo 5B^L (Riley & Chapman, 1958). Esta atividade, que é responsável por regular o pareamento do tipo bivalente (diploidização) e a herança dissômica de *T. aestivum*, surgiu provavelmente após o desenvolvimento da poliploidia (Riley, 1960). Pareamento homeólogo pode ser esperado na falta do braço longo do cromossomo 5B ou quando a atividade de *Ph1* é suprimida (Riley *et al.*, 1959), o que indica que uma simples mutação pode alterar drasticamente o padrão de pareamento do trigo (Jauhar *et al.*, 1991), como já demonstrado em trabalho de Riley (1960).

Jauhar *et al.* (1991) verificaram baixo nível de pareamento em haplóides (ABD) com *Ph1* em atividade, com rara formação de bivalentes. Esta observação é consistente com relatos anteriores (Riley & Chapman, 1958; Kimber & Riley, 1963). No entanto, em mutantes *ph1*, foi demonstrado substancial pareamento homeólogo, com aumento de 7,5 a 11,6 vezes. Mediante estudos de bandeamento C e N, Hutchinson *et al.* (1983) e Jauhar *et al.* (1991) puderam comprovar que a maioria absoluta das associações ocorreu entre os genomas A e D, o que também é demonstrado em estudos com híbridos, permanecendo o genoma B preferencialmente na forma univalente. O genoma B mostrou-se mais relacionado ao genoma A do que ao D, apesar de mostrar raro pareamento com ambos genomas.

1.3. Hibridação interespecífica em trigo

Os trigos poliplóides cultivados, em função de seu modo peculiar de origem - envolvendo hibridações interespecíficas, duplicação cromossômica e conseqüente isolamento instantâneo das espécies parentais - possuem uma base genética muito estreita, que representa apenas uma pequena fração da diversidade genética dos seus progenitores selvagens (Dhaliwal *et al.*, 1993).

A ampla hibridação tem sido registrada como ocorrência natural entre as espécies poliplóides do grupo *Aegilops-Triticum*, o que leva à discussão de serem ou não consideradas como entidades independentes. Esta observação levou à proposição de que a hibridação teve papel decisivo na formação de muitas espécies poliplóides atuais. Estas conexões inter e intra-específicas fornecem recurso rico e facilmente disponível para a obtenção de variabilidade genética (Zohary & Feldman, 1961).

O potencial prático da hibridação ampla em *Triticeae* é provavelmente muito maior do que em outros grupos, em função da facilidade de cruzamento, aliada ao amplo conhecimento dos genomas, mas também como conseqüência da importância desta cultura para o mundo (Mujeeb-Kazi & Kimber, 1985). Vários genes controlando a resistência a diversas doenças do trigo e que aumentam a qualidade protéica têm sido transferidos das espécies e gêneros afins através de hibridação interespecífica (Dhaliwal *et al.*, 1993).

O pool gênico primário inclui cultivares antigas (ou raças crioulas), tetraplóides cultivados e os diplóides doadores dos genomas A e D. Nestes casos, a transferência de genes ocorre como conseqüência direta da hibridação e recombinação homóloga. O pool gênico secundário é formado por poliplóides dos gêneros *Triticum* e *Aegilops* onde o pareamento cromossômico é reduzido e a transferência gênica pressupõe estratégias de manipulação especiais. Quando os genomas são não-homólogos, as espécies diplóides ou poliplóides são incluídas no pool gênico terciário, onde a transferência gênica só é possível mediante o uso de técnicas especiais que promovem a troca homeóloga. Baseado nestes requisitos, de acordo com a facilidade de transferência, a diversidade constante do pool gênico primário é a mais importante para o melhoramento de trigo (Mujeeb-Kazi & Rajaram, 2002).

A tribo Triticeae inclui 25 gêneros, com em torno de 400 espécies distribuídas nos três pools gênicos, que podem oferecer ampla diversidade genética para o melhoramento de trigo.

A hibridação ampla, incluindo cruzamentos intergenéricos e interespecíficos, é o primeiro passo para introduzir variação e transferir caracteres desejáveis de espécies selvagens para as espécies cultivadas. A produção de tais híbridos com o uso de técnicas simples de emasculação e polinização tem uso extensivo em programas de melhoramento de trigo. Com esta técnica muitos híbridos importantes foram e continuam sendo produzidos (Mujeeb-Kazi & Kimber, 1985).

Barelle fez o primeiro cruzamento interespecífico em trigo em 1806 (Ciferri, 1955). Desde então, a hibridação ampla no trigo tem sido extensivamente utilizada, o que produziu volumosa literatura. Sharma & Gill (1983) publicaram uma extensa lista de híbridos envolvendo espécies de *Triticeae*, muitos dos quais são atualmente variedades comerciais, com vários exemplos de genes desejáveis transferidos de espécies afins para o trigo.

Os genótipos envolvidos, o nível de ploidia, os procedimentos e a direção dos cruzamentos influenciam o sucesso da produção de híbridos (Mujeeb-Kazi & Kimber, 1985; Sharma & Gill, 1983). Em geral, a prática para as espécies do grupo *Triticum* tem sido utilizar a espécie com maior nível de ploidia como progenitor materno. As razões para isto incluem a maior facilidade em emasculação e o menor desequilíbrio entre o número de cromossomos do embrião e do endosperma (Mujeeb-Kazi & Kimber, 1985).

O principal obstáculo em uma transferência de genes de espécies afins é obter sucesso no cruzamento. Quando as espécies a serem cruzadas são distantemente relacionadas ocorre falha na fertilização ou o desenvolvimento do embrião cessa em um estágio precoce. Quando este problema é encontrado, deve-se testar uma ampla variedade de genótipos de ambos os parentais e tentar o cruzamento nas duas direções, esperando que uma combinação possa ser mais compatível que a outra (Knott & Dvórák, 1976). Várias espécies de Triticeae apresentam genes que controlam a possibilidade de cruzamento com espécies

afins, podendo apresentar diferenças entre espécies e entre acessos de uma mesma espécie (Fedak, 1998).

A inviabilidade de embriões híbridos resultantes de cruzamentos interespecíficos que objetivam a transferência de genes, vem sendo superada pelos crescentes avanços na área da cultura de tecidos (Moraes-Fernandes, 1985). O uso da cultura de embriões zigóticos certamente aumentou o sucesso dos cruzamentos entre espécies mais distantes. O estímulo da germinação do embrião *in vitro* pela aplicação de hormônios e outros nutrientes no meio de cultura pode promover a transposição de barreiras ao cruzamento (Sharma & Gill, 1983).

A fertilidade parcial de alguns híbridos interespecíficos pode ser explicada devido à poliploidia e à ocorrência de genomas em comum com as espécies parentais. Os poliplóides podem tolerar a desarmonia cromossômica causada pela hibridação, devido às duplicações (Feldman, 1965). No entanto, numerosos híbridos interespecíficos e quase todos os intergenéricos são totalmente estéreis. O problema de esterilidade pode ser resolvido por duplicação dos cromossomos ou por retrocruzamentos. Efetivamente, o uso prático destes híbridos foi limitado até o advento do uso da colchicina no final da década de 1930 (Mujeeb-Kazi & Rajaram, 2002).

1.4. Espécies afins como fonte de resistência a doenças

No melhoramento de plantas o homem está constantemente à procura de novos recursos genéticos. Nas espécies cultivadas, muitas vezes faltam genes que são importantes para o melhorista, particularmente genes de resistência a doenças. Em muitos gêneros, e especialmente os que compreendem um complexo poliplóide como é o caso do trigo, as espécies relacionadas fornecem uma importante reserva de genes que podem ser utilizados em programas de melhoramento (Knott & Dvórák, 1976).

As fontes de resistência a doenças são as mesmas das outras características herdáveis em uma cultura: variedades comerciais locais ou estrangeiras, variedades antigas cujo cultivo tenha sido abandonado ou que tenham sido descartadas dos estoques dos melhoristas e também espécies

silvestres afins à espécie cultivada (Agrios, 1997). A hibridação interespecífica permite, além da incorporação de resistência a doenças, a diversificação de genes relacionados a outras características, aumentando a variabilidade da cultura (Brammer, 2000).

A variabilidade inicialmente existente em várias raças crioulas (“landraces”), que conferia adaptação a flutuações ambientais e resistência a doenças e pragas, foi consideravelmente reduzida quando a seleção para a uniformidade se tornou norma (Kimber, 1993). Este fenômeno levou à erosão da variabilidade genética, tornando-se importante a descoberta de vias de acesso aos genes que estão presentes em espécies afins ou ancestrais, para tentar utilizá-los em programas de melhoramento. Neste contexto, tornam-se muito importantes os dados sobre a evolução, origem e estrutura genética do trigo, onde o conhecimento das relações citogenéticas e citotaxonômicas das espécies envolvidas é essencial para determinar a metodologia adequada, a fim de que a transferência seja bem sucedida (Moraes-Fernandes, 1985).

Qualquer programa de melhoramento que inclui o uso de espécies afins como fonte de resistência a doenças, deve iniciar pela pesquisa do tipo de resistência existente em espécies relacionadas (Knott & Dvórák, 1976). Para as espécies afins às plantas cultivadas mais importantes, estas informações já estão disponíveis. Por exemplo, as espécies afins do trigo contêm uma rica reserva de genes com potencial para uso em programas de melhoramento, incluindo resistência às ferrugens em um amplo espectro de raças (Knott, 1989a).

Em função da grande divergência entre as espécies afins do trigo, a transferência de genes pode variar desde simples até muito difícil. A probabilidade de sucesso da transferência de um caráter depende basicamente de três fatores: da compatibilidade de cruzamento entre as espécies, do pareamento dos cromossomos das duas espécies e conseqüente fertilidade do híbrido, e, da complexidade genética do caráter (Knott, 1989a). Assim, conforme já mencionado, a quebra de barreiras para a produção de híbridos envolverá ações em vários estágios, passando pela escolha dos pais e direção do cruzamento, emasculação, polinização, resgate e cultura do embrião (Mujjeb-Kazi & Kimber, 1985).

A dificuldade na transferência de genes de espécies afins para o trigo cultivado é dependente, ainda, da localização dos genes, que podem estar em genomas homólogos (A, B ou D) ou em genomas somente homeólogos. A transferência de resistência a doenças de espécies afins é mais difícil quando os cromossomos envolvidos não são suficientemente similares para que a permuta ocorra naturalmente (Knott & Dvórák, 1976; Aung & Kerber, 1998). As transferências envolvendo cromossomos homeólogos requerem técnicas especiais (Knott, 1989a). Se os cromossomos do genoma introduzido no trigo pareiam com pelo menos um dos genomas da espécie cultivada em presença do gene *Ph1*, do sistema de controle de pareamento homólogo, isto é um bom indicativo de estreita homologia entre os genomas, e de relativa facilidade na transferência de caracteres (Jauhar, 1993). Portanto, a utilização de organismos pouco relacionados aumenta a dificuldade de introdução de variação (Mujjeb-Kazi & Kimber, 1985).

A probabilidade de introdução de variação de alguns genomas é muito maior que outras, dependendo da quantidade de rearranjos ocorridos ao longo da história evolutiva das espécies (Kimber, 1993). Além disso, em hexaplóides anfiplóides os genomas A e B podem inibir a expressão de genes presentes no genoma D (Chevre *et al.*, 1989).

Como a transferência de genes implica na passagem de segmentos cromossômicos de uma espécie à outra, o segmento deve ser o menor possível, evitando-se a incorporação de outros caracteres indesejados, o que diminui a utilização dos genótipos produzidos (Moraes-Fernandes, 1985; Autrique *et al.*, 1995). Vários trabalhos realizados levaram à conclusão de que quanto menor o segmento inserido maior a probabilidade de sucesso na produção de variedades de interesse comercial (Kimber, 1993). Como o controle desta etapa é muito difícil, é comum que variedades comerciais resistentes não sejam produzidas diretamente, em função da quantidade de caracteres deletérios que são mantidos nos híbridos. Assim, são necessárias sucessivas gerações de retrocruzamento, o que faz com que um único híbrido produzido seja utilizado em diversos programas de melhoramento. Por exemplo, Knott (1989b) testou nove genótipos derivados

de cruzamentos com espécies selvagens após retrocruzamento, dos quais cinco apresentavam potencial para serem lançados como cultivar.

1.4.1. *Aegilops tauschii*

A classificação e nomenclatura dos membros do complexo trigo – espécies cultivadas e selvagens pertencentes aos gêneros *Triticum* e *Aegilops* - historicamente tem apresentado diversas discordâncias (Morrison, 1993), uma vez que este complexo é constituído por um grupo de espécies que apresenta formas naturais desenvolvidas por eventos de hibridação e poliploidia e formas domesticadas desenvolvidas por pressão de seleção artificial. Além disto, algumas espécies cruzam facilmente formando uma rede de introgressões e outras interconexões, o que dificulta ainda mais o esclarecimento das relações taxonômicas. Assim, muitos autores (revisão em van Slageren, 1993) colocam diversas espécies de *Aegilops* no gênero *Triticum*. Por exemplo, *Ae. squarrosa*, doador do genoma D do trigo, também denominado *Ae. tauschii*, mais recentemente passou a ser utilizado como sinonímia de *Triticum tauschii*.

Aegilops tauschii destaca-se, dentre os gêneros silvestres, como potencial candidato a doador de genes de interesse por apresentar alta homologia cromossômica com *T. aestivum*. Os cromossomos do genoma D de *Ae. tauschii* mostram completo pareamento com os cromossomos do genoma D de *T. aestivum* (Gill & Raupp, 1987). Apesar disto, a variabilidade encontrada no genoma D do trigo hexaplóide é muito menor do que a encontrada nas coleções de germoplasma da espécie doadora (Knaggs *et al.*, 2000), o que possibilita o uso de *Ae. tauschii* no melhoramento do trigo cultivado.

Segundo Cox *et al.* (1990), o uso da variabilidade genética de *Ae. tauschii* no melhoramento do trigo é justificado por muitas razões. Primeiramente, uma alta proporção dos acessos analisados é resistente a, pelo menos, uma doença e/ou praga do trigo. Por exemplo, Kerber & Dyck (1969) testaram 85 acessos de *Ae. tauschii* em campo e encontraram 10 que apresentavam resistência à ferrugem do colmo e 38 à ferrugem da folha, demonstrando que esta espécie é potencial fonte de resistência à ferrugem. Das 31 linhagens de *Ae. tauschii* testadas por Dhaliwal *et al.* (1993), 22 apresentaram resistência à ferrugem da folha. Neste trabalho foi demonstrada imensa variabilidade de resistência devido à

diversidade de respostas observadas com a inoculação de diferentes isolados de esporos em genótipos diversos. Avaliações de diferentes acessos de *Ae. tauschii* mantidos na Embrapa Trigo apresentaram bons resultados com referência a ocorrência de genes de resistência a doenças (Moraes-Fernandes *et al.*, 1980; Prestes *et al.*, 1994). Além de fonte de genes de resistência à ferrugem da folha, *Ae. tauschii* é um bom doador de genes que controlam algumas proteínas que conferem propriedades especiais de panificação (Knott, 1989a). Em segundo lugar, os genes de resistência podem ser transferidos para o trigo rapidamente por hibridação direta, seguida de resgate dos embriões da F1 e retrocruzamentos (Gill & Raupp, 1987; Cox *et al.*, 1995). E finalmente, a frequência de embriões abortivos, esterilidade ou disrupção na meiose do híbrido, é muito menor em cruzamentos entre trigo comum e *Ae. tauschii* do que com espécies com genomas A e B (Gill & Raupp, 1987).

Por todas estas razões, não poderiam ser previstos sérios obstáculos à produção de cultivares elite de trigo com genes de interesse de *Ae. tauschii*. Muitos híbridos envolvendo *Triticum* e as espécies do gênero *Aegilops* foram obtidos nas décadas de 20 e 30 (Kihara, 1937, apud Mujjeb-Kazi & Kimber, 1985; Mujjeb-Kazi & Rajaram, 2002), o que permitiu a obtenção de informações sobre as relações genômicas de tais gêneros. No entanto, os resultados em termos de melhoramento foram pouco satisfatórios. Cox *et al.* (1990 e 1995) atestaram a baixa performance agrônômica de linhas derivadas de cruzamentos diretos de *Aegilops squarrosa* X trigo, comprovando a diminuição da produção de grãos. O uso aplicado e em larga escala destes híbridos foi possível somente após o emprego da colchicina, que permitiu a produção de anfiplóides férteis.

1.5. Trigos Sintéticos

As dificuldades para o cruzamento direto de *T. aestivum* (AABBDD) com *Ae. tauschii* (DD), têm sido contornadas pelo uso de formas sintéticas do trigo hexaplóide. Estas formas são produzidas através do cruzamento entre as espécies tetraplóides (AABB) - *T. diccicum* ou *T. durum* - e *Ae. tauschii* (DD). Os híbridos trihaplóides (ABD) produzidos são amplamente estéreis, sendo a esterilidade causada por falha no pareamento dos cromossomos. A duplicação

dos cromossomos para produzir um aneuplóide, resultando na síntese artificial do trigo hexaplóide, pode restaurar a fertilidade. O procedimento básico é o cultivo *in vitro* do embrião trihaplóide imaturo, seguido pela aplicação da colchicina nas plântulas regeneradas.

A ressíntese de alopoliplóides naturais mostra um bom caminho para a introgressão de genes dos parentais silvestres (Cauderón, 1986). As formas sintéticas representam um produto qualitativamente novo onde o genoma da espécie afim torna-se disponível, por ser mais facilmente cruzado com a forma cultivada. Assim, procedimentos simples de cruzamentos acompanhados de seleção para a resistência são suficientes para a transferência de gene(s) de interesse (Davoyan *et al.*, 1998).

As vantagens da metodologia de obtenção destas linhagens sintéticas resultam da rapidez na obtenção de linhagens homozigotas. Através da duplicação com colchicina dos cromossomos do híbrido estéril ($2n=21$, ABD), é obtida em uma geração, uma fonte de resistência totalmente homozigota ($2n=42$, AABBDD). Devido à completa homologia cromossômica, é possível a partir desta nova linhagem, a transferência de características desejadas diretamente para as cultivares hexaplóides. Este método permite, em uma geração, a transferência de características presentes em espécies ancestrais distintas e impossíveis de serem combinadas através de metodologias convencionais de melhoramento.

Trabalhos de Mujeeb-Kazi, citados em Mujeeb-Kazi & Rajaram (2002), salientam que o cruzamento de hexaplóides sintéticos resistentes com cultivares elite suscetíveis tem produzido derivados resistentes e que estes têm sido usados globalmente em programas de melhoramento de trigo, seja na forma direta do sintético ou dos derivados F1 ou gerações subseqüentes dos cruzamentos destes com as cultivares.

O pareamento dos cromossomos nos híbridos é usualmente regular (Knott & Dvórák, 1976; Cauderón, 1986). No entanto, Gill & Raupp (1987) salientam que embora originalmente euplóides, os hexaplóides sintéticos podem exibir instabilidade cromossômica.

Kerber & Dyck (1969) e Dyck & Kerber (1970) utilizaram formas sintéticas do trigo para a transferência de dois genes de resistência à ferrugem da folha. Os

dois tipos de resistência doados pelo genoma D de *Ae. tauschii* foram devidos a genes dominantes ou parcialmente dominantes.

O desenvolvimento de anfiplóides sintéticos é uma das estratégias selecionadas pela EMBRAPA – Trigo, visando à transferência de genes de importância agrônômica de espécies selvagens afins para o trigo cultivado. Como resultado desta abordagem 11 genótipos sintéticos foram desenvolvidos em estudos de anos anteriores (Moraes-Fernandes, 1985; Moraes-Fernandes *et al.* 2000; Ariano Moraes Prestes, comunicação pessoal) e encontram-se no Banco de Germoplasma desta Instituição. Tais formas sintéticas foram obtidas a partir do cruzamento de variedades de *T. durum* com diferentes acessos *Ae. tauschii*. A caracterização destes genótipos quanto a atributos de interesse agrônômico e à estabilidade cromossômica é pré-requisito para sua utilização em programas de melhoramento.

1.6. A ferrugem da folha

A ferrugem da folha do trigo, algumas vezes chamada de ferrugem marrom, é causada pelo fungo *Puccinia triticina* (Anikster *et al.*, 1997), família Pucciniaceae, ordem Uredinales e classe Basidiomycetes.

A ferrugem da folha é a principal doença fúngica do trigo em todas as regiões do mundo em que o cereal é cultivado, podendo ser responsável por perdas entre 10% e 30% ou mais (Singh *et al.*, 2002). As infecções ocorrem sob condições favoráveis, alta densidade de inóculo do patógeno e em cultivares suscetíveis. O patógeno sobrevive nas mesmas condições de ambiente favoráveis ao desenvolvimento do trigo, e pode causar infecções se houver um período de 3 horas ou menos com umidade elevada e temperaturas ao redor de 20°C. A disseminação da doença pode ser muito rápida sob temperaturas entre 10 e 30°C (Roelfs *et al.*, 1992).

Os sintomas típicos da ferrugem da folha são o aparecimento de pústulas pequenas, redondas e alaranjadas. Em uma epidemia severa, quase toda a superfície das lâminas foliares pode ficar coberta com as pústulas. As folhas então senescem rapidamente e secam, privando a planta de boa parte de sua área fotossintética (Knott, 1989a).

O fungo ataca primariamente as lâminas foliares e em menor extensão a bainha e as glumas. Os danos da desfolhação prematura resultam em diminuição da produtividade.

As áreas mundiais de cultivo de trigo podem ser divididas em zonas epidemiológicas dentro das quais os esporos do fungo são difundidos livremente. A extensão dos danos depende do clima e da taxa de resistência das cultivares. Dentro de uma mesma área as variações de ano para ano dependem das condições climáticas (Knott, 1989a).

Na América do Sul, a ferrugem da folha é amplamente distribuída e pode causar danos significativos. Programas de melhoramento para resistência a esta doença têm sido conduzidos durante muitos anos em cultivares locais, que são posteriormente utilizadas mundialmente como recurso de resistência (Knott, 1989a).

No Brasil, todos os anos ocorrem prejuízos causados pela ferrugem da folha, sendo que a incidência nas diferentes regiões tritícolas varia de acordo com as condições climáticas, com a resistência dos genótipos presentes e utilização de controle químico. Além disso, a época de início da epidemia e a severidade que ela alcança também são fatores importantes que podem determinar o nível de dano econômico (Barcellos, 1994). Picinini & Fernandes (2001) relataram perdas de até 80% no rendimento de grãos e até 10 pontos percentuais no peso dos grãos colhidos na cultivar suscetível BR 34.

A população de *P. triticina* no Cone Sul é extremamente dinâmica (Barcellos, 2000; Antonelli, 2003; Barcellos & Turra, 2004; Germán *et al.*, 2004; Chaves *et al.* 2005). Um grande número de raças está geralmente presente a cada ano. Entretanto, o número de raças com frequências maiores de 10% variam de 1 a 4 por ano. As raças mais importantes de *P. triticina* presentes na região sul durante os últimos 8 anos foi descrita por Chaves *et al.* (2005).

1.6.1. O controle da ferrugem da folha

As ferrugens são controladas primariamente através de resistência genética, associada ao uso de fungicidas químicos. Alguns métodos de manejo

da cultura também são utilizados para diminuir o número de esporos disponíveis para a infecção (Knott, 1989a).

O controle químico ainda é a forma mais utilizada para evitar as perdas ocasionadas pela doença. Este método, no entanto, aumenta os custos de produção, pois exige a compra de produtos químicos, maquinaria adequada e mão-de-obra para sua aplicação. Além disso, envolve riscos à saúde humana e animal e ao ambiente (Moraes-Fernandes, 1987). Nesse contexto, fica evidente a necessidade da utilização de formas de controle mais eficientes e econômicas, aumentando as chances de sustentabilidade do sistema produtivo.

Certamente, uma combinação de práticas de controle culturais, com resistência genética e aplicação de fungicidas em situações especiais seria o meio mais efetivo de controle das ferrugens (Singh *et al.*, 2002).

O valor da resistência genética no controle de doenças de plantas é reconhecido há muito tempo. Os avanços na genética e as vantagens óbvias de plantar cultivares resistentes tornaram o melhoramento para resistência possível e desejável. Mais recentemente, a preocupação com o ambiente e a compreensão dos riscos de contaminação inerentes ao controle químico das doenças de plantas deu um maior ímpeto e importância ao melhoramento de cultivares resistentes (Agrios, 1997).

A resistência pode ser definida como a habilidade do hospedeiro impedir o crescimento e o desenvolvimento do patógeno (Parlevliet, 1997) através de um sistema de defesa ativo e direto (Barbieri & Carvalho, 2001). A resistência varietal à ferrugem pode ser obtida através da incorporação de um, de poucos ou de muitos genes de resistência em um genótipo (Agrios, 1997). Todas as cultivares devem ter níveis de resistência adequados para, além de evitar danos à cultura, reduzir a população do patógeno e suas alterações (Barcellos, 2001).

A busca de solução genética para as doenças encontra pelo menos duas ordens de dificuldades importantes: a primeira se relaciona ao aparecimento de novos biótipos dentro das espécies de fungos patogênicos e a segunda se refere à necessidade de incorporar em um só genótipo diferentes genes capazes de desenvolver resistência a várias moléstias fúngicas (Moraes-Fernandes, 1985). A resistência à ferrugem da folha pode ser a primeira estratégia na busca de

cultivares resistentes a outras doenças fúngicas, pois supõe-se que tal doença serviria de porta de entrada à patógenos oportunistas como *Stagonospora* e *Bipolaris*, por exemplo (Ariano Moraes Prestes- comunicação pessoal).

Tradicionalmente, os programas de melhoramento genético têm utilizado a resistência qualitativa, condicionada por genes maiores, em virtude da relativa facilidade com que pode ser transferida a cultivares com constituições genéticas superiores (Martinelli, 1994; Federizzi *et al.*, 1996). Este tipo de resistência, com algumas exceções, não é durável por longos períodos quando exposta a grandes áreas. Isto ocorre porque as ferrugens, sendo parasitas obrigatórios, coevoluíram com seus hospedeiros como componentes de um sistema muito influenciado pelas condições ecológicas, ou seja, qualquer mudança na população predominante do hospedeiro, resulta em mudanças subseqüentes na população do patógeno, para que o equilíbrio seja restabelecido (Wahl *et al.*, 1984; Barbieri & Carvalho, 2001).

A resistência do tipo imunidade, em que as folhas não apresentam nenhum sintoma da doença, nenhuma lesão, baseada em genes de resistência específica a raças, em poucos anos torna-se ineficaz devido ao surgimento de raças mutantes. Muitos são os exemplos de cultivares resistentes a todas as raças conhecidas e que se tornam suscetíveis por este motivo. No Brasil, essas quebras de resistência têm ocorrido com freqüência (Barcellos, 2001). Estas falhas são devidas ao inadequado conhecimento das virulências presentes na população de patógenos. Em outros casos, mutações e recombinações de virulências já existentes podem ocorrer em hospedeiros suscetíveis (Singh *et al.*, 2002). Assim, em muitos dos países produtores de trigo, os programas de melhoramento para introduzir a resistência parecem ser tarefa sem fim. Novas fontes de resistência são divulgadas e utilizadas e novas cultivares resistentes são desenvolvidas e liberadas para cultivo. Com o aumento das áreas plantadas com tais cultivares resistentes, novas raças virulentas do fungo aparecem, o que faz com que todo o programa de melhoramento tenha que começar novamente (Barcellos *et al.*, 1997). Como resultado, os melhoristas estão aumentando o interesse em tipos de resistência e métodos de utilização da resistência que resultem em controle estável das ferrugens (Knott, 1989a).

A resistência é considerada durável quando permanece efetiva apesar de seu uso por um longo período de tempo em grandes áreas, sob condições favoráveis à doença (Johnson, 1984). Para a interação trigo x ferrugem da folha, a resistência quantitativa que se expressa na fase adulta da planta (chamada de resistência de planta adulta – RPA) é a que tem mostrado maior durabilidade.

A resistência parcial ou quantitativa é definida como um tipo de resistência incompleta, em que, embora o hospedeiro apresente reação de suscetibilidade, verifica-se uma baixa taxa de desenvolvimento da doença (Parlevliet, 1979; 1985). Esta é uma alternativa, pois a doença avança com mais lentidão, a tal ponto que a presença do patógeno torne-se insignificante, para fins de produção (Barcellos, 2001).

Um grande número de genes de resistência à ferrugem da folha tem sido registrado (Roelfs *et al.*, 1992), estando localizados em diferentes cromossomos dos três genomas do trigo (Autrique *et al.*, 1995). Em torno de 50 genes para resistência à ferrugem da folha (designados genes *Lr*) têm sido catalogados (McIntosh *et al.*, 1998) e a virulência ocorre para a maioria deles. Segundo Schubert *et al.* (1993), 13 destes genes *Lr* foram introduzidos no trigo a partir de espécies afins de Triticineae, sendo cinco de *Ae. tauschii*. A utilidade e a durabilidade das resistências não parece estar associada com a espécie ou gênero doador (Singh *et al.*, 2002).

1.7. A citogenética em programas de melhoramento

A citogenética estuda os cromossomos, quanto à sua estrutura e suas funções mecânicas na divisão celular mitótica e meiótica (pareamento, permuta, orientação dos centrômeros, distribuição às células-filhas), bem como as implicações derivadas de alterações no seu comportamento (Moraes-Fernandes, 1985). É uma disciplina que se desenvolveu principalmente a partir do começo do século passado e seu progresso acompanhou o desenvolvimento das técnicas e equipamentos para microscopia. Na área vegetal, apresentou um grande avanço desde a década de 30 e, no caso do trigo, vem fornecendo uma contribuição valiosa ao melhoramento varietal (Moraes-Fernandes, 1982).

Graças aos avanços nesta área do conhecimento, os princípios dos cruzamentos foram entendidos e os melhoristas compreenderam as potencialidades e limites de métodos clássicos desenvolvidos antes do uso de técnicas de citogenética. Podendo então melhor controlar os cruzamentos, os melhoristas passaram a alterar o nível de ploidia, a transferir citoplasmas, a testar novas combinações citoplasma/genoma e a induzir trocas entre cromossomos que normalmente não pareiam. Assim, foi possível propor estratégias e métodos bem mais simples e realizáveis para a transferência de características desejáveis (Cauderón, 1986).

Em um programa de melhoramento, não são necessárias análises citogenéticas contínuas. Outros dados, como a fertilidade e a estabilidade de características morfológicas, podem ser indicativos de estabilidade meiótica. No entanto, muitos problemas práticos, como, por exemplo, diferenças estruturais devidas a translocações ou substituições cromossômicas, não podem ser resolvidos sem abordagens citogenéticas (Cauderón, 1986).

A manipulação cromossômica ou citogenética tem longa história na tribo Triticeae, e alcançou sucessos notáveis na área de melhoramento e análise genética. O número básico razoavelmente baixo de cromossomos ($n=7$), seu grande tamanho e a facilidade de obter boas preparações meióticas ou mitóticas, tornam as análises citogenéticas extremamente informativas (Heslop-Harrison, 1993).

O desenvolvimento de técnicas citogenéticas nos últimos 60 anos tem destacado o trigo dos demais cereais em relação às possibilidades de introduzir materiais genéticos de outras espécies (Moraes-Fernandes *et al.*, 2000). Os métodos de manipulação relacionados com a citogenética já permitiram a transferência de diversas características agronomicamente úteis, como a resistência a doenças fúngicas e pragas de espécies afins para cultivares adaptadas (Moraes-Fernandes, 1985).

1.7.1. Contribuições da hibridização *in situ* (HIS) para a citogenética de plantas

A técnica de hibridização *in situ* (HIS) consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma seqüência de nucleotídeos complementar situada dentro da célula, visando verificar se a célula possui essa seqüência e qual sua exata localização (Guerra, 2004). Para visualizar o segmento de DNA ou RNA hibridizado é necessário que ele esteja marcado com uma molécula de fácil identificação, funcionando como uma sonda para detectar a seqüência complementar de nucleotídeos (seqüência-alvo). Quando a molécula sinalizadora é um fluorocromo, a hibridização *in situ* é comumente denominada de FISH (Fluorescent *in situ* hybridization). A HIS se transformou em uma das técnicas mais informativas e elegantes da citologia, sendo aplicada em áreas tão diversas quanto a citotaxonomia, o melhoramento genético, a citogenética clínica e a biologia do desenvolvimento.

O uso da técnica de FISH nos estudos relativos à organização e evolução dos genomas em plantas, tem sido uma poderosa ferramenta para o mapeamento cromossômico permitindo a localização de seqüências de DNA ou de genes diretamente nos cromossomos. Nos últimos anos, a FISH tem ampliado consideravelmente o nível de análise e o campo de atuação da citogenética vegetal. O uso dessa técnica permitiu estabelecer novos tipos de marcadores cromossômicos para a análise cariotípica comparada, localizar genes e seqüências repetitivas ao longo dos cromossomos e construir mapas físicos para diferentes espécies de plantas. Esta técnica tem sido amplamente aplicada na identificação cromossômica e na citotaxonomia com contribuições ao entendimento da estrutura cromossômica, ao mapeamento físico e à diferenciação de genomas em híbridos e poliplóides. Na citogenética molecular de plantas, a FISH tem sido aplicada na detecção de genomas parentais em híbridos, segmentos exógenos em translocações e na determinação da localização de seqüências específicas.

A técnica de FISH tem revolucionado a citogenética de plantas em geral, mas em particular a citogenética de trigo, abrindo novas oportunidades para o melhoramento dessa espécie (para revisão ver Mukai, 2005). A nova era da

citogenética molecular nos cromossomos de trigo começou com a detecção autoradiográfica de hibridização *in situ* de sondas marcadas com radioatividade (Appels *et al.*, 1980; Gerlack & Peacock, 1980). Só em 1985, Rayburn & Gill aplicaram pela primeira vez as técnicas de marcação não isotópica utilizadas atualmente.

A partir da adoção de técnicas de hibridização *in situ*, o mapeamento físico de marcadores cromossômicos tem sido uma rotina que revolucionou a citogenética em plantas. Em função de dificuldades técnicas no mapeamento de seqüências de cópia simples, as seqüências altamente repetitivas têm sido aplicadas como marcadoras para a identificação de cromossomos de plantas.

A hibridização de seqüências repetidas *em tandem* revelou grande heterogeneidade na composição da heterocromatina constitutiva em várias espécies. Diferentes blocos de heterocromatina de um mesmo genoma podem apresentar diferentes arranjos e composição de seqüências.

Diversas famílias de DNA repetitivo e diversos microssatélites hibridizam de forma dispersa no genoma vegetal. Estas seqüências podem estar distribuídas uniformemente ao longo de todos os cromossomos ou relativamente mais amplificadas em alguns sítios específicos do genoma.

O trigo possui um genoma de 17000 Mb (Bennet & Smith, 1976), dos quais mais de 90% é de DNA repetitivo (Smith & Flavell, 1975). Entretanto a maioria das seqüências de DNA repetitivo clonado são seqüências do tipo retro-transposons e estão dispersas por todo o genoma, o que impossibilita que sejam usados como marcadores cromossômicos (Muñiz *et al.*, 2001). As seqüências de DNA repetitivo *em tandem* fornecem os melhores padrões de bandas para a hibridização *in situ* em cromossomos de trigo, incluindo a sonda *pAs1* isolada de *Ae. squarrosa* (*Ae. tauschii*) que identifica os cromossomos do genoma D do trigo hexaplóide (Rayburn & Gill, 1986), a *pSc119.2*, isolada de centeio que especialmente hibridiza com cromossomos do genoma B (McIntyre *et al.*, 1990) e a seqüência satélite GAA (Dennis *et al.*, 1980) que hibridiza em 16 pares de cromossomos, revelando o mesmo padrão de heterocromatina na técnica de bandeamento N (Pedersen *et al.*, 1996). Apesar de muitos braços cromossômicos do trigo permanecerem sem qualquer marca de hibridização, usando uma combinação

destas três sondas é possível identificar todo o complemento cromossômico do trigo hexaplóide (Mukai *et al.*, 1993; Pedersen & Langridge, 1997).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

Este estudo faz parte de um projeto mais amplo, coordenado por pesquisadores da EMBRAPA-Trigo, intitulado: “Desenvolvimento de estoques citogenéticos de trigo para a identificação, caracterização, mapeamento e transferência de genes de resistência à ferrugem da folha”.

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar a possibilidade de transferência de genes de resistência à ferrugem da folha da espécie ancestral *Aegilops tauschii* para o *Triticum aestivum*, através do uso de formas sintéticas de trigo.

2.1. Objetivos específicos

Avaliar a resistência à ferrugem da folha de trigos sintéticos disponíveis no banco de germoplasma da EMBRAPA-Trigo;

Realizar cruzamentos entre as formas sintéticas que apresentarem resistência à ferrugem da folha com cultivares comerciais de trigo brasileiro;

Analisar a estabilidade meiótica dos trigos sintéticos selecionados, das cultivares comerciais e de progênies F1, F2 e RC1F1 resultantes dos cruzamentos;

Verificar a transferência da característica de resistência ao longo das gerações avaliadas.

CAPÍTULO 3

ARTIGO



Cytogenetical analysis and leaf rust resistance evaluation in crosses between
Brazilian wheat cultivars and synthetic hexaploids

Artigo a ser submetido ao periódico Genetics and Molecular Biology

**Cytogenetical analysis and leaf rust resistance evaluation in crosses between
Brazilian wheat cultivars and synthetic hexaploids**

Milena Barcelos Cardoso¹, Eliane Kaltchuk-Santos¹, Ricardo Augusto Felicetti¹,
Márcia Soares Chaves², Sandra Patussi Brammer², Ariano Moraes Prestes² and
Maria Helena Bodanese-Zanettini¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500 – P.O. Box 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

² Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, EMBRAPA

Rodovia BR 285, km 294, P.O. Box 451, 99001-970, Passo Fundo - RS – Brazil

Phone: 00 55 51 3308-6725; Fax: 00 55 51 3308-1173

E-mail address: maria.zanettini@ufrgs.br

Running Title: Cytogenetical analysis in cultivars X synthetic wheat

Key words: Leaf rust, Meiotic index, Pollen viability, Synthetic hexaploids, *Triticum aestivum*

Abstract

Aegilops tauschii Coss. has primarily been used as source of genes for leaf rust resistance. Aiming to improve the resistance of cultivated wheat to this disease, four synthetic hexaploids, developed from *T. durum* L. X *Ae. tauschii*, were crossed with four Brazilian commercial wheat cultivars. Cytogenetical analyses were performed aiming to evaluate the meiotic stability of the synthetic hexaploids, cultivars and their F1, F2 and BC1F1 progenies. Meiotic indices (MI) varying from 85.1 to 94.1 indicated a relatively high cytological stability of the cultivars. Three synthetic forms presented MI varying from 78.2 to 80.6, indicating quite regular meiotic behavior. The fourth synthetic form presented statistically lower MI (40.4). Meiosis was studied in detail in some plants, showing that univalents and laggards were the causes of micronuclei formation. The frequency of viable pollen grains varied from 90.4 to 94.0% for *T. aestivum* cultivars and from 79.9 to 92.0% for synthetic forms. As in the case of MI, the comparison between general means showed that the frequencies of viable pollen grains are statistically higher in cultivars than in synthetic forms. The effect of cross combinations as well as generations on the MI and pollen viability was highly significant. However, in pollen viability, statistical analysis showed that interaction between cross combinations and generations, as well as their simple effects were significant. A tendency was clear in pollen viability and MI data, with crosses involving CD104 cultivar showing up repeatedly with higher means. On the other hand, combinations including BRS120 cultivar appear with the lowest means. The responses to the *Puccinia triticina* SPJ-RS race were evaluated over generations. Eight genotype combinations exhibited leaf rust resistance in all generations. Results confirm that *Ae. tauschii* can be used

as a valuable genetic source for improving leaf rust resistance in wheat cultivars, using synthetic hexaploid lines as a bridge.

Introduction

The 21 pairs of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell, $2n=6X=42$) chromosomes are classified in three genomes, A, B and D. These genomes represent the sets of chromosomes combined together from three distinct diploid species during the evolution of wheat (Kimber, 1974; Dvorák, 1988 and Dvorák *et al.* 1993). Nowadays, although the B genome donor is still uncertain, genomes A and D are derived from *T. urartu* Tum. ex. Gandil. (Dvorák, 1988 and Dvorák *et al.* 1993) and *Aegilops tauschii* Coss. (McFadden & Sears, 1946), respectively. *Triticum speltoides* Tausch. has been proposed as the donor of the B genome (Riley *et al.*, 1958; Dvorák & Zhang, 1990; Dvorák, 1998).

Ongoing crop cultivar improvement depends on a continued supply of genetic variability. This is most easily accessed from the primary gene pools of a particular crop. However, even though some 25,000 cultivars of wheat are available, variability from some traits such as resistance to various diseases does not exist in wheat (Fedak, 1998).

One well recognized means by which to increase the wheat gene pool is to introduce genes from wild related species. These species possess many identified agronomically favorable characteristics not readily found in the wheat (Feldman & Sears, 1981; Sharma & Gill, 1983). *Aegilops tauschii* may be the most useful of the many related species for improvement of wheat. The D genome demonstrates an unparalleled wealth of genetic diversity for several biotic and abiotic stresses (Mujeeb-Kazi & Rajaram, 2002).

Desirable genetic variation can be transferred from *Ae. tauschii* to *T. aestivum* via direct crosses (e.g. Gill & Raupp, 1987) or by synthesizing an allohexaploid of *Ae. tauschii* and tetraploid *T. turgidum* (e.g. Dyck & Kerber, 1970; Joppa *et al.*, 1980 and Eastwood *et al.*, 1991) or *T. durum* (Moraes-Fernandes *et al.*, 2000). Synthetic hexaploid wheat, produced by crossing durum wheat ($2n=4X=28$, AB genomes) with *Ae. tauschii* ($2n=2X=14$, DD genome) has been used as an intermediary for transferring resistance genes from the wild ancestor to cultivated wheat. The synthetic bridge is advantageous for wheat improvement, since it allows not only the *T. tauschii* resistance to be exploited but also incorporates the genetic diversity of the A and B genomes of the durum wheat. In addition, gene transfer is facilitated using an artificial amphiploid as a bridge since the species with the same ploidy level present a better crossing compatibility.

Leaf rust of wheat, caused by *Puccinia triticina*, is an important disease that limits production in many nontraditional hot, humid, wheat producing areas around the world (Roelfs *et al.*, 1992). Since this is a major disease, chemical control is applied in order to achieve crop production stability. Emphasis is also being given to an integrated pest management approach utilizing resistant cultivars. Though breeding for resistance is a high priority, it is hampered because there is insufficient resistance in *T. aestivum*.

The development of synthetic amphiploids is a strategy chosen by the EMBRAPA Trigo breeding program to transfer disease resistance, particularly to leaf rust, from *Ae. tauschii* to bread wheat. Genes conferring seedling rust resistance have been detected in the synthetic hexaploid derived from resistant *Ae. tauschii* accesses (Kerber & Dyck, 1969; Mujeeb-Kazi, 2001).

Four synthetic allohexaploid wheats developed by EMBRAPA Trigo from different *T. durum* cultivars and leaf rust resistant accessions of *Ae. tauschii* maintained the resistance expressed in the diploid parent. In the present work, the synthetic wheats were crossed with four Brazilian commercial wheat cultivars. F1, F2 and BC1F1 progenies were obtained from each cross combination. Cytogenetics analyses were performed aiming to evaluate the meiotic stability and pollen viability of the synthetic hexaploid, bread wheat cultivars and their progenies. The potential of synthetic hexaploid as a source of leaf rust resistance was evaluated by their maintenance over generations.

Material and methods

The synthetic hexaploids were obtained following the protocol described by Moraes-Fernandes *et al.* (2000). Briefly, cultivars of *T. durum* were used as the female parent and *Ae. tauschii* as the male parent. The female plants were emasculated when pollen grains in the anthers were still immature and pollinated with *Ae. tauschii* pollen. Embryo rescue for *in vitro* culture was done 14 days after pollination of the flowers to avoid endosperm degeneration. The *in vitro*-regenerated green plantlets were pre-treated for chromosome counting. After acclimatization in growth chamber, the plants were treated with 0.025% colchicine for chromosome duplication. The fully homozygous duplicated genotypes were identified as new synthetic lines.

The cytogenetical analysis included: four leaf rust resistant synthetic hexaploids (PF 844005, PF964001, PF964004 and PF964009), four susceptible Brazilian wheat cultivars (BRS Angico, BRS 120, BRS 209 and CD 104), and sixteen lines derived from crosses between Synthetics X Cultivars. The F1 hybrids were advanced to F2 and BC1F1 generations. The F2 generation was ensured by F1 self

pollination assured by spike bagging. The BC1F1 generation was produced by manual emasculation of flowers. Pollination was performed three days later using freshly dehiscent anthers from pollen donor parent. Since most of the seeds developed with normal embryo and endosperm, embryo rescue and *in vitro* culture were not required, and seeds were harvested at maturity. Plants were grown in greenhouses at Centro Nacional de Pesquisa de Trigo – EMBRAPA, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

At the appropriate stage, spikes were harvested and fixed in Carnoy's fluid (3 alcohol : 1 acetic acid - v/v) for 24 h and stored in a freezer. Anthers were squashed in a drop of 0.6% propionic carmine on glass slides and sealed under cover slip with bee's wax. The meiotic index was based on the percentage of normal quartets (Love, 1951). Ten plants of each genotype were used, and around of 200 tetrads were recorded per plant. Meiosis was studied in some plants in order to determine the possible reasons for the irregularities found in the quartets. Pollen stainability was used to indicate pollen viability. The stainability by propionic carmine was determined using samples consisting of 500 pollen grains per plant. Ten plants were analyzed per genotype. Slides were examined and documented with a Zeiss-Axioplan Universal photomicroscope.

Aiming to select resistant synthetic genotypes to be included in the present work, 11 hexaploid synthetic lines from the EMBRAPA Trigo Germplasm Bank were evaluated for leaf rust reactions. Four of them presented resistance and were crossed with susceptible Brazilian wheat cultivars. A subsequent experiment was carried out to evaluate *T. aestivum* cultivars, hexaploid synthetics and their F1, F2 and BC1F1 progenies, in order to verify whether leaf rust resistance was transferred through generations.

To evaluate the leaf rust resistance over generations, young leaves at 7 days of parental genotypes and their progenies (F1, F2 and BC1F1) were sprayed with SPJ-RS race uredospores of *Puccinia triticina* (Long & Kolmer, 1989), which was first detected in Brazil in 2002 and had a broader range of virulence at that time (Chaves & Barcellos, 2006). After one week, disease was evaluated based on type of infection according to Roelfs *et al.* (1992).

Statistical analysis was performed using ANOVA techniques for meiotic indices and pollen viability frequencies. The means were compared by Tukey test. The correlation between meiotic indices and pollen viability data was analyzed by t-test.

Results and discussion

Meiotic Index

The microspore tetrad stage has been used, either by itself or combined with other stages, as evidence of meiotic stability. Thus, observations of this stage can give an indication of the cytological state in materials which show promise in a breeding program. If lagging chromosomes or fragments are left in the cytoplasm at the end of the second meiotic division, they may form micronuclei (Figure 1G and 1H), which are most accurately recorded before the microspores separate from the tetrads. Love (1951) used the percentage of normal tetrads (those without micronuclei) which he termed the “meiotic index” as evidence of meiotic regularity. He considered that a meiotic index of 90 to 100 represented cytological stability, whereas values below 90 could lead to difficulties in plant breeding programs. However, the particular meiotic index selected can vary depending on the status of

the breeding material, as shown for lines derived from hybrids (Morris & Sears, 1967).

The results of the meiotic indices determined for the four Brazilian wheat cultivars and the four synthetic hexaploids are summarized in Table 1. In the cultivars, the meiotic index varied from 85.1 to 94.1, indicating relatively high cytological stability. No statistical differences were detected among cultivars. Overall, the percentage of plants with a meiotic index of less than 90 was 15%. Previous studies of Brazilian cultivars described a broad variation in meiotic index among the cultivars and in some cases within specific cultivars. Eight out of 19 varieties analyzed by Love (1951) presented all plants with meiotic indices higher than 90. Del Duca & Moraes-Fernandes (1980) found that just two out of 17 cultivars had all plants with meiotic indices greater than 90. Considering all cultivars, the percentage of plants with a meiotic index of less than 90 was 33% and 32% in Love's and Del Duca & Moraes-Fernandes's studies, respectively.

Three out of the four synthetic forms analyzed presented relatively high meiotic indices, indicating quite regular meiotic behavior. On the other hand, the meiotic index of PF844005 was statistically lower ($P < 0.01$, Table 1). We do not know any previous results in synthetic wheats which we could compare to our findings about the meiotic index. As expected, comparing overall means, the meiotic index was statistically lower in synthetic forms than in *T. aestivum* cultivars ($P < 0.01$).

Meiotic Behaviour

Previous studies of Brazilian wheat cultivars showed that micronuclei in tetrads result from two major types of meiotic abnormalities: 1) failure of pairing which lead to lagging univalents; and 2) lagging bivalents at anaphase I (Love, 1951).

Aiming to investigate the causes for micronuclei formation in tetrads, meiosis was studied in detail in some plants (Table 2; Figure 1). In the cultivars as well as in the synthetics, the irregularity observed at metaphase I (MI) was the presence of univalents (from 2 to 6; Figure 1A). The results presented here, for BRS Angico and BRS209 cultivars, are similar to those of previous studies in other wheat cultivars. The frequency of MI cells with univalents was usually within a range of 1 to 10%, with variations among cultivars (Riley & Kimber, 1961; Morris & Sears, 1967; Bodanese-Zanettini *et al.*, 1983). Considering the synthetic forms the frequency of MI cells with univalents was 4.3 and 29.4% for PF964009 and PF844005, respectively. The latter value is in agreement with results recorded in other studies on synthetics. Frequencies varying from 20.8 to 48.0% were reported for synthetic hexaploid wheats by Tabushi (1957, 1969) and Sasakuma & Kihara (1981). In contrast, PF964009 had a low frequency of MI cells with univalents (4.3%). These data corroborate those obtained through tetrad analysis since PF844005 and PF964009 presented the lowest and the highest meiotic index, respectively (Table 1).

The abnormalities observed at anaphase I (AI), presented in Table 2 included unequal segregation (Figure 1B), laggards (bivalents, Figure 1C; univalents, Figure 1D; and chromatids, Figure 1E) and bridges (Figure 1F). In the wheat cultivars and in the synthetic PF964009, the most frequent abnormalities were unequal segregation and bivalent laggards. In addition to these two irregularities, the synthetic PF844005 presented a high incidence of other aberrations, especially univalent and chromatid laggards. The high frequency of laggards was expected owing to the high frequency of univalents at MI described in this genotype.

Pollen Viability

Propionic carmine staining is a currently used method for evaluating pollen quality since it is correlated with pollen germinability (Heslop-Harrison *et al.*, 1984; Trognitz, 1991). The stainability of pollen grains (viable and inviable) by propionic carmine is presented in Figure 11.

The frequency of viable pollen grains varied from 90.4 to 94.0% for wheat cultivars (Table 1). Differences among wheat cultivars were not statistically significant at $\alpha=0.01$. Scarce data on pollen viability of wheat cultivars are available in literature. Sereno *et al.* (1981) reported a viable pollen frequency of 94.5% on the “Cinqüentenário” Brazilian cultivar.

Three synthetic forms exhibited pollen viability of around 80.0%, while PF964009 presented a corresponding value of 92.0%. However, the differences among means were not significant at $\alpha=0.01$. The frequencies of viable pollen recorded in the present study are within the range (77.3 to 98.7%) reported in previous studies of synthetic wheats (Kihara *et al.*, 1957; Tabushi, 1969; Sasakuma & Kihara, 1981).

As in the case of meiotic index, the comparison between general means showed that the frequencies of viable pollen grains are statistically higher in *T. aestivum* cultivars than in synthetic forms ($P<0.01$).

Cross Combination Analysis

Crosses involving four Brazilian wheat cultivars and four synthetic forms resulted in 16 genotype combinations. Two of them (PF844005 X BRS 209 and PF964001 X BRS 209) presented severe hybrid necrosis at F1 generation. The remaining 14 hybrids were evaluated at F1, F2 and BC1F1 generations. Hybrid

necrosis is the gradual premature death of leaves or plants in certain F1 wheat hybrids, and it is caused by the interaction of two dominant complementary genes *Ne1* and *Ne2* (Hermsen, 1963). The same author mentioned that all tetraploid *Triticum* species carry the *Ne1* gene. The presence of *Ne2* gene was identified in BRS209 and CD104 *T. aestivum* wheat cultivars (Sousa, 2002).

Meiotic Index

The simple effect of different cross combinations as well as different generations on the meiotic index was highly significant ($P < 0.01$, Table 3).

Among the tested combinations, BRSAngico X PF844005 and BRS120 X PF844005 presented the lowest meiotic indices (Table 4). The higher frequencies of irregularities observed in these combinations can be accounted by the irregular meiotic behavior of the synthetic parent (Table 2), that resulted in the lowest meiotic index among synthetic forms (Table 1). The irregularities present in a parent can lead to production of irregular progenies. Moraes-Fernandes *et al.* (1984) reported a significant correlation between data obtained for mother plants when compared with means obtained for each progeny on univalent occurrence ($r = 0.87$; $P < 0.001$).

Considering the overall means of analyzed generations, the F1 meiotic index (72.7) was significantly lower ($P < 0.01$) than those obtained for F2 (80.4) and BC1F1 (82.3).

Pollen Viability

Statistical analysis showed that interaction between cross combinations and generations, as well as their simple effects were significant ($P < 0.01$, Table 3).

Comparing means among generations within each cross combination, significant differences were detected in three (BRSAngico X PF844005; BRSAngico X PF964009 and BRS120 X PF964009) of the 14 cross combinations analyzed. In all of them, F2 showed significantly higher pollen viability than F1 and BC1F1 generations (data not shown). Similar results were obtained by Tabushi (1956) analyzing crosses between synthetic hexaploids and wheat cultivars. F1 generation presented 80% of pollen viability, while in F2 the frequency of viable pollen varied from 90.4 to 97.2%.

The comparison of cross combination means within each generation is presented in Table 5. Statistically significant differences among cross combinations were detected within F1 and BC1F1 generations. Clear trends were evident for the three sets of generation data, with crosses involving CD104 *T. aestivum* cultivar showing up consistently with higher means. On the other hand, combinations including BRS120 cultivar appeared with the lowest means. The same tendency was observed for meiotic indices data (Table 4). These results can be corroborated by a correlation detected between meiotic index and pollen viability data at $\alpha=0.05$, although the correlation index ($r=0.32$) is considered low.

Leaf rust resistance

Results of leaf rust reactions confirmed the resistance and susceptibility of synthetic and cultivated genotypes, respectively. The progenies data are presented in Table 6. Eight out of 14 genotype combinations analyzed exhibit resistance to the *Puccinia triticina* SPJ-RS race in all generations.

In an attempt to identify the best genotype combinations, the data on meiotic index, pollen viability and leaf rust resistance were plotted together (Figure 2).

Although the statistical analysis had not clearly discriminated the genotype combinations (Tables 4 and 5), the progenies obtained from CD104 X PF964004, CD104 X PF964009 and BRSAngico X PF964004 crosses showed leaf rust resistance and presented the highest meiotic stability. Thus, it would be advisable to give special attention to the genotype combinations that are in the next steps of the wheat breeding program. Concluding, results reported in the present work indicate that *Ae. tauschii* can be used as a valuable genetic source for improving leaf rust resistance in commercial wheat cultivars, using synthetic hexaploid lines as a bridge. Similar findings were obtained by Davoyan *et al.* (1998).

Acknowledgments

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS), and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

References

- Bodanese-Zanettini MH, Moraes-Fernandes MIB and Salzano FM (1983) Genetic and environmental effects on the frequency of meiotic disturbances in wheat. *Revista Brasileira de Genética* VI (1): 43-57.
- Chaves MS and Barcellos, AL (2006) Especialização fisiológica de *Puccinia triticina* no Brasil em 2002. *Fitopatologia Brasileira* 31:057-062.
- Davoyan RO, Bessarab KS, Bebyakina IV and Konyshiy E (1998) Use of synthetic forms to wheat improvement. *Proceedings of the International Wheat Genetics Symposium 9th* pp 193-195.
- Del Duca LJA and Moraes-Fernandes MIB (1980) Meiotic instability in some Brazilian wheat cultivars. *Cereal Research Communications* 8: 619-625.
- Dyck PL and Kerber ER (1970) Inheritance in hexaploid wheat of adult-plant leaf rust resistance derived from *Aegilops squarrosa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 12:175-180.
- Dvorák J (1988) Cytogenetical and molecular inferences about the evolution of wheat. *Proceedings of International Wheat Genetic Symposium 7th* pp. 187-192.
- Dvorák J (1998) Genome analysis in *Triticum Aegilops* alliance. *Proceedings of International Wheat Genetic Symposium 9th* pp. 8-11.
- Dvorák J and Zhang H-B (1990) Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of National Academy of Science USA* 87: 9640-9644.
- Dvorák J, Di Terlizzi P, Zhang H-B and Resta P (1993) The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21-31.

- Eastwood RF, Lagudah ES, Appels R, Hannah M and Kollmorgen JF (1991) *Triticum tauschii*: a novel source of resistance to cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*). Australian Journal of Agricultural Research 42: 69-77.
- Fedak G (1998) Procedures for transferring agronomic traits from alien species to crop plants. Proceedings of International Wheat Genetics Symposium, 9th pp. 1-7.
- Feldman M and Sears ER (1981) The wild gene resources of wheat. Scientific American 224: 102-112.
- Gill BS and Raupp WJ (1987) Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. Crop Science 27: 445-450.
- Hermesen JG (1963) Hybrid necrosis as a problem for the wheat breeder. Euphytica 12:1-16.
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y and Shivanna KR (1984) The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. Theoretical and Applied Genetics 67: 367-375.
- Joppa LR, Timian RG and Williams ND (1980) Inheritance of resistance to greenbug toxicity in an amphiploid of *Triticum turgidum*/*T. tauschii*. Crop Science 20: 343-344.
- Kerber ER and Dyck PL (1969) Inheritance in hexaploid wheat of leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 11: 639-647.
- Kihara H, Yamashita K, Tanaka M and Tabushi J (1957) Some aspects of the new amphidiploids synthesized from the hybrids, Emmer wheats x *Aegilops squarrosa* var. *strangulata*. Wheat Information Service 6:14-15.
- Kimber G (1974) A reassessment of the origin of the polyploid wheats. Genetics 78: 487-492.

- Long DL and Kolmer JA (1989) A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 79:525-529.
- Love RM (1951) Varietal differences in meiotic chromosome behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal* 43: 72-76.
- McFadden ES and Sears E (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity* 37: 81-89.
- Moraes-Fernandes MIB, Bodanese-Zanettini MH, Del Duca LJA, Guerra F^o M, Sereno MJC and Zanella CC (1984) Instabilidade cromossômica e adaptação em trigo. Resumos, I Colóquio sobre Citogenética e Evolução de Plantas, Piracicaba, SP, 17 a 19 de janeiro pp. 69-110.
- Moraes-Fernandes MIB, Zanatta ACA, Prestes AM, Caetano VR, Barcellos AL, Angra DC and Pandolfi V (2000) Cytogenetics and immature embryo culture at the Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease resistance from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat. *Genetics and Molecular Biology* 23 (4): 1051-1062.
- Morris R and Sears ER (1967) The cytogenetics of wheat and its relatives. In: *Wheat and wheat improvement* (Quisenberry, K.S. and Reitz, L.P. eds.) American Society of Agronomy, Inc., Madison, Chap. 2, pp. 19-87.
- Mujeeb-Kazi A (2001) Synthetic hexaploids for bread wheat improvement. *International Triticeae Symposium*, 4th pp.37.
- Mujeeb-Kazi A and Rajaram S (2002) Transferring alien genes from related species and genera for wheat improvement. In: *Bread Wheat Improvement and Production* pp. 199-215. FAO.
- Riley R, Unrau J and Chapman V (1958) Evidence on the origin of the B genome of wheat. *Journal of Heredity* 29: 91-98.

- Riley R and Kimber G (1961) Aneuploids and the cytogenetic structure of wheat varietal populations. *Heredity* 16: 275-290.
- Roelfs AP, Singh RP and Saari EE (1992) *Rust Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management*. Mexico, D. F.: CIMMYT.
- Sasakuma T and Kihara H (1981) A synthesized common wheat obtained from a triploid hybrid, *Aegilops squarrosa* var. *strangulate* (female) X *Triticum durum* (male). *Wheat Information Service* 52: 14-18.
- Sereno MJCM, Moraes-Fernandes MI and Bodanese-Zanettini MH (1981) Effects of pesticides, fungal disease and pests on the meiotic behavior of wheat. *Revista Brasileira de Genética* IV(4): 593-609.
- Sharma HC and Gill BS (1983) Current status of wide hybridization in wheat. *Euphytica* 32: 17-31.
- Sousa CNA (2002) Necrose híbrida em populações F1 de cruzamentos de trigo na Embrapa Trigo: resultados de 2001 e de 2002. Passo Fundo: Embrapa Trigo html. Embrapa Trigo Comunicado Técnico Online 109.
- Tabushi J (1956) Hybrids between synthesized 6x-wheat, ABD No. 4, and a Japanese commercial wheat variety, Norin No. 25. *Wheat Information Service* 3:14.
- Tabushi J (1957) Chromosome pairing in the progenies of synthesized 6x-wheat, ABD No. 4. *Wheat Information Service* 6:10.
- Tabushi J (1969) Chromosome pairing and fertility in some interespecific hybrids of synthesized hexaploid wheats. *Wheat Information Service* 29:17-20.
- Trognitz BR (1991) Comparison of different pollen viability assays to evaluate pollen fertility of potato dihaploids. *Euphytica* 56: 143-148.

Table 1: Meiotic indices and pollen viability in Brazilian wheat cultivars and synthetic forms included in breeding program.

Genotype	Meiotic Indices			Pollen Viability		
	No. of tetrads	% normal (range)	P>F	No. of pollen grains	% viable (range)	P>F
<i>T. aestivum</i> BRS Angico	2000	86.7 a (74.5-91.5)	0.38451	5000	93.4 a (89.2-96.8)	0.0162
<i>T. aestivum</i> BRS 120	2000	85.1 a (41.5-95.5)		5000	90.4 a (86.8-94.8)	
<i>T. aestivum</i> BRS 209	2000	90.0 a (70.0-96.0)		5000	94.0 a (90.0-97.4)	
<i>T. aestivum</i> CD 104	2000	94.1 a (86.0-95.5)		5000	93.0 a (90.0-95.8)	
Total <i>T. aestivum</i>		89.0 A			92.7 A	
Synthetic PF844005	1669	40.4 a (15.0-83.0)	0.00052	5000	85.9 a (79.8-91.0)	0.00662
Synthetic PF964001	1733	78.2 b (42.9-95.0)		5000	79.9 a (55.0-92.2)	
Synthetic PF964004	2000	78.8 b (66.0-88.5)		5000	80.0 a (63.4-95.2)	
Synthetic PF964009	1546	80.6 b (67.5-92.0)		5000	92.0 a (86.8-96.6)	
Total Synthetic		69.5 B			84.5 B	

Small letters to the right of means correspond to the comparison of means within *T. aestivum* cultivars and within synthetic forms.

Capital letters to the right of means correspond to the comparison among general means of *T. aestivum* X Synthetic forms.

Means accompanied by the same letter are not significantly different ($\alpha=0.01$)

Table 2: Frequency (in percentage) of pollen mother cells showing meiotic irregularities in bread wheat cultivars and synthetic forms.

	Wheat Cultivars		Synthetic Forms	
	BRS Angico	BRS 209	PF844005	PF964009
No. plants	8	11	5	16
No. cells in MI	33	37	34	46
Univalents	9.1%	10.9%	29.4%	4.3%
No. cells in AI	75	45	35	40
Unequal segregation	5.3%	4.4%	5.7%	5.0%
Bivalent Laggards	8.0%	8.9%	11.4%	2.5%
Univalent Laggards	0	0	11.4%	0
Chromatid Laggards	4%	0	17.1%	0
Bridges	0	0	5.7%	0
Total abnormalities at AI	17.3%	13.3%	51.4%	7.5%

Table 3: Analysis of variance for meiotic index and pollen viability frequencies of hybrid genotypes (*T. aestivum* X Synthetic).

Sources of Variation	Meiotic Index			Pollen Viability		
	df	Mean Square	P>F	df	Mean Square	P>F
Combination	13	851.208	0.00001	13	1490.323	0.00001
Generation	2	1424.804	0.0026	2	1300.562	0.00005
Comb. X Gener.	26	176.766	0.22633	210	377.141	0.00001
Error	126	144.074		210	103.142	
CV (%)	-	15.295		-	12.678	

Table 4: Meiotic index means of all genotype combinations.

Combinations	Means (Range)
CD104 X PF964001	87.6 A (61.5-95.5)
CD104 X PF844005	85.9 AB (52.9-98.5)
BRSAngico X PF964004	83.7 AB (75.0-93.0)
CD104 X PF964009	82.9 AB (58.5-94.0)
CD104 X PF964004	82.4 AB (69.0-94.5)
BRSAngico X PF964001	82.4 AB (63.5-93.5)
BRSAngico X PF964009	82.1 AB (64.5-96.5)
BRS120 X PF964009	81.4 AB (59.5-95.5)
BRS209 X PF964009	79.4 AB (27-94.5)
BRS209 X PF964004	78.0 AB (56.7-97.0)
BRS120 X PF964001	76.4 AB (38.3-92.0)
BRS120 X PF964004	73.4 ABC (37.0-91.5)
BRSAngico X PF844005	67.1 BC (65.5-85.0)
BRS120 X PF844005	55.62 C (24.0-80.5)

Means accompanied by the same letter are not significantly different ($\alpha=0.01$)

Table 5: Comparison among cross combinations within F1, F2 and BC1F1 generations on pollen viability frequencies.

Pollen Viability at F1 generation		Pollen Viability at F2 generation		Pollen Viability at BC1F1 generation	
Cross combinations	Means (Range)	Cross combinations	Means (Range)	Cross combinations	Means (Range)
CD104 X PF964001	89.8 A (84.8-93.6)	CD104 X PF964009	92.1 A (88.8-98.0)	CD104 X PF964001	95.8 A (87.6-98.0)
CD104 X PF844005	88.5 AB (65.0-97.4)	CD104 X PF844005	90.3 A (84.0-95.4)	CD104 X PF844005	94.9 A (91.4-98.6)
BRSAngico X PF964004	88.0 AB (83.2-92.6)	BRSAngico X PF964009	89.1 A (51.2-97.0)	CD104 X PF964009	94.6 A (91.6-98.2)
BRS209 X PF964004	85.0 AB (77.0-91.0)	CD104 X PF964001	89.0 A (70.6-95.0)	CD104 X PF964004	92.1 AB (85.0-94.2)
CD104 X PF964009	84.0 AB (57.4-92.6)	CD104 X PF964004	88.7 A (74.4-95.6)	BRSAngico X PF964004	85.8 AB (79.2-92.6)
BRSAngico X PF964001	83.3 ABC (55.2-95.2)	BRSAngico X PF844005	88.0 A (59.8-96.2)	BRSAngico X PF964001	83.0 AB (58.6-93.6)
CD104 X PF964004	81.1 ABC (57.0-91.6)	BRSAngico X PF964004	87.5 A (64.6-98.0)	BRS120 X PF964004	81.3 ABC (67.8-91.6)
BRS209 X PF964009	76.6 ABC (67.4-94.6)	BRSAngico X PF964001	86.1 A (58.4-96.2)	BRSAngico X PF844005	80.7 ABC (61.4-92.4)
BRS120 X PF844005	73.6 ABC (70.0-85.4)	BRS120 X PF964009	84.8 A (57.4-97.4)	BRS209 X PF964009	79.0 ABC (63.8-92.6)
BRS120 X PF964004	71.2 ABCD (54.4-85.2)	BRS120 X PF844005	78.3 A (54.4-93.4)	BRS209 X PF964004	77.0 ABC (51.0-97.0)
BRSAngico X PF844005	69.8 ABCD (62.2-87.4)	BRS120 X PF964001	78.0 A (47.4-87.2)	BRS120 X PF964001	76.8 ABC (50.0-88.8)
BRSAngico X PF964009	66.2 BCD (55.6-87.6)	BRS209 X PF964009	77.9 A (45.8-97.4)	BRS120 X PF844005	70.8 BC (50.4-78.4)
BRS120 X PF964001	61.3 CD (25.0-78.2)	BRS209 X PF964004	75.8 A (48.2-90.6)	BRSAngico X PF964009	60.2 CD (47.4-71.2)
BRS120 X PF964009	50.3 E (33.4-67.4)	BRS120 X PF964004	73.0 A (49.2-84.6)	BRS120 X PF964009	44.9 D (31.2-63.4)

Means accompanied by the same letter within generations (columns) are not significantly different ($\alpha=0.01$).

Table 6: Leaf rust reactions of F1, F2 and BC1F1 generations.

Cross Combination	F1 generation	F2 generation	BC1F1Generation
BRSAngico x PF844005	R	R	R
BRAngico x PF964001	R	R	R
BRSAngico x PF964004	R	R	R
BRSAngico x PF964009	R	R	S
BRS120 x PF844005	R	R	R
BRS120 x PF964001	R	R	S
BRS120 x PF964004	R	R	S
BRS120 x PF964009	R	R	R
BRS209 x PF844005	S	+	+
BRS209 x PF964001	S	+	+
BRS209 x PF964004	R	S	R
BRS209 x PF964009	R	R	R
CD104 x PF844005	S	S	S
CD104 x PF964001	R	S	S
CD104 x PF964004	R	R	R
CD104 x PF964009	R	R	R

S = susceptible; R = resistant; + = Hybrid necrosis

Figure 1: Types of meiotic abnormalities observed in wheat cultivars and synthetic forms (A) Univalents; (B) Unequal segregation (19/23); (C) Laggard bivalent; (D) Laggard univalent; (E) Laggard chromatids; (F) Bridge; (G) Tetrad with micronucleous; (H) Tetrad with microcyte; (I) viable (v) and inviable (i) pollen grains. Bars=10 μ m

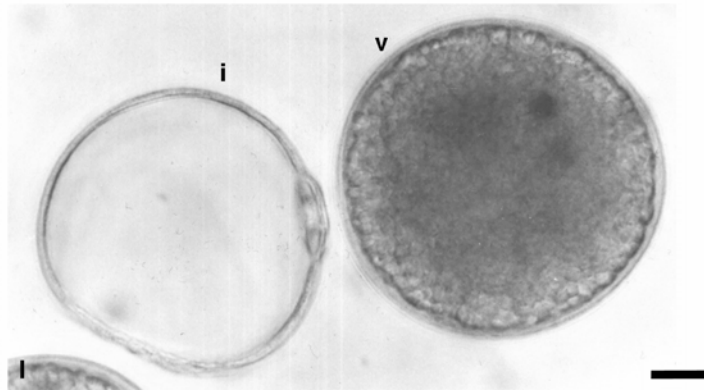
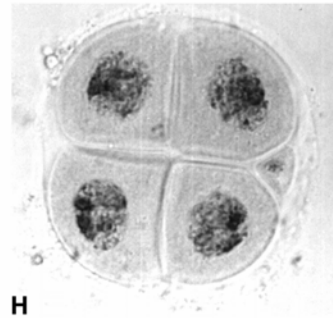
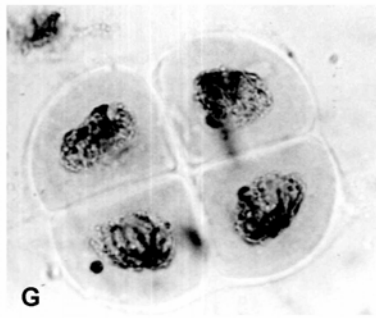
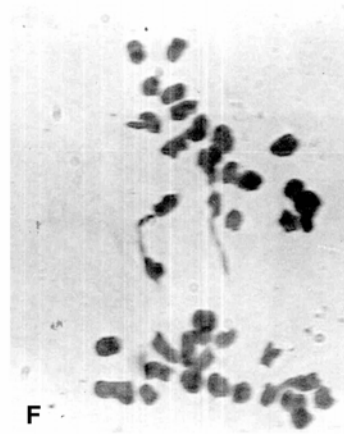
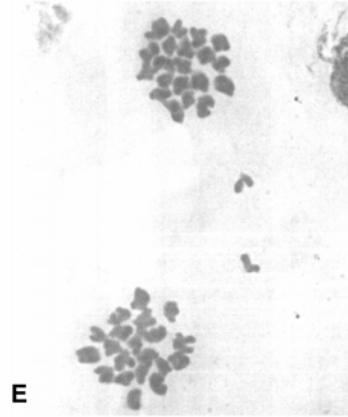
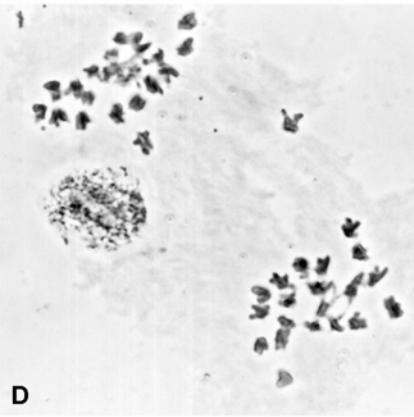
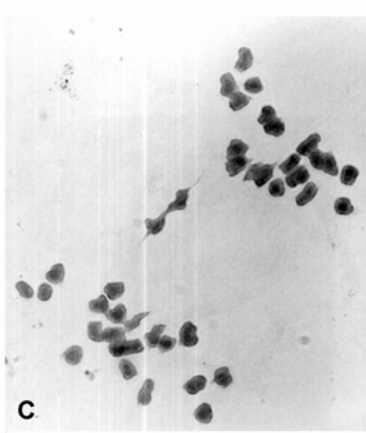
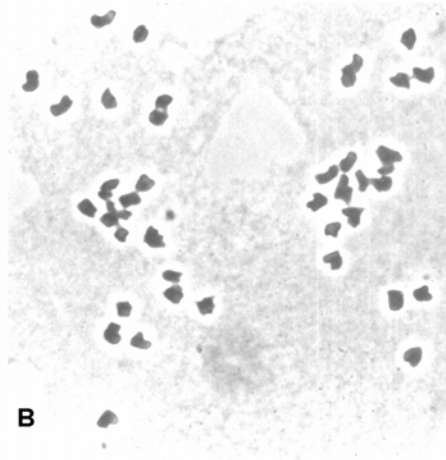
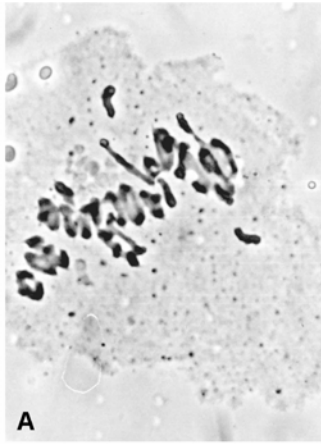
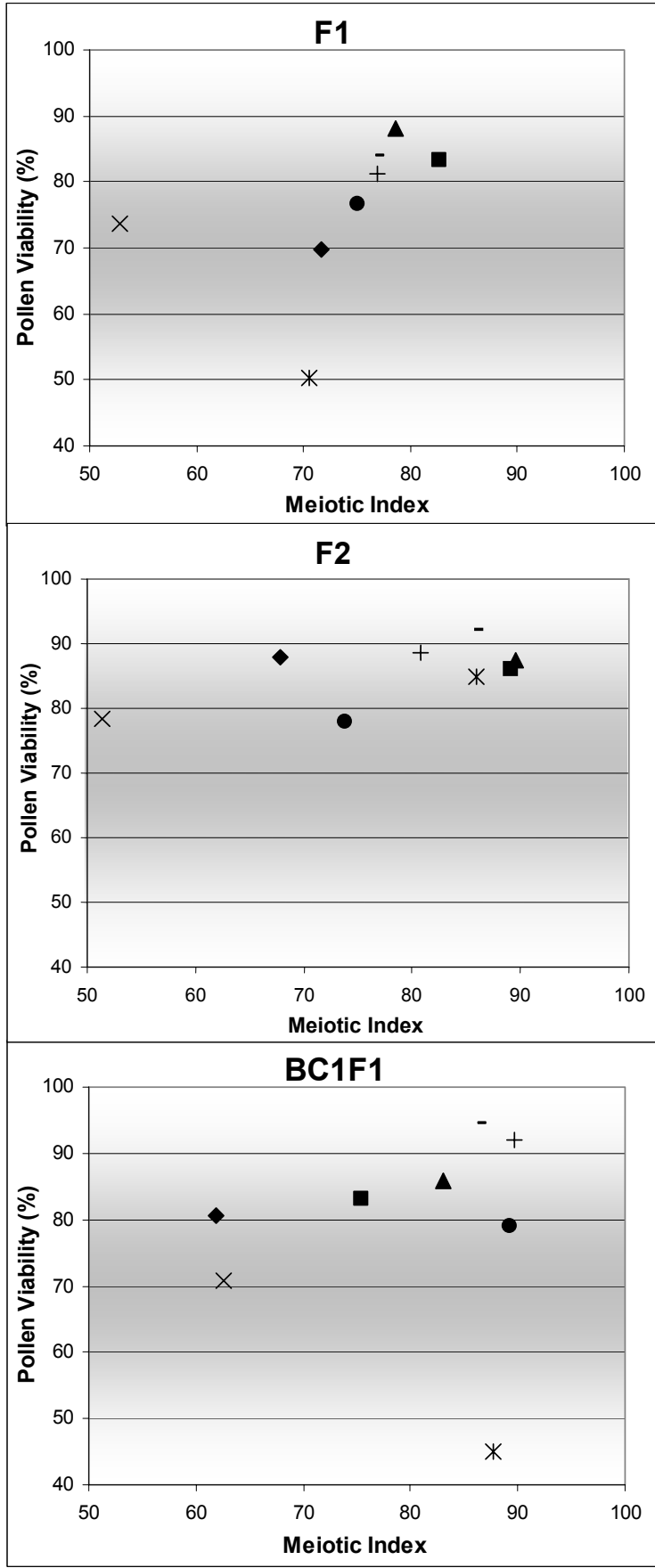


Figure 2: Graphical representation of meiotic stability in F1, F2 and BC1F1 generations of resistant genotype combinations. More stable combinations in all generations are encircled. Symbols: ◆ = BRSAngico X PF844005; ■ = BRSAngico X PF964001; ▲ = BRSAngico X PF964004; × = BRS120 X PF844005; * = BRS120 X PF964009; ● = BRS209 X PF964009; + = CD104 X PF964004; - = CD104 X PF964009.



CAPÍTULO 4

ARTIGO



Association of pollen size with ploidy level and pollen viability in *Triticum* species

Artigo submetido ao periódico Botanical Journal of the Linnean Society

ANEXO

ARTIGO



Novel physical markers for wheat chromosome identification using SSRs as FISH
probes

Artigo submetido ao periódico Theoretical and Applied Genetics



Association of pollen size with ploidy level and pollen viability in Triticum species

Journal:	<i>Botanical Journal of the Linnean Society</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cardoso, Milena; UFRGS, Genética Kaltchuk-Santos, Eliane; UFRGS, Genética Felicetti, Ricardo; UFRGS, Genética Brammer, Sandra; EMBRAPA Prestes, Ariano; EMBRAPA Bodanese-Zanettini, Maria; UFRGS, Genética
Keywords:	Poaceae < Taxa, pollen viability < Genetics, Triticum < Taxa



Association of pollen size with ploidy level and pollen viability in *Triticum* species

Milena Barcelos Cardoso¹

Eliane Kaltchuk-Santos¹

Ricardo Augusto Felicetti¹

Sandra Patussi Brammer²

Ariano Moraes Prestes²

Maria Helena Bodanese-Zanettini^{1,3}

1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500 – P.O. Box 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, EMBRAPA

Rodovia BR 285, km 294, P.O. Box 451, 99001-970, Passo Fundo - RS - Brazil

3 Author for correspondence

3 E-mail for correspondence: maria.zanettini@ufrgs.br

Running Title: Pollen size in *Triticum* species

ABSTRACT

Many species show a strong positive correlation between pollen size and ploidy level. However, differences in pollen size among species with different ploidy levels have not been described in *Triticum*. In this study, pollen grain size was examined in diploid ($2n=2X=14$, *Aegilops tauschii* = *T. tauschii*, one accession), tetraploid ($2n=4X=28$, *T. durum*, four commercial varieties), and hexaploid ($2n=6X=42$, *T. aestivum*, four Brazilian cultivars, and synthetic forms, four accessions) levels. The pollen grains with the smallest diameter (39.14 μm) were found in *Ae. tauschii*, the diploid species. The largest pollen grains (55.82 to 59.87 μm) were found in the hexaploids *T. aestivum* and synthetic forms. Intermediate values were observed in tetraploid accesses of *T. durum* (46.57 to 47.64 μm). The mean diameter of viable grains was significantly larger than those of inviable grains for all the studied genotypes. The significant differences found in pollen diameter could allow the use of particle counters to obtain a rapid estimate of ploidy level and pollen viability in *Triticum*.

KEY-WORDS

Poaceae - synthetic wheat - Triticeae

INTRODUCTION

Wheat species form a classical polyploid series consisting of a hexaploid, tetraploid and diploid levels. The hexaploid *Triticum aestivum* L. em Thell (genome AABBDD) is one of the most important crops worldwide. It was originated via hybridization of tetraploid wheat *T. turgidum* (genome AABB) with the diploid goatgrass *Aegilops tauschii* (= *T. tauschii*, genome DD) – for revision see Gill & Friebe (2002). *T. durum* is a tetraploid wheat (genome AABB) used as a commercial durum wheat.

Pollen biology has been a topic of much interest for many years to a large extent because of its implications for plant breeding (Johansen & Bothmer, 1994). However, general information on cereal pollen, the economically most important plant group, is still somewhat fragmentary, especially in more applied areas.

Several studies about pollen development and formation have been carried out for many years (for revision see Lersten, in Heyne, 1987). However, as far as we know, no differences in pollen size between species of different ploidy levels were described in *Triticum*.

It has been shown that there is a strong correlation of ploidy levels with morphometric parameters such as stomata density, branching pattern of trichomes or size of pollen grain (Speckmann, Post Jr. & Dijkstra, 1965; Borrino & Powell, 1988).

Pollen size is generally influenced by internal and external factors (genetical and environmental). Many species show a strong positive correlation between pollen size and the number of chromosomes or the ploidy level. Differences in pollen size between diploid and polyploid species are well known for the following genera: *Bouteloua* (Kapadia & Gould, 1964), *Hordeum* (Johansen & Bothmer, 1994), *Avena* (Katsiotis & Forsberg, 1995), *Rosa* (Jacob & Pierret, 2000), *Brunnera* (Bigazzi &

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4

Selvi, 2001), *Arabis* (Koch, Dobes & Michell-Olds., 2003), *Hylocereus* (Tel-Zur et al., 2003) and *Medicago* (Haas & Bingham, 2004).

Pollen quality is often equated to pollen viability, i.e., the proportion of viable pollen grains. Although viability can be measured by several methods (Alexander, 1980 and Heslop-Harrison, Heslop-Harrison & Shivanna, 1984), most of them are based on the counting of different types of pollen grains according to stainability reaction. While this approach can yield highly repeatable estimations of pollen viability, it is labor-intensive. Electronic particle counters provide an alternative to direct counts (Kelly, Rasch & Kalisz, 2002). However, this tool can be used to estimate the total number of pollen grains produced by a flower but not to distinguish stained and unstained grains.

This study presents data on pollen measures in *Triticum* species. Cytological analysis was performed in attempt to associate the pollen size to the ploidy level and pollen viability.

MATERIAL AND METHODS

The following taxa were used in this study: *Aegilops tauschii* ($2n=2X=14$, one accession), *T. durum* ($2n=4X=28$, four commercial varieties), *T. aestivum* ($2n=6X=42$, four Brazilian cultivars) and synthetic forms of wheat ($2n=6X=42$, four accessions). For details see table 1. The synthetic wheat genotypes were obtained from crosses between *T. durum* X *Ae. tauschii*. Accesses of *T. durum* were used as female parent and *Ae. tauschii* as male parent. The female plants were emasculated when pollen grains in the anthers were still immature and were pollinated with *Ae. tauschii* pollen several times to increase probability of successful fertilization. Embryo rescue for *in vitro* culture was done 14 days after pollination of the flowers to avoid endosperm

degeneration. The *in vitro*- regenerated green plantlets were pre-treated for chromosome counting and after acclimatizing in growth chamber, were then treated with 0.025% colchicine for chromosome duplication. The seeds of the fully homozygous duplicated genotypes were increased for identified as new lines (Moraes-Fernandes et al., 2000). Plants were grown in greenhouses or in growth chambers (21/18°C, 14/7 L/D) at Centro Nacional de Pesquisa de Trigo – EMBRAPA, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

Spikes with mature pollen grains were collected and fixed in Carnoy (alcohol 3:1 acetic acid). For microscopic analysis, the pollen grains released from the anthers were stained with propionic-carmin (figure 1a). Ten plants from each genotype were analyzed. The diameter of 10 stained and 10 unstained pollen grains was measured (figure 1b) for each plant. The pollen diameter was determined with measurement eyepieces. Photomicrographs were taken with a Zeiss-Axioplan Universal microscope.

Statistical analysis was performed using analysis of variance on the diameter of pollen and means were compared by Tukey test. Taxa were not included as a source of variation.

RESULTS AND DISCUSSION

Association between pollen size and ploidy level

The data on pollen grains diameter of different genotypes are presented in Table 1. The frequency distributions of pollen diameter for *Ae. tauschii*, *T. durum*, *T. aestivum* and synthetic forms are presented in figure 2a.

The *Triticum* genotypes analyzed showed a wide intrageneric variation in pollen size, as shown in figure 1c-f. On the other hand the pollen grain size was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

6

quite uniform for each species. The smallest pollen grains (39.14 μm) were found in *Ae. tauschii*, the diploid species. The largest pollen grains (55.82 to 59.87 μm) were found in the hexaploids *T. aestivum* and synthetic forms. Intermediate values were observed in tetraploid accesses of *T. durum* (46.57 to 47.64 μm). Significant differences in pollen size were detected among species ($P < 0.001$). These results confirmed the association between pollen size and ploidy level in *Triticum* as demonstrated for other genera (Kapadia & Gould, 1964; Johansen & Bothmer, 1994; Katsiotis & Forsberg, 1995; Jacob & Pierret, 2000; Bigazzi & Selvi, 2001; Koch et al., 2003; Tel-Zur et al., 2003; Haas & Bingham, 2004). The association between pollen size and ploidy level would allow pollen grains to be used to diagnose the ploidy level by flow cytometry much faster and easier than chromosomal analysis (Kelly et al., 2002).

Polyploid populations show considerable ecological, morphological and genetic differences compared to their corresponding diploids. Although a higher ploidy number has been associate with larger pollen (Muller, 1979), according to Stebbins (1971) this correlation is only consistent for autopolyploids. However, Johansen & Bothmer (1994) and Katsiotis & Forsberg (1995) found such a correlation for *Hordeum* and *Avena* allopolyploid series, respectively. Our results indicate that the association is also consistent for allopolyploid wheat species.

Based on algebra and geometry methods, Haas & Bingham (2004) proposed a scale to predict pollen diameters for different ploidy levels of alfalfa species. According to the authors, a normal pollen grain (n) corresponds to one unit of diameter; $2n$ and $3n$ grains would present diameters corresponding to 1.26 and 1.44 units, respectively. Using the proposed scale and considering that a pollen grain (n) of *Ae. tauschii* presented 39,14 μm diameter, the expected size for $2n$ and $3n$ grains

would be 49.31 μ m and 56.36 μ m , respectively. The predicted values are very similar to those obtained for the pollen of tetraploid (47.01 μ m) and hexaploid (57.63 μ m) wheat species analyzed in the present work.

Johansen & Bothmer (1994) observed that the increase in pollen grain diameter in *Hordeum* species is partially due to the increased volume of the nucleus in polyploid individuals. However, they explain that ploidy level alone does not determine the absolute size of the individual pollen grain. According to the authors, pollen grain size is also determined by at least one other factor, the breeding system. As all *Triticum* taxa included in the present study are inbreeding, the variation observed is probably due only to ploidy level.

Association between pollen size and pollen viability

In the course of the cytological analysis, an apparent relationship was observed between pollen size and viability (figure 1a). Aiming to investigate that possible association, samples of unstained (inviable) pollen grains were also analyzed. The mean diameter of viable grains was significantly larger than those of inviable grains for all the studied genotypes. Data are presented in Table 2 and Figure 2b – 2e.

Despite the slight overlapping of viable and inviable size distributions, it was possible to identify a clear distinction between the two groups. Viable grains were mostly larger than 36, 44 and 50 μ m for *Ae. tauschii*, *T. durum* and *T. aestivum*/synthetic forms, respectively.

Our results indicated that pollen diameter is a useful tool for a rapid pre-screening of pollen viability with particle counters by flow cytometry. This purpose is based on the assumption that viable pollen grains would be included in the upper count while inviable grains would be included primarily in the lower count. Similar

1
2
3
4 results were reported for *Mimulus guttatus* and *Collinsia verna* pollen (Kelly et al.,
5
6
7 2002).
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Márcia Soares Chaves (EMBRAPA-Trigo), for her invaluable help in statistical analysis and interpretation of the results.

This study was supported by EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

PDF Proof

REFERENCES

- Alexander MP. 1980.** A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* 55: 13-18.
- Bigazzi M, Selvi F. 2001.** Karyotype morphology and cytogeography in *Brunnera* and *Cynoglottis* (Boraginaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 365-378.
- Borrino EM, Powell W. 1988.** Stomata guard cells length as an indicator of ploidy in microspore-derived plants of barley. *Genome* 30: 158-160.
- Gill BB, Friebe B. 2002.** Cytogenetics, phylogeny and evolution of cultivated wheats. In Curtis BC, Rajaram S, Gómes Macpherson H, eds. *Bread Wheat Improvement and Production*, 71-88. FAO
- Haas TJ, Bingham ET. 2004.** Alfalfa with n, 2n, and 4n gametes: Predicted and actual pollen diameter ratios. *Medicago Genetic Reports* 4. Website www.medicago-reports.org [accessed 11 May 2007].
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y, Shivanna KR. 1984.** The evaluation of pollen quality, and further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical and Applied Genetics* 67: 367-375.
- Jacob Y, Pierret V. 2000.** Pollen size and ploidy level in the genus *Rosa*. *Acta Horticulturae* (ISHS) 508: 289-292. Website www.actahort.org/books/508/508_48.htm
- Johansen B, Bothmer R. 1994.** Pollen size in *Hordeum* L.: correlation between size, ploidy level and breeding system. *Sexual Plant Reproduction* 7: 259-263.
- Kapadia ZJ, Gould FW. 1964.** Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex. III Pollen size as related to chromosome numbers. *American Journal of Botany* 51(2): 166-172.

- 1
2
3
4 **Katsiotis A, Forsberg RA. 1995.** Pollen grain size in four ploidy levels of genus
5
6 *Avena*. *Euphytica* 83(2): 103-108.
7
8
- 9 **Kelly JK, Rasch A, Kalisz S. 2002.** A method to estimate pollen viability from pollen
10
11 size variation. *American Journal of Botany* 89(6): 1021-1023.
12
13
- 14 **Koch MA, Dobes C, Michell-Olds T. 2003.** Multiple hybrid formation in natural
15
16 populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear
17
18 ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae).
19
20 *Molecular Biology Evolution* 20(3): 338-350.
21
22
- 23 **Lersten NR. 1987.** Morphology and Anatomy of the wheat plant. In E. G. HEYNE
24
25 (ed.), *Wheat and wheat improvement*, second edition, 33-75. Madison,
26
27 Wisconsin, USA.
28
29
- 30 **Moraes-Fernandes MIB, Zanatta ACA, Prestes AM, Caetano VR, Barcellos AL,**
31
32 **Angra DC, Pandolfi V. 2000.** Cytogenetics and immature embryo culture at the
33
34 Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease resistance from related
35
36 species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em
37
38 Thell). *Genetics and Molecular Biology* 23 (4): 1051-1062.
39
40
- 41 **Muller J. 1979.** Form and function in angiosperm pollen. *Annual Missouri Botanical*
42
43 *Garden* 66: 593-692.
44
45
- 46 **Speckmann GJ, Post Jr. J, Dijkstra H. 1965.** The length of stomata as an indicator
47
48 for polyploidy in rye-grasses. *Euphytica* 14: 225-230.
49
50
- 51 **Stebbins GL. 1971.** *Chromosome evolution in higher plants*. Edward Arnold,
52
53 London, England.
54
55
- 56 **Tel-Zur N, Abbo S, Bar-Zvi D, Mizrahi Y. 2003.** Chromosome doubling in Vine cacti
57
58 hybrids. *Journal of Heredity* 94(4): 329-333.
59
60

12

Figure 1: Pollen grains in *Triticum* species. a) viable (v) and inviable (i) grains; b) measurement of pollen diameter; c) *Aegilops tauschii* (= *T. tauschii*); d) *T. durum*; e) *T. aestivum*; f) Synthetic form. Bars=10 μm

PDF Proof

Figure 2: (a) Distribution of pollen size in *Triticum* species; (b), (c), (d) and (e) distribution of pollen grain diameters for viable and inviable grains for *Ae. tauschii* (b), *T. durum* (c); *T. aestivum* (d); and Synthetic forms (e).

PDF Proof

Table 1: *Triticum* species investigated. The accessions or cultivar names and genome type are given for each species.

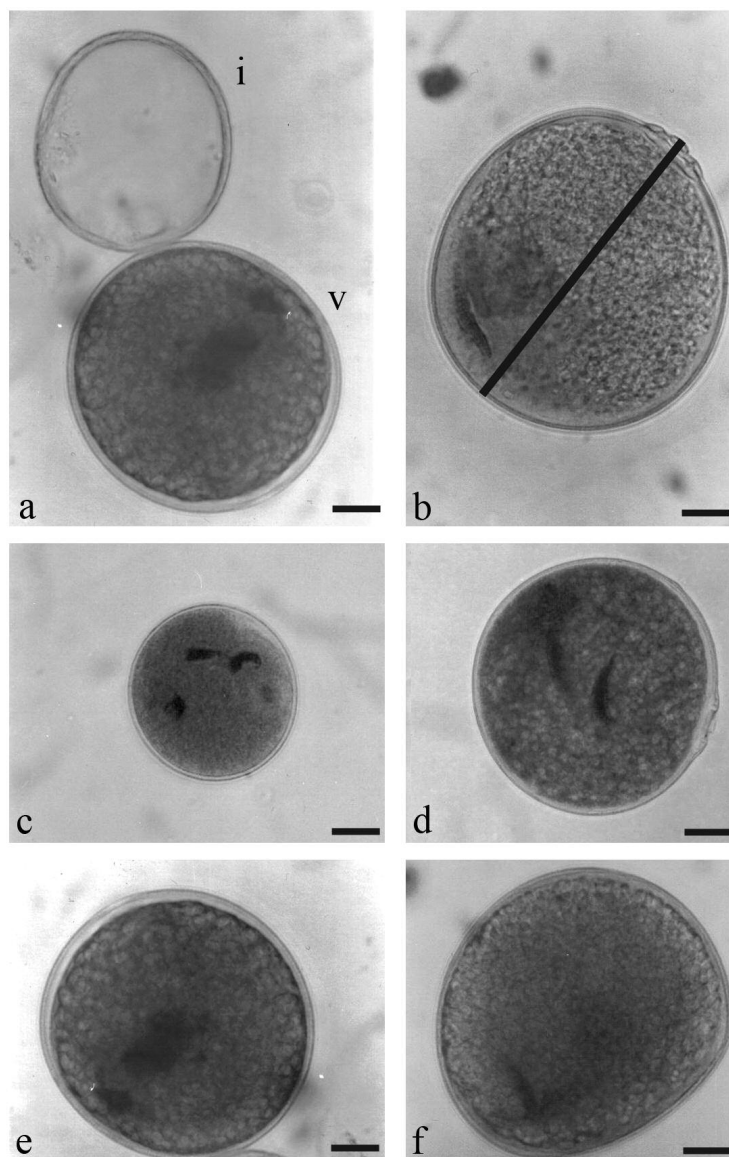
Taxa	Genotypes	Genome	Viable pollen size (μm , mean values \pm sd)	CV (%)
<i>Aegilops tauschii</i>	NE 20195	DD=2X= 14	39.14 ^A \pm 1.85	4.73
<i>Triticum durum</i>	Duílio	AABB=4X= 28	46.58 ^B \pm 2.68	5.74
	Hércules	AABB=4X= 28	46.73 ^B \pm 3.23	6.92
	Latínio	AABB=4X= 28	47.08 ^B \pm 2.80	5.94
	Peléo	AABB=4X= 28	47.64 ^B \pm 3.93	8.25
<i>Triticum aestivum</i>	BRS 120	AABBDD=6X=42	55.82 ^C \pm 1.84	3.30
	CD 104	AABBDD=6X=42	56.67 ^C \pm 2.52	4.45
	BRS Angico	AABBDD=6X=42	56.82 ^C \pm 2.48	4.37
	BRS 209	AABBDD=6X=42	59.87 ^C \pm 3.28	5.48
Synthetic	PF 964009	AABBDD=6X=42	57.03 ^C \pm 2.22	3.90
	PF844005	AABBDD=6X=42	57.91 ^C \pm 3.28	5.67
	PF 964004	AABBDD=6X=42	58.73 ^C \pm 4.77	8.17
	PF 964001	AABBDD=6X=42	58.51 ^C \pm 2.77	4.73

Notes: Means followed by the same character are not significantly different ($P < 0.001$)

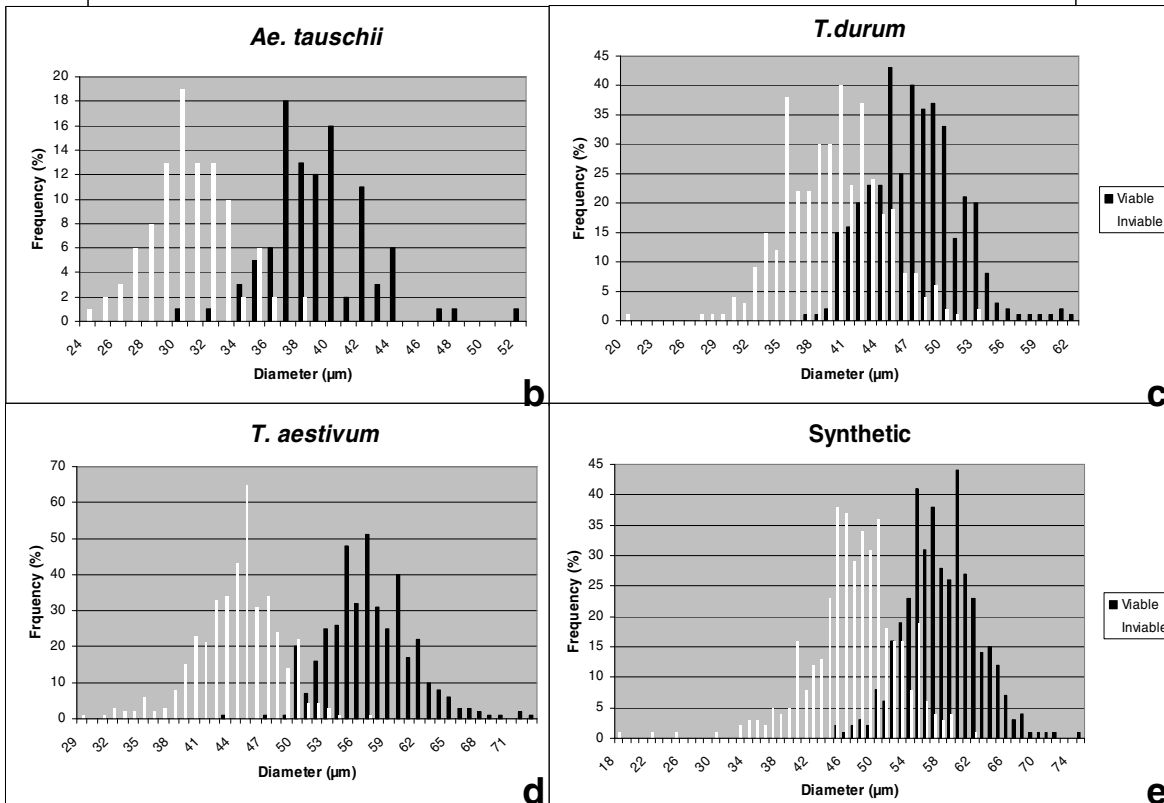
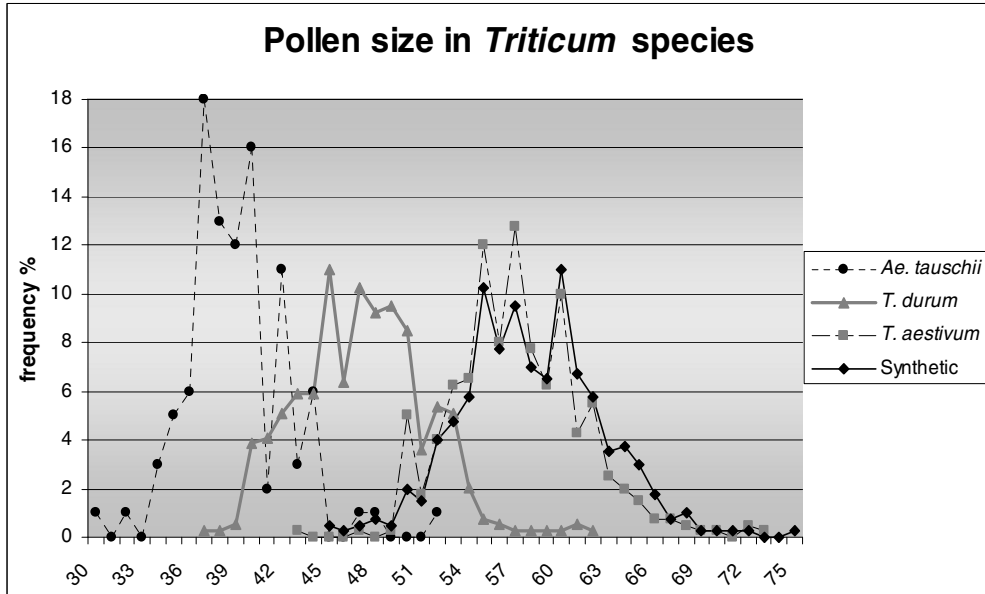
Table 2: Pollen grain diameter means for viable and inviable grains.

Taxa	Mean values (μm) Viable pollen	Mean values (μm) Inviable pollen
NE 20195	39.14 ^a	30.43 ^b
Duílio	46.58 ^a	37.87 ^b
Hércules	46.73 ^a	40.88 ^b
Latínio	47.08 ^a	40.09 ^b
Peléo	47.64 ^a	37.55 ^b
BRS 120	55.82 ^a	43.62 ^b
CD104	56.67 ^a	44.59 ^b
BRS Angico	56.82 ^a	43.60 ^b
BRS 209	59.87 ^a	44.85 ^b
PF964009	57.03 ^a	47.38 ^b
PF844005	57.91 ^a	47.07 ^b
PF964004	58.73 ^a	46.50 ^b
PF964001	58.51 ^a	46.98 ^b
General Mean	52.96	42.42

Note: Comparison within taxa, between viable and inviable pollen. $P < 0.001$



**Figure 1: Pollen grains in Triticum species. a) viable (v) and inviable (i) grains; b) measurement of pollen diameter; c) *Aegilops tauschii* (=T. tauschii); d) *T. durum*; e) *T. aestivum*; f) Synthetic form. Bars=10 µm^μ
99x150mm (300 x 300 DPI)**



CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em países como a França, Inglaterra, Canadá, Alemanha, Austrália, Estados Unidos, entre outros, a citogenética tem servido de base aos programas de melhoramento, tanto através do mapeamento genético de caracteres, como da transferência de genes desejáveis de espécies selvagens para o trigo comum.

Desde a primeira iniciativa da Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul ao convidar o Dr. Merton Love, pesquisador canadense, a realizar estudos citogenéticos em trigos brasileiros (Love, 1951), a intenção era a da integração e utilização de técnicas de citogenética em programas de melhoramento nacionais. No entanto, após a sua partida, os estudos do comportamento cromossômico com este objetivo nos materiais nacionais tiveram pouca continuidade. Somente 22 anos mais tarde, a partir de 1973, a Dra. Maria Irene Baggio criou no Departamento de Genética da UFRGS uma linha de pesquisa em citogenética de trigo, tendo sido executadas quatro dissertações de mestrado. Em 1975, com a transferência da Dra. Maria Irene para a EMBRAPA, foi instalado o laboratório de citogenética no Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT) em Passo Fundo. Durante todo este período foi sendo acumulado um volume de informações apreciável sobre a instabilidade cromossômica e adaptação de trigo cultivado no RS. Foram realizados sobretudo estudos visando avaliar o papel do ambiente (com a determinação da influência de fatores bióticos e abióticos) sobre esta elevada instabilidade cromossômica (revisão em Moraes-Fernandes *et al.*, 1984). Numa cultura cujo produto econômico é a semente, é fundamental a identificação dos fatores que acarretam altas taxas de anormalidades. Para o trigo, uma meiose regular é de suma importância para sua adaptação e manutenção da produtividade. Falhas no sistema reprodutivo, se recorrentes, tenderiam a aumentar de tal modo as freqüências de tipos aberrantes que descaracterizariam uma cultivar, sendo responsáveis por sua deterioração.

Neste sentido, dentro de um amplo projeto proposto pela EMBRAPA Trigo, o presente estudo resultou da integração entre equipes de duas instituições

públicas de pesquisa (EMBRAPA/UFRGS). As análises citogenéticas realizadas constituem subsídios para o programa de melhoramento genético do trigo.

Cruzamentos foram realizados visando a introgressão de genes de resistência à ferrugem da folha, sabidamente presentes em *Ae. tauschii* (Kerber & Dyck, 1969; Moraes-Fernandes *et al.*, 1980; Cox *et al.*, 1990; Dhaliwal *et al.*, 1993; Prestes *et al.*, 1994) para o trigo comum. Para facilitar o pareamento dos cromossomos e aumentar a eficiência da transferência dos genes de interesse, foram usados como ponte os trigos sintéticos já disponíveis no banco de germoplasma da EMBRAPA. Dentre os 11 genótipos de trigo hexaplóide sintético já disponíveis, desenvolvidos em estudos de anos anteriores (Moraes-Fernandes, 1985; Moraes-Fernandes *et al.* 2000; Ariano Moraes Prestes, comunicação pessoal) foram selecionados quatro que apresentavam resistência à ferrugem da folha. Os sintéticos selecionados foram então cruzados com quatro cultivares elite atuais e extremamente suscetíveis a esta enfermidade do trigo. Os estudos citológicos das 16 combinações de genótipos ao longo de três gerações (F1, F2 e RC1F1) permitiram a indicação de combinações mais promissoras.

A análise da fertilidade das plantas oriundas de cruzamentos mediante a determinação do índice meiótico e da viabilidade do pólen permite avaliar a estabilidade meiótica das mesmas. Em função do pareamento e permutas cromossômicas serem pré-requisitos à passagem de genes desejáveis de um genoma a outro (Knott, 1989a), a análise de anormalidades do tipo micronúcleos, que decorrem de falhas de pareamento e segregação, permite avaliar as probabilidades de transferência destes caracteres.

Estudos de reação ao patógeno nas diferentes combinações de cruzamentos, e nas gerações subseqüentes foram realizados a fim de avaliar a relação entre a transferência da característica e a estabilidade meiótica. Tais análises permitiram a confirmação de que as combinações mais estáveis citologicamente tinham maior probabilidade de transferência e manutenção da resistência ao longo das gerações (artigo no capítulo 3).

Além dos objetivos originais, que incluíam análises referentes à fertilidade (estudo de pareamento e segregação cromossômica, índice meiótico e viabilidade do pólen) do material estudado, ao longo do desenvolvimento do projeto foram

feitas algumas observações que levaram à coleta de dados não prevista no início da investigação. Desde o princípio da análise da viabilidade do pólen dos pais utilizados nos cruzamentos que geraram os sintéticos, foi observada uma substancial diferença no tamanho dos grãos de pólen, que aparentemente estaria relacionada ao nível de ploidia, isto considerando-se o nível diplóide (*Ae. tauschii*), tetraplóide (*T. durum*) e hexaplóide (*T. aestivum* e sintéticos). A revisão bibliográfica permitiu a verificação de que este era um padrão comum para outras séries poliplóides dentro dos gêneros *Bouteloua* (Kapadia & Gould, 1964), *Hordeum* (Johansen & Bothmer, 1994), *Avena* (Katsiotis & Forsberg, 1995), *Rosa* (Jacob & Pierret, 2000), *Brunnera* (Bigazzi & Selvi, 2001), *Arabis* (Koch et. al., 2003), *Hylocereus* (Tel-Zur et al., 2003) e *Medicago* (Haas & Bingham, 2004). Contudo, não foram encontradas na literatura referências descrevendo tal associação para as espécies do gênero *Triticum*. Os dados obtidos possibilitaram a redação de um artigo adicional (capítulo 4). Além da correlação entre tamanho dos grãos de pólen e os níveis de ploidia, é relatado neste artigo que as diferenças de tamanho detectadas entre grãos de pólen viáveis e inviáveis foram significativas em todas as espécies estudadas. Estes dados permitiram a sugestão de técnica mais rápida e fácil de determinação da viabilidade do pólen em espécies de *Triticum*, baseada no tamanho do grão de pólen, como já recomendado para *Mimulus guttatus* e *Collinsia verna* (Kelly et al., 2002).

Os dados coletados por meio de técnicas de citogenética convencional constituíam o objetivo original do presente estudo, visando fornecer subsídios para o programa de melhoramento da EMBRAPA Trigo envolvendo espécies afins. No entanto, sabendo-se das vantagens de utilizar as técnicas mais recentes de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), foi proposta para a CAPES a realização de doutorado sanduíche, através do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE). A identificação de genomas de trigo empregando sondas tais como a *pAs1*, isolada de *Aegilops squarrosa* (= *Ae. tauschii*), que identifica os cromossomos do genoma D do trigo hexaplóide (Rayburn & Gill, 1986) e a *pSc119.2*, isolada de centeio, que hibridiza especialmente com cromossomos do genoma B (McIntyre et al., 1990) seria uma ferramenta adicional nos estudos em desenvolvimento.

A bolsa do PDEE da CAPES ofereceu a oportunidade de estagiar no laboratório de citogenética da Universidad de Alcalá (UAH), Alcalá de Henares, Madrid, Espanha. O objetivo do estágio seria a análise detalhada do pareamento dos cromossomos da F1, F2 e RC1F1 dos cruzamentos incluídos no presente estudo. A avaliação seria dirigida especialmente para as relações entre cromossomos do genoma D do *T. aestivum* com aqueles do genoma D, proveniente de *Ae. tauschii*, doador dos genes de interesse do estudo.

Além da aplicação prática no projeto em andamento, se ambicionava a aprendizagem da técnica de FISH para posterior aplicação em demais projetos em desenvolvimento no Departamento de Genética da UFRGS. No entanto, devido a problemas relacionados a entraves burocráticos no envio do material para a Espanha, todas as espigas jovens coletadas até aquele momento foram perdidas. Possivelmente, condições inadequadas de armazenagem e transporte resultaram na degradação dos cromossomos, impossibilitando qualquer análise.

A alternativa para que, pelo menos, fosse cumprido o objetivo de aprendizagem da técnica de FISH, foi a minha integração à equipe executora de um projeto já em andamento da UAH, sob a coordenação da Dra. Angeles Cuadrado. Tal projeto previa a saturação do mapeamento físico do genoma do trigo, com o estudo dos sítios de hibridação de seqüências microssatélites (SSRs). Durante o período de estágio foi estudada grande parte de todas as combinações de seqüências de di- e tri-nucleotídeos possíveis e seus padrões de hibridação nos cromossomos, o que possibilitou a distinção entre cromossomos individuais dos diferentes genomas presentes no trigo hexaplóide (*T. aestivum* cv. Chinese Spring). Os resultados deste trabalho estão incluídos em um artigo, elaborado em conjunto com a equipe da UAH, que se encontra em anexo a esta tese.

A aprendizagem da técnica da FISH possibilitará o auxílio na futura implantação da mesma nos laboratórios, já parcialmente equipados para tal fim, no Departamento de Genética da UFRGS e na EMBRAPA Trigo. O emprego de tal técnica como rotina em ambos laboratórios, certamente, trará benefícios tanto ao estudo da genética básica bem como para fornecer subsídios ao programa de

melhoramento de trigo, com possibilidade de perfeita integração em projetos já em andamento.

Os dados de citogenética básica ou mesmo de citogenética molecular apresentados por este estudo demonstram mais uma vez que a citogenética pode e deve ser usada como ferramenta de apoio em programas de melhoramento. As técnicas mais recentes e acuradas de hibridização *in situ*, que permitem a perfeita distinção entre genomas e até mesmo de cromossomos individuais - especialmente após o trabalho com os microssatélites apresentados no anexo desta tese - propiciarão a realização de estudos mais detalhados da meiose em cruzamentos interespecíficos em trigo. Neste contexto, é desejável a continuidade de estudos com esta abordagem pela contribuição que podem oferecer ao melhoramento genético de trigo.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios G (1997) Plant pathology 4 ed. Academic Press, San Diego.
- Angra DC (1995) Transferência da resistência à ferrugem da folha através de cruzamentos intergenéricos entre *Triticum aestivum* e *Agropyron elongatum*. MSc. Thesis, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Anikster Y, Bushnell WR, Eilam T, Manisterski J and Roelfs AP (1997) *Puccinia recondita* causing leaf rust on cultivated wheats, wild wheats, and rye. Canadian Journal of Botany 75: 2082-2096.
- Antonelli EF (2003) La roya anaranjada (*Puccinia triticina* Erikss.). Sobre la efémera resistencia observada en la última década en cultivares comerciales de trigo de amplia difusión en la Argentina. (Grafos: Necochea, Argentina)
- Appels R, Gerlach WL, Dennis ES, Swift H and Peacock WJ (1980) Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. Chromosoma 78: 293-311.
- Aung T and Kerber E (1998) Incorporation of stem rust and leaf rust resistance from *Aegilops triuncialis* into common wheat. In: Proceedings of International Wheat Genetics Symposium, 9th pp. 7-9.
- Autrique E, Singh RP, Tanksley SD and Sorrells ME (1995) Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. Genome 38: 75-83.
- Bacaltchuk B (2003) Auto-suficiência é uma possibilidade. In: Anuário do Trigo Brasil – 2003. Diário da Manhã, Passo Fundo, RS, Brasil, pp. 8.
- Barbieri RL and Carvalho FIF (2001) Coevolução de plantas e fungos patogênicos. Revista Brasileira de Agrocência 7(2):79-83.
- Barcellos AL (1994) Genética da resistência de planta adulta à ferrugem da folha na cultivar brasileira de trigo Toropi (*Triticum aestivum* L. em Thell). PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Barcellos AL (2000) Urgent need for less ephemeral resistance to leaf rust in Brazilian wheat cultivars. In International Wheat Conference, 6th. Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár, Hungary.

- Barcellos AL (2001) Resistência durável à ferrugem da folha do trigo. In: Trigo no Brasil: História e Tecnologia de Produção. Documentos 32, EMBRAPA, Passo Fundo, Rs, Brazil, pp. 115-126.
- Barcellos AL, Moraes-Fernandes MIB and Roelfs AP (1997) Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. Summa Phytopathologica 23 (2): 101-117.
- Barcellos AL and Turra C (2004) Search for durable resistance to wheat leaf rust in Brazil. In: Abstracts of the International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference 11th pp. A2.3.
- Bennet MD and Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London [Biol] 274:227-274.
- Bigazzi M and Selvi F (2001) Karyotype morphology and cytogeography in *Brunnera* and *Cynoglottis* (Boraginaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 136: 365-378.
- Brammer SP (2000) Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell). PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Cauderón Y (1986) Cytogenetics in breeding programmes dealing with polyploidy, interespecific hybridization and introgression. In: HORN, JENSEN, ODENBACH, SCHIEDER, eds. Genetic manipulation in plant breeding control. Berlin - New York: Walter de Gruyter – Printed in Germany, pp. 83-104.
- Chaves MS, Barcellos AL, Germán S, Scheeren PL, Del Duca LdeJA, Só e Silva M, Caierão E (2005) Population dynamics of *Puccinia triticina* in the South Cone region of South America. In 'Wheat production in stressed environments: Abstracts of oral and poster presentations [of the] 7th International Wheat Conference'. Mar del Plata, Argentina. p. 130. (Secretariat of Agriculture, Animal Husbandry, Fisheries and Food)
- Chevre AM, Jahier J and Trottet M (1989) Expression of disease resistance genes in amphiploid wheats – *Triticum tauschii* (Coss.) Schmal. Cereal Research Communications 17: 23-29.

- Ciferri R (1955) The first interespecific wheat hybrids. *Journal of Heredity* 46: 81-83
- Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Disponível em: <http://www.conab.gov.br> Acesso em: 27 jun. 2007.
- Cox TS, Hatchett JH, Gill BS, Raupp WJ and Sears RG (1990) Agronomic performance of hexaploid wheat lines derived from direct crosses between wheat and *Aegilops squarrosa*. *Plant Breeding* 105: 271-277.
- Cox TS, Sears RG and Bequette RK (1995) Use of winter wheat X *Triticum tauschii* backcross population for germplasm evaluation. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 571-577.
- Curtis BC (2002) Wheat in the world. In: In: Curtis BC, Rajaram S and Gómez-Macpherson H (eds) *Bread Wheat Improvement and Production*, 567p. FAO.
- Davoyan RO, Bessarab KS, Bebyakina IV and Konyshiy E (1998) Use of synthetic forms to wheat improvement. *Proceedings of the International Wheat Genetics Symposium 9th* pp 193-195.
- Dennis ES, Gerlach WL, Peacock WJ (1980) Identical polypyrimidine-polypurine satellite DNAs in wheat and barley. *Heredity* 44:349-366.
- Dhaliwal HS, Singh H, Gill KS, Randhawa HS (1993) Evaluation and cataloguing of wheat germplasm for disease resistance and quality. In: Damania AB (ed.) *Biodiversity and wheat improvement*. A Wiley-Savce Publication, pp. 9123-140.
- Dick PL and Kerber ER (1970) Inheritance in hexaploid wheat of adult-plant leaf rust resistance derived from *Aegilops squarrosa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 12:175-180.
- Dvórák J, McGuire PE, Cassidy B (1988) Apparent sources of the A genomes of wheat inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* 30: 680-689.
- Dvórák J, Di Terlizzi P, Zhang H-B and Resta P (1993) The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21-31.
- Dvórák J (1998) Genome analysis in *Triticum Aegilops* alliance. *Proceedings of International Wheat Genetic Symposium 9th* pp. 8-11.

- Dvůrak J and Zhang H-B (1990) Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of National Academy of Science USA* 87: 9640-9644.
- Fedak G (1998) Procedures for transferring agronomic traits from alien species to crop plants. *Proceedings of International Wheat Genetics Symposium*, 9th pp. 1-7.
- Federizzi LC, Pacheco MT, Milach SCK, Barbosa Neto JF and Carvalho FIF (1996) Programa de melhoramento genético de aveia da Faculdade de Agronomia/UFRGS, 1995. Resultados experimentais In: Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Aveia, 16: 60.
- Feldman M (1965) Fertility of interespecific hybrids and hybrid derivatives involving tetraploid species of *Aegilops* section *Pleionathera*. *Evolution* 19: 556-562.
- Gerlach WL and Peacock WJ (1980) Chromosomal locations of highly repeated DNA sequences in wheat. *Heredity* 44: 269-276.
- Germán S, Kohli M, Chaves M, Barcellos A, Nisi J, Annone J, Madariaga R, de Viedma L (2004) Breakdown of resistance of wheat cultivars and estimated losses caused by recent changes in the leaf rust population in South America. In: Abstracts of the International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference, 11th pp. A2.21
- Gill BS and Raupp WJ (1987) Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. *Crop Science* 27: 445-450.
- Gill BS and Friebe B (2002) Cytogenetics, phylogeny and evolution of cultivated wheats. In: Curtis BC, Rajaram S and Gómez-Macpherson H (eds) *Bread Wheat Improvement and Production*, 567p. FAO.
- Guerra (2004) Hibridização *in situ*: Princípios básicos. In: Guerra M (ed) *FISH Conceitos e aplicações na Citogenética*, 176p. SBG.
- Haas TJ and Bingham ET (2004) Alfalfa with n, 2n, and 4n gametes: Predicted and actual pollen diameter ratios. *Medicago Genetic Reports* 4. Website www.medicago-reports.org (Acesso em: 11 Mai. 2007)
- Heslop-Harrison JS (1993) Applications of molecular cytogenetics in the *Triticeae*. In: Damania AB (ed.) *Biodiversity and wheat improvement*. A Wiley-Savce Publication, pp. 31-38.

- Hutchinson J, Miller TE and Reader SM (1983) C-banding at meiosis as a mean of assessing chromosome affinities in the Triticeae. *Canadian Journal of Genetic and Cytology* 25: 319-323.
- Jacob Y and Pierret V (2000) Pollen size and ploidy level in the genus *Rosa*. *Acta Horticulturae (ISHS)* 508: 289-292. Website www.actahort.org/books/508/508_48.htm
- Jauhar PP, Riera-Lizarazu O, Dewey WG, Gill BS, Crane CF and Bennett JH (1991) Chromosome pairing relationships among A, B and D genomes of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 441-449.
- Jauhar PP (1993) Alien gene transfer and genetic enrichment of bread wheat. In: Damania AB (ed.) *Biodiversity and wheat improvement*. A Wiley-Savce Publication, pp. 103-119.
- Johansen B and Bothmer R (1994) Pollen size in *Hordeum* L.: correlation between size, ploidy level and breeding system. *Sexual Plant Reproduction* 7: 259-263.
- Johnson R (1984) A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 22: 309-330.
- Kapadia ZJ and Gould FW (1964). Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex. III Pollen size as related to chromosome numbers. *American Journal of Botany* 51(2): 166
- Katsiotis A and Forsberg RA (1995) Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. *Euphytica* 83(2): 103
- Kelly JK, Rasch A and Kalisz S (2002) A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany* 89(6): 1021-1023.
- Kerber ER and Dick PL (1969) Inheritance in hexaploid wheat of leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 11: 639-647.
- Kihara H (1944) Discovery of the DD-analyzer, one of the ancestors of *Triticum vulgare*. *Agricultural Horticulture Tokyo* 19:889-890.
- Kimber G and Riley R (1963) The relationships of the diploid progenitors of hexaploid wheat. *Canadian Journal of Genetic and Cytology* 5: 83-88.

- Kimber G (1993) Genomic relationships in *Triticum* and the availability of the alien germplasm. In: Damania AB (ed.) Biodiversity and wheat improvement. A Wiley-Savce Publication, pp. 9-16.
- Knaggs P, Ambrose MJ, Reader SM and Miller TE (2000) Morphological characterization and evaluation of the subdivision of *Aegilops tauschii* Coss. Wheat Information Service 91: 15-19.
- Knott DR (1989a) The Wheat Rusts – Breeding for Resistance. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 12. Ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 202pp.
- Knott DR (1989b) The effect of transfers of alien genes for leaf rust resistance in agronomic and quality characteristics of wheat. Euphytica 44: 65-72.
- Knott DR and Dvórák J (1976) Alien germ plasm as a source of resistance to disease. Annual Review of Phytopathology 14: 211-235.
- Koch MA, Dobes C and Michell-Olds T (2003) Multiple hybrid formation in natural populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae). Molecular Biology Evolution 20(3): 338-350.
- Love RM (1951) Varietal differences in meiotic chromosome behavior of Brazilian wheats. Agronomy Journal 43: 72-76.
- Martinelli JA (1994) Unusual methods to control the oat crown rust. In: Proceedings of South American Oat Congress, 2: 29-31.
- McFadden ES and Sears ER (1944) The artificial resynthesis of *Triticum spelta*. Records Genetic Society of America 13: 26-27.
- McFadden ES and Sears E (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. Journal oh Heredity 37: 81-89.
- McIntosh RA, Hart GE, Devos KM, Gale MD and Rogers WJ (1998) Catalogue of gene symbols for wheat. In: Proceedings of International Wheat Genetics Symposium 9th.
- McIntyre CL, Pereira S, Moran LB and Apples R (1990) New *Secale cereale* (rye) DNA derivatives for the detection of rye chromosome segments in wheat. Genome 33:317-323.

- Moraes-Fernandes MIB (1982) Citogenética. In: Osório EA (ed.) Trigo no Brasil. Fundação Cargill, Campinas, pp.95-144.
- Moraes-Fernandes MIB (1985) Domesticar o grão. Ciência Hoje 17: 38-45.
- Moraes-Fernandes MIB (1987) Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 22: 881-896.
- Moraes-Fernandes MIB, Fernandes, JMC, Picinini EC, Aita L and Sartori JF (1980) Transferência de genes de resistência à *Septoria nodorum* (Berk) de espécies afins para o trigo. In: Resumos e comunicados técnicos da 11ª Reunião Nacional de Pesquisa de Trigo. EMBRAPA – CNPT, Passo Fundo, pp. 126.
- Moraes-Fernandes MIB, Bodanese-Zanettini MH, Del Duca LJA, Guerra Fº M, Sereno MJC and Zanella CC (1984) Instabilidade cromossômica e adaptação em trigo. Resumos, I Colóquio sobre Citogenética e Evolução de Plantas, Piracicaba, SP, 17 a 19 de janeiro pp. 69-110.
- Moraes-Fernandes MIB, Zanatta ACA, Prestes AM, Caetano VR, Barcellos AL, Angra DC and Pandolfi V (2000) Cytogenetics and immature embryo culture at the Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease resistance from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat. Genetics and Molecular Biology 23 (4): 1051-1062.
- Morrison LA (1993) *Triticum-Aegilops* systematics: Taking an integrative approach. In: Damania AB (ed.) Biodiversity and wheat improvement. A Wiley-Savce Publication, pp. 59-66.
- Mujeeb-Kazi A and Kimber G (1985) The production, cytology and practicality of wide hybrids in *Triticeae*. Cereal Research Communications 13(2-3): 111-124.
- Mujeeb-Kazi A and Rajaram S (2002) Transferring alien genes from related species and genera for wheat improvement. In: Curtis BC, Rajaram S and Gómez-Macpherson H (eds) Bread Wheat Improvement and Production, p. 199-215. FAO.
- Mukai Y (2005) Perspectives in molecular cytogenetics of wheat. In: TSUNEWAKI, K. (Ed.) Frontiers of Wheat Bioscience, Memorial Issue of Wheat Information Service 100: 17-30

- Mukai Y, Nakahara Y, Yamamoto M (1993) Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome* 36:489-494.
- Muñiz LM, Cuadrado A, Jouve N and Gonzalez JM (2001) The detection, cloning, and characterisation of WIS 2-1 A retrotransposon-like sequences in *Triticum aestivum* L. and *x Triticosecale* Wittmack and an examination of their evolution in related *Triticeae*. *Genome* 44:979-989
- Parlevliet JE (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* 17: 203-222.
- Parlevliet JE (1985) Resistance of the non race-specific type. In: BUSHNELL, W. R.; ROELFS, A. P. (Eds.) *The Cereal Rusts: Diseases, distribution, epidemiology and control*. Academic Press, New York, pp. 501-525.
- Parlevliet JE (1997) Present concepts in breeding for disease resistance. *Fitopatologia Brasileira* v. 22 (suppl.): 7-15, Palestra apresentada no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Poços de Caldas, MG, Brazil.
- Pedersen C, Rasmussen SK and Linde-Laursen I (1996) Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the *Triticeae* (*Poaceae*) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome* 39:93-104.
- Pedersen C and Langridge P (1997) Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome* 40:589-593.
- Picinini EC and Fernandes JM A importância do controle químico de doenças de trigo. In: *Trigo no Brasil: História e Tecnologia de Produção*. Documentos 32, EMBRAPA, Passo Fundo, Rs, Brazil, pp. 143-153.
- Prestes AM, Angra DM, Barbosa MM and Moraes-Fernandes MIB (1994) Fontes de resistência a *Stagonospora nodorum* em *Aegilops squarrosa*, espécie afim ao trigo cultivado. *Fitopatologia Brasileira* 19: 510-513.
- Rayburn AL and Gill BS (1985) Use of biotin-labelled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *Journal of Heredity* 76: 78-81
- Rayburn AL and Gill BS (1986) Molecular identification of the D-genome chromosomes of wheat. *Journal of Heredity* 77:253-255.

- Riley R and Chapman V (1958) Genetic control of the cytologically diploid behavior of hexaploid wheat. *Nature* 182: 712-715.
- Riley R, Unrau J and Chapman V (1958) Evidence on the origin of the B genome of wheat. *Journal of Heredity* 49: 91-98.
- Riley R, Chapman V and Kimber G (1959) Genetic control of chromosome pairing in intergeneric hybrids with wheat. *Nature* 183: 1244-1246.
- Riley R (1960) The diploidisation of polyploids wheat. *Heredity* 15: 407-429.
- Rodrigues R (2003) O trigo é cada vez mais importante. In: Anuário do Trigo Brasil – 2003. Diário da Manhã, Passo Fundo, RS, Brasil, pp. 3.
- Roelfs AP, Singh RP and Saari EE (1992) Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, México.
- Sarkar P and Stebbins GL (1956) Morphological evidence concerning the origin of B genome in wheat. *American Journal of Botany* 43: 297-304.
- Schubert V, Unger O, Weidner A and Bluthner W-D (1993) Transfer of leaf rust resistance and non-glaucousness from *Aegilops markgrafii* to hexaploid wheat. In: Damania AB (ed.) Biodiversity and wheat improvement. A Wiley-Savce Publication, pp. 146-154.
- Sharma HC and Gill BS (1983) Current status of wide hybridization in wheat. *Euphytica* 32: 17-31.
- Silva DB, Guerra AF, Rein TA, Anjos J de RN dos, Alves RT, Rodrigues GC and Cardoso e Silva IA (1996) Introdução e Origem e importância do trigo. In: Trigo para o abastecimento familiar: do plantio à mesa. Embrapa – SPI, Brasília, pp. 13–14 e pp. 15–18.
- Singh RP, Huerta-Espino J and Roelfs AP (2002) The wheat rusts. In: Curtis BC, Rajaram S and Gómez-Macpherson H (eds) Bread Wheat Improvement and Production, p. 227-249. FAO.
- Smith DB and Flavell RB (1975) Characterisation of the wheat genome by renaturation kinetics. *Chromosoma* 50:223-242.
- Tel-Zur N, Abbo S, Bar-Zvi D and Mizrahi Y (2003) Chromosome doubling in Vine cacti hybrids. *Journal of Heredity* 94(4): 329-333.
- USDA - United States Department of agriculture. Disponível em: <http://www.usda.gov> Acesso em 27 jun. 2007.

- van Slageren M (1993) Taxonomy and distribution of *Aegilops*. In: Damania AB (ed.) Biodiversity and wheat improvement. A Wiley-Savce Publication, pp. 67-79.
- Wahl I, Anikster Y and Manisterski J (1984) Evolution at the center of origin. In: BUSHNELL, W. R.; ROELFS, A. P. (Eds.) The Cereal Rusts: Origins, specificity, structure and physiology. New York: Academic Press, pp. 39-72.
- Zohary D and Feldman M. (1961) Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Evolution* 16: 44-61.

ANEXO

ARTIGO



Novel physical markers for wheat chromosome identification using SSRs as FISH
probes

Artigo submetido ao periódico Theoretical and Applied Genetics



Novel physical markers for wheat chromosome identification using SSRs as FISH probes

Journal:	<i>Theoretical and Applied Genetics</i>
Manuscript ID:	TAG-2007-0364
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	17-Jul-2007
Complete List of Authors:	Cuadrado, Angelines; University of Alcala (Madrid), Genetics and cell biology Cardoso, Milena; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Genetics Jouve, Nicolas; University of Alcala, Genetics and cell biology
Keywords:	Triticum aestivum L. SSRs, FISH, dinucleotide repeats, trinucleotide repeats, chromosome markers

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

Novel physical markers for wheat chromosome identification using SSRs as FISH probes

Angeles Cuadrado, Milena Cardoso*, and Nicolás Jouve

Department of Cell Biology and Genetics. University of Alcalá. 28871 Alcalá de Henares
(Madrid) Spain. Fax: 34 91 8854799.

* Current address: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500 –
P.O. Box 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to: A. Cuadrado E-mail: angeles.cuadrado@uah.es

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 **Abstract**

2 In a previous work, we have reported the physical distribution of four simple
3 sequence repeats (SSRs) to *Triticum aestivum* chromosomes. The distinctive
4 distribution pattern found with (AG)₁₂, (CAT)₅, (AAC)₅ and (AAG)₅ suggests that
5 SSR *in situ* hybridization is useful as a diagnostic tool in wheat cytogenetics. To
6 check whether this finding is generally applicable, we analysed the
7 chromosome distribution of the rest of the fourteen possible classes of di- and
8 trinucleotide repeat by fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). Based on the
9 hybridization signals detailed knowledge of the sequence content of hexaploid
10 wheat chromatin was acquired but also useful landmarks for chromosome
11 identification: (1) except for (AT)₁₀ and (GC)₁₀ that their chromosomal
12 distribution could not be accurately determined, the studied probes give a
13 characteristic and motif-dependent pattern of distribution in terms of their *in situ*
14 FISH signals; (2) with the exception of (AC)₈ and (GCC)₅ that was found
15 dispersed over the length of all wheat chromosomes the remaining repeats are
16 observed as clusters on specific chromosome sites; (3) as previously reported
17 for (AAG)₅ and (AAC)₅, (AGG)₅, (CAC)₅, (ACG)₅, (ATT)₅, and (CAG)₅, were
18 preferentially distributed in the pericentromeric regions of the B-genome
19 chromosomes. Several intercalary sites on some A, B and D genome
20 chromosomes make similar but not identical their patterns. (4) (ACT)₅ produces
21 a rich pattern of clear intercalary signals, as demonstrated for (AG)₁₂ and
22 (CAT)₅ on some B genome chromosomes, but also in several A genome
23 chromosomes. The importance of SSRs in plant breeding and their possible
24 role in chromosome structure, function and evolution is discussed.

25
26
27 **Key words:** *Triticum aestivum* L. SSRs, FISH, dinucleotide repeats,
28 trinucleotide repeats, chromosome markers.

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 Introduction

Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L., $2n=42$) is made up of three genomes A, B and D with seven pairs of homologous chromosomes per genome with a similar morphology (Sears, 1952). A preliminary requirement and first step for gene localization and understand genome structure, function and evolution of an organism is the unambiguous discrimination of each of its chromosome pairs. Moreover an important goal in crop improvement is to link genetic maps, constructed with molecular markers, to the corresponding physical map. Since the widespread adoption of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in plants, the physical mapping of chromosomal markers has become a routine that undoubtedly has revolutionised plant cytogenetic and genome research in general. However, because technical difficulties still remain for physical mapping of low and single copy sequences the marker sequences that can be applied to identify plant chromosomes are mainly high-copy.

Wheat has a genome size of 17000 Mb (Bennett and Smith, 1976) that is composed of up to 80% repetitive DNA (Smith and Flavell, 1975). However most of the highly repeated DNA sequences cloned so far are (retro) transposon-like sequences dispersed throughout the genome and hence not suitable as chromosome markers (Muñiz et al., 2001). The tandemly repetitive DNA sequences providing the best banding patterns by *in situ* hybridization to wheat chromosomes include pAs1 isolated from *Aegilops tauschii* that identify the D genome chromosomes of hexaploid wheat (Rayburn and Gill, 1986), pSc119.2 isolated from rye (McIntye et al. 1990) which hybridizes in particular to B genome chromosomes, and the GAA-satellite sequence (Dennis et al., 1980) that hybridize to 16 chromosome pairs revealing the heterochromatin that is stained with the N-banding technique (Pedersen et al., 1996). Although many wheat chromosome arms do not display any *in situ* mark, using a combination of these three probes it is possible identify all the somatic chromosomes of hexaploid wheat (Mukai et al., 1993; Pedersen and Langridge, 1997). However since several morphologically similar chromosomes show quite similar hybridization patterns, and the minor sites observed in many chromosomes are only observed on high quality slides, its precise identification is difficult and their

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 diagnostic value, based on the hybridization pattern, often depends on having
2 high quality metaphases with all chromosomes of a complement available for
3 comparison. Moreover since the available probes hybridize preferentially on the
4 B and D genome chromosomes, the remaining A chromosomes are poorly
5 characterized cytogenetically.

6 Meanwhile significant progress has been made in the last few years in
7 the sequence analysis of the whole wheat genome by combining different
8 strategies, (International Wheat Genome Sequencing Consortium, IWGSC,
9 <http://www.wheatgenome.org>), fewer advances have been made in the
10 saturation of the cytogenetic maps with chromosomes marked along all the
11 chromosome arms. These, are very useful for a precise characterization of
12 cytogenetic stocks (i.e., deletion, translocation, nullisomic-tetrasomic) that is of
13 great value in the physical mapping of wheat. It is now clear that simple
14 sequence repeats (SSRs) are major components of many plant genomes
15 including *Triticeaes*. In previous research we have examined the long-range
16 chromosomal organization and distribution of different SSRs in hexaploid wheat
17 and observed that each SSR motif has a characteristic chromosomal
18 distribution, apart from the dispersed overall signal (Cuadrado and
19 Schwarzacher, 1998). More recently, under optimum FISH conditions, we have
20 demonstrated that, beside the utility of the synthetic (AAG)₅ oligonucleotide to
21 detect the GAA-rich satellite sequences, the use of (AG)₁₂, (AAC)₅ and (CAT)₅
22 has proved useful as cytological markers for chromosome identification and to
23 understand chromatin organization in wheat (Cuadrado et al., 2000). Moreover,
24 recently we reported the utility of trinucleotide repeats SSRs as cytogenetic
25 landmarks to saturate the physical map of barley (Cuadrado and Jouve, 2007a).

26 In this paper we aim to increase the molecular chromosome markers of
27 wheat (*Triticum aestivum* L.) exploring the cytogenetic utility of all possible
28 classes of simple di- and trinucleotide oligonucleotide as synthetic probes in
29 FISH experiments. These are used to perform a detailed karyotype based on
30 the distribution of the motifs that provide the most informative chromosome
31 landmarks in cv. 'Chinese Spring'.
32

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 **Materials and methods**

3 ***Chromosome preparation***

4 Seeds of *Triticum aestivum* L cv. Chinese Spring (2n=42 AABBDD) were
5 germinated on moist filter paper for 24 h at 25°C. They were then maintained at
6 4°C for 72 h before being returned to a temperature of 25°C for 24 h in order to
7 synchronize cell divisions. Roots were excised and pre-treated in ice cold water
8 for 24 h before fixation in ethanol/acetic acid (3:1). Chromosome preparations
9 were made as described by Schwarzacher et al. (1989), using enzymatically
10 digested root tips prior to squashing the meristematic cells in a drop of 45%
11 acetic acid on clean microscope slides. After removal of the cover slips by
12 freezing, the slides were air dried.

14 ***Probes and labelling***

15 All dinucleotide repeat sequences, except for homomeric dinucleotides, can be
16 grouped into four motifs representing the twelve overlapping and
17 complementary unit patterns. Likewise, just ten motifs represent the sixty
18 different trinucleotide combinations in different reading frames and in the
19 complementary strand (Jurka and Pethiyagoda 1995). Thus, to detect all
20 possible classes of di- and trinucleotide repeats four and ten synthetic
21 oligonucleotides were employed respectively: (AC)₈; (AT)₁₀, (GC)₁₀, (AG)₁₂,
22 (AAC)₅, (AAG)₅, (AAT)₅, (AGG)₅, (CAC)₅, (CAT)₅, (CAG)₅, (ACT)₅, (ACG)₅, and
23 (GCC)₅. All synthetic probes were labelled with digoxigenin-11-dUTP, (Roche)
24 biotin-16-dUTP (Sigma) and/or biotin-16-dGTP (Perking Elmer) using the
25 random primer technique, as described by Cuadrado et al. (2000). The plasmid
26 clones used to confirm chromosome identification (see below) were amplified
27 and labelled with digoxigenin-11-dUTP (Roche) or biotin-16-dUTP (Sigma)
28 using PCR with universal forward and reverse sequencing primers, 30 sec
29 annealing at 55 °C and 90 sec extension at 72 °C.

31 ***Fluorescence in situ hybridization***

32 *In situ* hybridisation was performed as described by Cuadrado et al. (2000).

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 Briefly, air-dried, pre-treated slides were denatured at 75 °C for 10 min in 30 µl
2 of previously denatured hybridisation solution containing 50% formamide using
3 a programmable thermocycler. After hybridisation overnight at 37°C, the slides
4 were washed, essentially following the post-hybridisation washing process
5 described by Heslop-Harrison et al. (1991). 10 min in 20% formamide/0.1xSSC
6 at 42 °C was the highest stringency wash before the detection of biotin and
7 digoxigenin with streptavidin-Cy3 and fluoresceinated anti-digoxigenin
8 respectively. Before chromosome observation, slides were stained with DAPI
9 (4', 6-diamidino-2-phenylindole).

11 ***Chromosome analyse***

12 Slides were examined with a Zeiss Axiophot epifluorescence microscope. The
13 separate images from each filter set were captured using a cooled CCD camera
14 or photographed with Fuji Super G 400 ASA colour. The images were optimized
15 for best contrast and brightness with the Adobe Photoshop 6.0 program,
16 employing only the functions that are applied equally to all pixels in the image.

17 To identify or confirm signal-bearing chromosomes, two-colour FISH was
18 performed in successive FISH experiments, reprobng the same slide,
19 combining different synthetic oligonucleotides between them or with the cloned
20 probe pAs1 (Raybun and Gill., 1986). These allowed the identification of the
21 entire chromosome complement and permitted their orientation to be discerned.

23 **Results**

24 We used 14 synthetic oligonucleotides to analyse the physical localisation of
25 long clusters of all possible di- and trinucleotide repeats in metaphases of
26 hexaploid wheat (Fig. 1 and 2a). Chromosomes of the three genomes (A, B and
27 D) were identified individually after re-probing preparations with different marker
28 probes: pAs1, (AAG)₅ and (AAC)₅, based on the previously described patterns
29 with these repetitive sequences (Mukai et al., 1993; Cuadrado et al., 2000) (Fig.
30 2b). Karyotype analysis was used to compare and characterize the physical
31 distribution of the synthetic probes that provide the most informative wheat
32 chromosome landmarks (Fig. 2c). The main results are shown in Table 1

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 Two of 4 possible combinations of the dinucleotide repeats, (AT)₁₀ and
2 (GC)₁₀, did not show positive *in situ* signals. The AC probe produced a scattered
3 hybridization signal of different intensity over the length of all wheat
4 chromosomes interspersed between areas of low density that were detectable
5 as gaps (Fig.1a). On the other hand, the AG probe was found distributed in
6 several discrete sites on four B genome chromosomes, the previously reported
7 clusters on chromosomes arms: 3BS, 4BL, 5BS, and 5BL (Cuadrado et al.,
8 2000), but also on chromosome 6BS (Fig. 1b and 2c).

9 Ten synthetic oligonucleotides are enough to detect all the different
10 combination of non-homomeric trinucleotide repeats. All probes were detected
11 by *in situ* hybridization. The pattern of signal distribution and intensity were
12 different for all of them. The (GCC)₅ probe showed a dispersed hybridization
13 pattern. The scattered signals were of different strength and were interspersed
14 between areas of low perceptible density (gaps), resembling (although less
15 intense) the distribution pattern of (AC)₈. On the other hand, as expected for the
16 previously described (AAC)₅, (AAG)₅, and (CAT)₅, the rest of trinucleotide
17 probes: (CAC)₅, (AGG)₅, (CAG)₅, (AAT)₅, (ACT)₅, and (ACG)₅ showed
18 characteristic motif-dependent SSRs *in situ* patterns.

19 The most intense and rich pattern of *in situ* hybridization signals was
20 produced by (AAG)₅, (AAC)₅, (AGG)₅ and (CAC)₅ (Fig 1c and 2). The (AAC)₅
21 and (AAG)₅ probes have been used to analyse the molecular composition of
22 wheat heterochromatin, and their physical distribution has been previously
23 described in detail (Cuadrado et al., 2000). In the present study, these probes
24 have been used as markers. Only a signal observed with (AAG)₅ close to the
25 centromere on chromosome 7A has not been previously described in Chinese
26 Spring either with the (AAG)₅ or with the GAA-satellite sequence used as
27 probes (Pedersen and Langridge, 1997; Cuadrado et al., 2000). Here for the
28 first time we present the karyotype of wheat with these two probes (Fig 2c). Like
29 (AAC)₅ and (AAG)₅, the (AGG)₅ and (CAC)₅ probes produced a high density
30 display of signals in the pericentromeric region of B genome chromosomes
31 beside motif-specific intercalary sites of different intensities on different A, B and
32 D genome chromosomes (Fig. 1c, 2a and 2c). The differences in abundance

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 and distribution of these repeats within the B genome chromosome, and the
2 presence of (AAG)₅ and (AGG)₅ intercalary sites on different D genome
3 chromosomes made the *in situ* hybridization pattern obtained with these four
4 probes similar, although not identical. Likewise, clear differences can be noted
5 comparing the hybridization pattern of these four motifs on the A genome
6 chromosomes (Fig. 2c, four top lines). For example (CAC)₅ strongly hybridize
7 near the telomere on 2AS, while the most intense A chromosome bands with
8 the AGG probe were observed on chromosomes 1A, 4A and 7A (Compare Fig.
9 1c and 2a).

10 Three probes, (AAT)₅, (ACG)₅ and (CAG)₅, were poorly detected by *in*
11 *situ* hybridization. These motifs are mainly found at the pericentromeric regions
12 of the B genome chromosomes and were not detected on chromosomes
13 belonging to D genome. Although interstitial signals were frequently found, in
14 high quality metaphases, on some A and B chromosomes, most of them were
15 only observed after long exposure times of image capture and higher contrast.
16 This made that some of the close stronger signals observed on other
17 chromosomes tended to coalesce and were often seen as one wide band (Fig
18 1d, and e). Since these three probes had a similar distribution pattern than
19 (AAC)₅, (AAG)₅, (AGG)₅ and (CAC)₅, particular enriched in the B genome
20 chromosomes, but poorer in the intercalary band, no attempt has been made to
21 construct a karyotype with these motifs.

22 The other two trinucleotide probes, (CAT)₅ and (ACT)₅ produce the
23 clearest and most distinctive distribution patterns of intercalary bands (Fig 2c,
24 two bottom lines). As we have reported previously, (CAT)₅ was restricted to
25 chromosome arm 3BS. On the other hand, the (ACT)₅ probe produced a rich
26 pattern of bands, the most intense and reproducible on chromosome arms 1AL,
27 7AL, 2BS, 3BS and 7BL that allow the easy and quick identification of these
28 chromosomes. Other minor signals were also observed on chromosomes arms
29 4BS, 3AS, 2AS, 5AS, 6BS and 3AL in descending order of intensity (Fig. 1f).

31 Discussion

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 **Molecular PCR-SSRs markers versus FISH- SSRs markers**

2 The usefulness of PCR-amplified SSRs (microsatellites) in studies of genetic
3 variation and as genetic markers has been well established. Linkage maps are
4 available for a number of species, in particular the majority of agronomically
5 important crops, including wheat. Since the first reported SSRs genetic map of
6 bread wheat (Roder et al., 1993), several research groups have concentrated
7 their efforts on screening DNA libraries and sequences deposited in public
8 databases for the development of new wheat SSRs markers. In the last few
9 years the density of these molecular markers on published wheat linkage maps
10 has steadily increased (e.g., Gupta et al. , 2002; Somers et al., 2004; Song et
11 al., 2005 and Hayden et al., 2006). This has improved the efficiency of marker-
12 assisted selection and germplasm assessment but also knowledge on the level
13 of allelic variation of SSRs. Despite the interest of the plant genetics research
14 community in SSRs, relatively little is known about the physical localization of
15 SSRs motifs even in plant model genomes and the well researched group of
16 *Triticeae*.

17 Genetic mapping studies have revealed that SSRs are randomly
18 distributed in the wheat linkage map, with non-significant clustering in specific
19 regions, particular chromosomes and genomes. In contrast, our results showed
20 that with the exception of AC and GCC repeats, the other SSRs analysed are
21 non-randomly spread along the wheat chromosomes, showing characteristic
22 patterns of distribution depending on the motifs, chromosome and genome
23 analysed. Although these results appear to be contradictory, no direct
24 comparison of our *in situ* hybridization results with deletion and physical maps
25 can be made as the target sequences are different. Molecular SSRs markers
26 are usually generated using PCR with locus-specific flanking primers. These
27 short stretches of SSRs, normally 20-250 bp, are undetectable by *in situ*
28 hybridization since several kilobases of target sequence are required to produce
29 consistent signals in plant chromosomes (Jiang and Gill, 1994). On the other
30 hand, our FISH technique detects regions in the genomes that are highly
31 enriched in very long stretches of SSRs (pure or probably degenerate) or SSRs
32 that are incorporated in repeats forming higher order structures and thus cannot

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 be amplified by PCR.

2

3 ***The abundance of di- and trinucleotide repeats in wheat chromosomes***

4 No clusters of AT and GC were detected by *in situ* hybridization. This result
5 suggests that these sequences are either shorter or less clustered than the rest
6 of the SSRs analysed in this study. The lower frequencies of AT and GC motifs
7 found in wheat DNA sequence databases in comparison with the AG and AC
8 repeats support the idea that the wheat chromosome does not contain long
9 clusters of these motifs (Kantety et al., 2002; La Rota et al., 2005). However we
10 cannot rule out the idea that the use of oligonucleotides like (AT)₁₀ and (GC)₁₀
11 that have the ability to form intra-molecular hairpins and can self-complement
12 cannot be accurately labelled and used in hybridization experiments, hence the
13 absence of these sequences may be due to the poor hybridization efficiency.

14 (AC)₈, used to detect (AC)_n and (CA)_n in different reading frames or
15 (GT)_n and (TG)_n on a complementary strand, was found dispersed over the
16 length of all wheat chromosomes, resembling the distribution pattern of
17 retrotransposons and other families of dispersed (Muñiz et al., 2001). This result
18 agrees with the sequencing data available which has revealed that a
19 considerable proportion of SSRs, particularly AC, is associated with
20 retrotransposons-like sequences in cereals (Motohashe et al., 1997; Ramsay et
21 al., 1999). On the other hand, as we showed previously (Cuadrado et al., 2000),
22 the (AG)₁₂ probe, was detected on chromosomes arms 3BS, 4BL, 5BS and
23 5BL. Now, using the same experimental condition and wheat variety, a novel
24 and stronger *in situ* signal was observed on 6BS. These results suggest that the
25 high level of length variation that characterizes SSRs sequences is also
26 observed cytogenetically as a polymorphism affecting the presence/absence of
27 *in situ* signals.

28 All trinucleotide SSRs were found in wheat chromosomes, however clear
29 differences were observed in both the abundance and intensity of the signals,
30 characterizing the hybridization patterns of each trinucleotide probe (as for the
31 dinucleotide repeats). Although no attempt has been made to quantify the
32 chromosome content of different repeat motifs, clearly AAG, AGG, AAC and

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 CAC were the most common in wheat chromosomes, in which they are
2 preferentially associated with condensed chromatin or heterochromatin (Gill et
3 al. 1991; Fig.2c). These results do not agree with the frequency of SSR motifs
4 obtained by exploring the wheat sequence databases, in which the trinucleotide
5 CCG appears as the most recurrent motif (Kantery et al., 2002; Thiel et al.,
6 2003). The complete sequence of the genome of wheat is not yet available (nor
7 is those of any large-genome plants) – their DNA databases mainly containing
8 sequences rich in protein-coding genes. The contrast between the results for
9 the physical presence of SSR in chromosomes with those procured by
10 screening database sequences suggests that current estimates of SSRs
11 frequencies in many organisms may differ substantially from reality- at least in
12 species such as bread wheat with a genome composed of more than 80% of
13 repetitive DNA (Smith and Flavell, 1975) and whose heterochromatin has a high
14 SSRs content (Cuadrado et al., 2000)

16 **SSRs as wheat chromosome landmarks**

17 On the basis of *in situ* hybridization distribution patterns obtained with the entire
18 set of probes we are able to classify the motifs of repetition present in the SSRs
19 into three groups: (1) motifs which were preferentially located in the
20 pericentromeric region of the B genome chromosomes, resembling the
21 constitutive heterochromatin distribution of wheat: AAC, AAG, AGG, CAC, AAT,
22 ACG, CAG; (2) motifs which hybridised in only one or few single sites per
23 chromosome: AG, CAT and ACT; and (3), motifs dispersed over the length of all
24 wheat chromosomes: AC and GCC. Although the last class of SSRs, is not
25 suitable as a diagnostic tool for wheat chromosome identification it is interesting
26 to note that most of the probes analysed are included in the others two groups,
27 thus making SSRs *in situ* hybridization a suitable and versatile tool in wheat
28 cytogenetics in general. The first class provides an advantage in the specific
29 identification of the B genome. Their seven chromosomes are easily localized in
30 a wheat metaphase spread with these motifs (Fig. 1c-d and 2a). Those that
31 have the richest patterns, such as AAC, AAG, AGG and CAC provide the
32 means to distinguish these chromosomes individually but also some A and D

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 genome chromosomes (Fig. 2c); however their diagnostic value often depends
2 on having high quality and complete metaphase spread. In plant breeding
3 where it is often necessary to screen large populations of plants for the
4 presence of particular chromosomes, the use of these cytogenetic markers will
5 not be reliable. On the other hand, the second class of probes, such as (AG)₁₂
6 and (ACT)₅, provides the advantages to distinguish some individual
7 chromosomes easily, even if the quality of the metaphase spread is not ideal.
8 The advantage of SSRs versus cloned probes in plant cytogenetics has been
9 previously discussed (Cuadrado et al., 2000). With the exception of the (AAG)₅
10 that, as expected, resemble the same *in situ* pattern observed with a cloned
11 GAA-rich satellite sequence (Pedersen and Langridge, 1997), the chromosomal
12 distribution of the rest of di- and trinucleotide repeats does not correspond to
13 sites of any of the currently cloned tandem repeat sequences proved useful as
14 wheat chromosome markers (e.g., pTa794 (5S rDNA), pTa71 (45S rDNA),
15 pSc119,2 and pAs1). Thus, combining the SSRs motifs described here with
16 cloned probes, we are now able to cover the physical map of bread wheat with
17 many landmarks distributed on the 21 chromosomes. These are very useful to
18 improve the integration and localization of BAC contigs to a chromosome
19 segment: an initial step to further development of wheat genomics. Moreover
20 the possibility that others SSRs motifs, also abundant in the wheat genome (i.e.,
21 tetra-, penta- and hexanucleotide), would be useful as chromosome landmarks,
22 depends only on a small effort focussed towards the finding the most
23 informative. Undoubtedly, this will expand our ability to cytogenetically
24 characterize the long-range organization and molecular composition of wheat
25 chromatin, describe chromosome rearrangements, but also to follow and
26 manipulate individual chromosomes in breeding programmes.

Are SSRs involved in some aspect of Triticeae chromosome function and evolution?

27
28
29
30 Although SSRs are major components of many, if not all, eukaryotic genomes,
31 only a few species have been examined at chromosome level for the presence
32 and distribution of this class of tandemly repetitive DNA, characterized by the

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 shortest repeat unit (Lowenhaupt et al., 1987; Nanda et al., 1990; Schmidt and
2 Heslop-Harrison, 1996, Gotner et al., 1998, Cuadrado and Schwarzacher,
3 1998). However, knowledge of the physical distribution of these repeats in
4 related species may throw more light on the never ending debate about its
5 possible functional role. Recently, we have investigated the genomic distribution
6 of AG and AC repeats in the metaphase chromosomes of barley and man, and
7 in the metaphase and polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. The
8 conserved chromosome distribution of AC within and between these three
9 phylogenetically distant species, and the association of AG repeats in specific
10 chromosome regions with structural or functional properties, suggests that long
11 clusters of these repeats may have some as yet unknown role (Cuadrado and
12 Jouve 2007b).

13 Hexaploid wheat offers the opportunity of analysing three related
14 genomes as a whole, and hence compares the distribution of SSRs between
15 genomes and homeologous chromosomes. A similar pattern of SSRs
16 distribution in different genomes might suggest that the long stretches of a
17 particular SSR are of structural or functional importance. On the other hand,
18 variation in the abundance and distribution of these motifs between genomes
19 might offer the opportunity to elucidate the evolutionary trends of these
20 repetitive sequences during speciation. With the exception of AC and GCC that
21 render the same dispersed *in situ* pattern in all chromosomes of wheat and also
22 found in a similar localization in barley and rye chromosomes (Cuadrado and
23 Jouve 2007b and own unpublished data), AG repeats and the other
24 trinucleotide motifs are non-randomly spread along wheat chromosomes,
25 showing characteristic chromosome and genome dependent distribution
26 patterns.

27 The B genome chromosomes presented the richest patterns of *in situ*
28 signals with the entire set of probes analysed. In contrast, only clusters of AAG
29 and AGG were detected on some D genome chromosomes; suggesting that
30 their chromosomal localization is dispensable or they had been deleted during
31 the evolution of polyploidy wheat. Most of the motifs were found associated with
32 wheat heterochromatin, as has been also reported for barley (Cuadrado and

Cuadrado et al. SSRs in wheat

1 Jouve, 2007a), and their possible function, if any, could be related to a higher
2 order structure, constituting sequences that facilitated the special binding of
3 proteins with some functional relationship with the heterochromatin (Bennetzen,
4 2000; Redi et al., 2001) as has been demonstrated for the GAGA transcription
5 factor and *Drosophila* heterochromatin (Raff et al., 1994). In the same way, AC
6 and GCC motifs, which were found lying almost entirely within the euchromatic
7 portion of the wheat, barley and rye chromosomes, might suggest that these
8 SSRs are of functional importance as an ancient genomic component of the
9 tribe *Triticeae*. In conclusion, the similar chromosome distribution found for the
10 same SSRs between different genomes suggests that the abundance of motifs
11 does not reflect random selection from all possible simple combination of bases,
12 generated by polymerase slippage during replication (Schlotterer and Tautz,
13 1992). The motif-dependent distribution of SSRs may play a structural,
14 functional and evolutionary role, as least in the genomes of the tribe *Triticeae*.

16 **Acknowledgements**

17 This study was supported by a Grant from MEC (*Ministerio de Educación y*
18 *Ciencia*) of Spain for Scientific Research (AGL2006-09018-C02) and CAPES
19 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) of Brazil
20 through a fellowship to Milena Cardoso. The authors would like to thank Hedy
21 Hofmann for linguistic assistance.

23 **References**

- 24 Bennett MD, Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos*
25 *Trans R Soc London [Biol]* 274:227-274
- 26 Bennetzen JL (2000) The many hues of plant heterochromatin. *Genome Biol.*
27 107:1-4
- 28 Cuadrado A, Schwarzacher T (1998) The chromosomal organization of simple
29 sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* 107:587-
30 594.

Cuadrado et al. SSRs in wheat

- 1
2
3
4
5 1 Cuadrado A, Schwarzacher T, Jouve N (2000) Identification of different
6 2 chromatin classes in wheat using *in situ* hybridization with simple
7 3 sequence repeat oligonucleotides. Theor Appl Genet 101:711-717
8 4
9 4 Cuadrado A, Jouve N (2002) Evolutionary trends of different repetitive DNA
10 5 sequences during speciation in genus *Secale*. Journal of Heredity. 93:
11 6 339-345
12 7
13 7 Cuadrado A, Jouve N (2007a) The non-random distribution of long clusters of
14 8 all possible classes of tri-nucleotide repeats in barley chromosomes.
15 9 Genome Research (in press)
16 10
17 10 Cuadrado A, Jouve, N (2007b) Similarities in the chromosomal distribution of
18 11 AG and AC repeats within and between *Drosophila*, human and barley
19 12 chromosomes. Cytogen, Genome Res (in press)
20 13
21 14
22 14 Dennis ES, Gerlach WL, Peacock WJ (1980) Identical polypyrimidine-
23 15 polypurine satellite DNAs in wheat and barley. Heredity 44:349-366
24 16
25 16 Gill BS, Friebe B, Endo TR (1991) Standard karyotype and nomenclature
26 17 system for description of chromosome bands and structural aberrations
27 18 in wheat (*Triticum aestivum*). Genome 34:830-839
28 19
29 19 Gortner G, Nenno M, Weising K, Zink D, Nagl W, Kahl G (1998) Chromosomal
30 20 localization and distribution of SSRs and the *Arabidopsis*-type telomere
31 21 sequence in the genome of *Cicer arietinum* L. Chromosome Res 6:97-
32 22 104
33 23
34 23 Gupta K, Balyan S, Edwards J, Isaac P, Korzun V, Roder M, et al. (2002)
35 24 Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat.
36 25 Theor Appl Genet 105:413-422
37 26
38 26 Hayden MJ, Stephenson P, Logojan AM, Khatkar D, Rogers C, Elsden J, et al.
39 27 (2006) Development and genetic mapping of sequence-tagged
40 28 microsatellites (STMs) in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl
41 29 Genet 113:1271-1281
42 30
43 30 Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anamthawat-Jónson K, Leitch AR, Shi M,
44 31 Leitch IJ (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome
45 32 denaturation. Technique- J Meth Cell Mol Biol 3:109-116
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Cuadrado et al. SSRs in wheat

- 1 IJiang J, Gill BS (1994) Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome
mapping: the first 10 years. *Genome* 37:717-725
- 2 Jurka J, Pethiyagoda C (1995) Simple repetitive DNA sequences from primates:
3 compilation and analysis. *J Mol Evol* 40:120-126
- 4 Kantery RV, La Rota M, Matthews DE, Sorrells ME (2002) Data mining for
5 simple sequences repeats in expressed sequence tags from barley,
6 maize, rice, sorghum and wheat. *Plan Mol Biol* 48:501-510
- 7 La Rota M, Kantery RV, Yu J, Sorrells ME (2005) Nonrandom distribution and
8 frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice,
9 wheat, and barley. *BMC Genomics* 6:23
- 10 Lowenhaupt K, Rich A, Pardue ML (1989) Nonrandom distribution of long
11 mono- and dinucleotide repeats in *Drosophila* chromosomes:
12 Correlations with dosage compensation, heterochromatin and
13 recombination. *Mol Cell Biol* 9:1173-1182
- 14 McIntyre CL, Pereira S, Moran LB, Apples R (1990) New *Secale cereale* (rye)
15 DNA derivatives for the detection of rye chromosome segments in wheat.
16 *Genome* 33:317-323
- 17 Motohashi R, Mochizuki K, Ohtsubo H, Ohtsubo E (1997) Structure and
18 distribution of p-Sine1 members in rice genomes. *Theor Appl Genet*
19 95:359-368
- 20 Mukai Y, Nakahara Y, Yamamoto M (1993) Simultaneous discrimination of the
21 three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ*
22 hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes.
23 *Genome* 36:489-494
- 24 Muñiz LM, Cuadrado A, Jouve N, Gonzalez JM. (2001) The detection, cloning,
25 and characterisation of WIS 2-1 A retrotransposon-like sequences in
26 *Triticum aestivum* L. and *x Triticosecale* Wittmack and an examination of
27 their evolution in related *Triticeae*. *Genome* 44:979-989
- 28 Nanda I, Zischler H, Epplen C, Guttenbach M, Schmid M (1991) Chromosomal
29 organization of simple repeated DNA sequences used for DNA
30 fingerprinting. *Electrophoresis* 12:193-203
- 31

Cuadrado et al. SSRs in wheat

- 1
2
3
4
5 1 Pedersen C, Rasmussen SK, Linde-Laursen I (1996) Genome and
6 2 chromosome identification in cultivated barley and related species of the
7 3 *Triticeae* (*Poaceae*) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite
8 4 sequence. *Genome* 39:93-104
9
10 5 Pedersen C, Langridge P (1997) Identification of the entire chromosome
11 6 complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome* 40:589-593
12 7
13 8 Ramsay L, Macaulay M, Cardle L, Morgante M, Ivanissewith S, Maestri E,
14 9 Powell W, Waugh R (1999) Intimate association of microsatellite repeats
15 10 with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley.
16 11 *Plant J* 17:415-525
17 12 Rayburn AL, Gill BS (1986) Molecular identification of the D-genome
18 13 chromosomes of wheat. *J Hered* 77:253-255
19 14 Raff JW, Kellum R, Alberts B (1994) The *Drosophila* GAGA transcription factor
20 15 is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell
21 16 cycle. *EMBO* 13:5977-5983
22 17 Redi CA, Garagna S, Zacharias H, Zuccotti M, Capanna E (2001) The other
23 18 chromatin. *Chromosoma* 110:136-147
24 19 Röder MS, Plaschke J, König SU, Börner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganai
25 20 MW (1995) Abundance, variability and chromosomal location of
26 21 microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet* 246:327-333
27 22 Schlotterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA.
28 23 *Nucleic Acids Res* 20:211-215
29 24 Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1996) The physical and genomic organization
30 25 of microsatellites in sugar beet. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8761-8765
31 26 Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS (1989) *In situ*
32 27 localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot* 64:315-324
33 28 Schlotterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA.
34 29 *Nucleic Acids Res* 20:211-215
35 30 Sears ER (1952) Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma*
36 31 4:535-550
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Cuadrado et al. SSRs in wheat

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 1 Smith DB, Flavell RB (1975) Characterisation of the wheat genome by
2 renaturation kinetics. *Chromosoma* 50:223-242
- 3 Somers DJ, Isaac P, Edwards K (2004) A high-density microsatellite consensus
4 map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 109:1105-
5 1114
- 6 Song QJ, Shi JR, Singh S, Fickus EW, Costa JM, Lewis J, et al. (2005)
7 Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat.
8 *Theor Appl Genet* 110:550-560
- 9 Thiel T, Michalek W, Varshney RK, Graner A (2003) Exploiting EST databases
10 for the development and characterization of gene-derived SSR-markers
11 in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Theor Appl Genet* 106:411-422

Cuadrado et al. SSRs in wheat

Table 1: Occurrence and chromosome location of some SSRs on the chromosomes of wheat

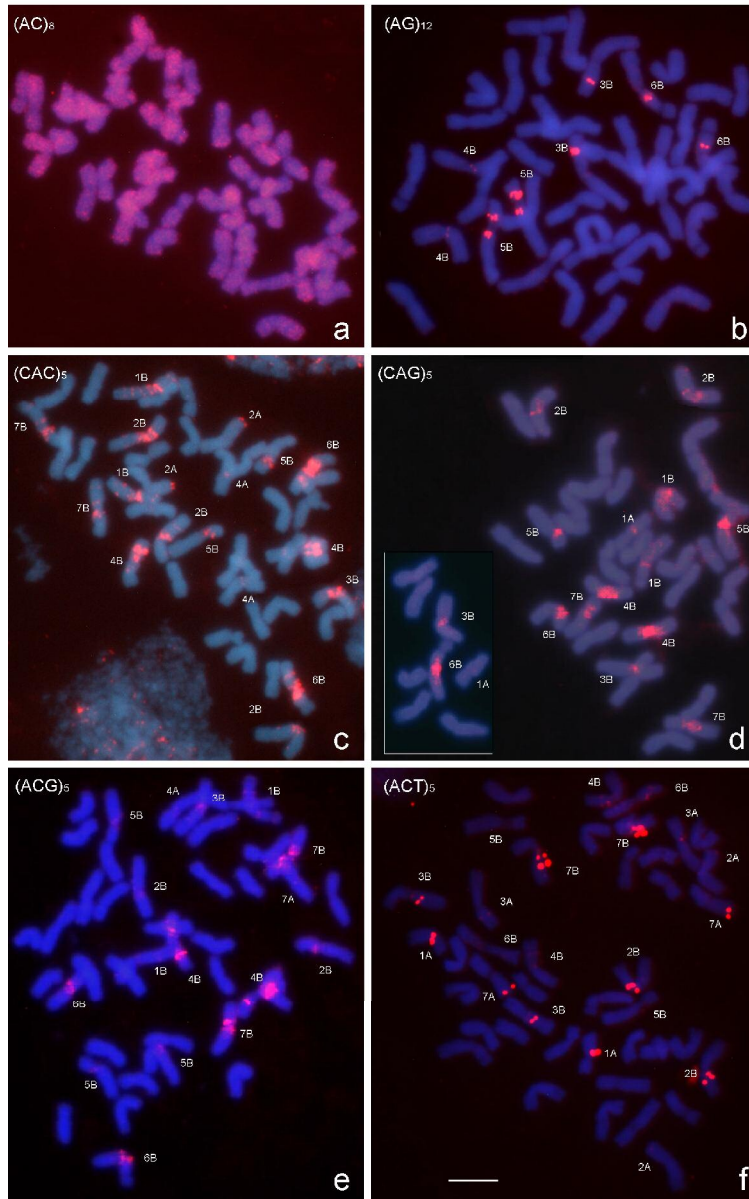
Probes	Genome A	Genome B	Genome D
(AC)₈	Dispersed signals scattered along the chromosomes, interspersed between gaps	Dispersed signals scattered along the chromosomes, interspersed between gaps	Dispersed signals scattered along the chromosomes, interspersed between gaps
(AG)₁₂	No signals	Distinctive signals in 3BS, 4BL, 5BS, 5BL and 6BS	No signals
(AAC)₅	Distinctive signals in 2A, 4A and 7A	Strong pericentromeric and intercalary signals of different intensity	No signals
(AAG)₅	Distinctive signals in all chromosomes except 1A	Strong pericentromeric and intercalary signals of different intensity	Distinctive signals in 1D, 2D and 7D
(AGG)₅	Distinctive signals of different intensity in all chromosomes	Strong pericentromeric and intercalary signals of different intensity	Weak single in 2D, 5A and 7A
(CAC)₅	Single signals in 2A and weaker in 4A	Pericentromeric and intercalary signals of different intensity	No signals
(ACG)₅	Weaker signals in 4A and 7A	Weak pericentromeric but weaker in 1B,2B, 3B and 5B	No signals
(CAG)₅	Single signals in 1A and weaker in 4A and 7A	Pericentromeric signals of different intensity	No signals
(CAT)₅	No signals	Distinctive signal in 3BS	No signals
(ACT)₅	Single signals of different intensity in 1A, 2A, 3A and 7A	Distinctive signals of different intensity in 2B, 3B, 4B, 5B, 6B and 7B	No signals
(ATT)₅	Very weak single signals in 1A and 7A	Weak pericentromeric signals	No signals
(GCC)₅	Weak dispersed signals	Weak dispersed signals	Weak dispersed signals

Cuadrado et al. SSRs in wheat

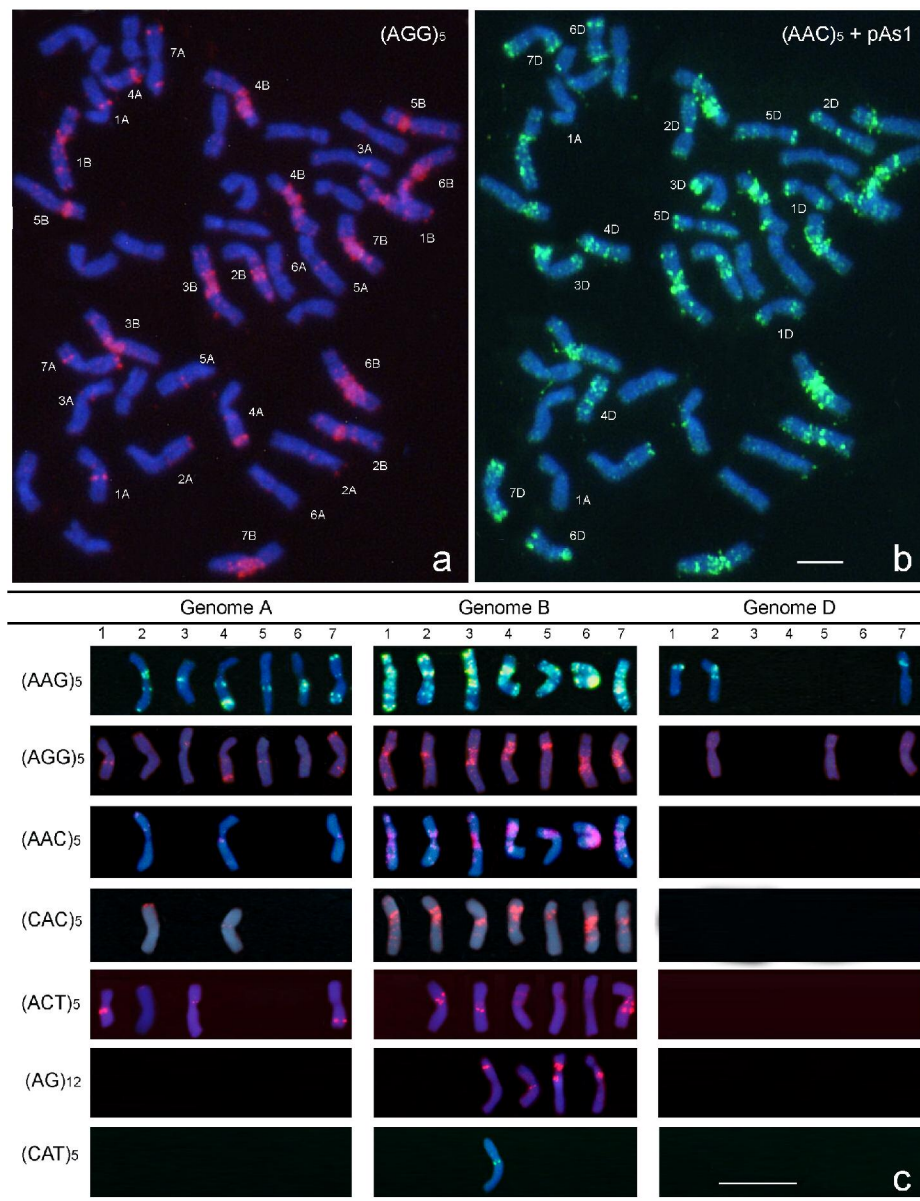
1 **Figure 1:**

2 Photomicrographs showing the distribution of several SSRs on metaphase
3 chromosomes of *T. aestivum* after DAPI staining (blue) and *in situ* hybridization
4 with the biotin-labelled probes (detected by red Cy3): **a)** (AC)₈; **b)** (AG)₁₂. **c)**
5 (CAC)₅. **d)** (CAG)₅. Two images were needed to capture the complete
6 metaphase. **e)** (ACG)₅ and **f)** (ACT)₅. To identify signal-bearing chromosomes,
7 FISH was performed combining the SSRs with markers probes. Scale bar
8 = 10 μm.

9
10 **Figure 2:** Photomicrographs showing the distribution of several SSRs on
11 metaphase chromosomes of wheat Chinese Spring after DAPI staining and *in*
12 *situ* hybridization with biotin-labelled probes (detected by red Cy3) or
13 digoxigenin-labelled probes (detected by green FITC). **a-b)** A metaphase
14 chromosomes after *in situ* hybridization with **(a)** (AGG)₅. All chromosomes were
15 identified using the **(b)** pAs1 (All D genome chromosomes and 1A can be
16 identified) and (AAC)₅ (All B genome chromosomes and chromosomes 2A, 4A
17 and 7A can be identified) distribution pattern. The three pairs of A
18 chromosomes without *in situ* signals (3A, 4A and 6A) can be morphologically
19 identified; **c)** Karyotype. From top to bottom each panel shows only
20 chromosomes with *in situ* signals. Chromosomes after two-colour FISH with
21 (AAG)₅ and (AAC)₅ were chosen from the same metaphase. Chromosomes
22 after FISH with the (AGG)₅, (CAC)₅ and (ACT)₅ probes were chosen from
23 metaphases showing in Fig. 2a, 1c, and 1f, respectively. AG and CAT signal-
24 bearing chromosomes were chosen from the same metaphase (Fig. 1b) after
25 two-colour FISH with (AG)₁₂ and (CAT)₅. Scale bar = 10 μm.



Photomicrographs showing the distribution of several SSRs on metaphase chromosomes of *T. aestivum* after DAPI staining (blue) and in situ hybridization with the biotin-labelled probes (detected by red Cy3): a) (AC)8; b) (AG)12. c) (CAC)5. d) (CAG)5. Two images were needed to capture the complete metaphase. e) (ACG) 5 and f) (ACT) 5. To identify signal-bearing chromosomes, FISH was performed combining the SSRs with markers probes. Scale bar = 10 μ m.
153x245mm (300 x 300 DPI)



Photomicrographs showing the distribution of several SSRs on metaphase chromosomes of wheat Chinese Spring after DAPI staining and in situ hybridization with biotin-labelled probes (detected by red Cy3) or digoxigenin-labelled probes (detected by green FITC). a-b) A metaphase chromosomes after in situ hybridization with (a) (AGG)₅. All chromosomes were identified using the (b) pAs1 (All D genome chromosomes and 1A can be identified) and (AAC)₅ (All B genome chromosomes and chromosomes 2A, 4A and 7A can be identified) distribution pattern. The three pairs of A chromosomes without in situ signals (3A, 4A and 6A) can be morphologically identified; c) Karyotype. From top to bottom each panel shows only chromosomes with in situ signals. Chromosomes after two-colour FISH with (AAG)₅ and (AAC)₅ were chosen from the same metaphase. Chromosomes after FISH with the (AGG)₅, (CAC)₅ and (ACT)₅ probes were chosen from metaphases showing in Fig. 2a, 1c, and 1f, respectively. AG and CAT signal-bearing

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**chromosomes were chosen from the same metaphase (Fig. 1b) after two-colour FISH with (AG)12 and (CAT)5 .Scale bar = 10 μ m.
160x206mm (300 x 300 DPI)**

For Peer Review