

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANDERSON SIMIONATO MILIOLI

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DE MARCADORES SNPs COM A
RESISTÊNCIA DO TRIGO A GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2017

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

ANDERSON SIMIONATO MILIOLI

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DE MARCADORES SNPs COM A
RESISTÊNCIA DO TRIGO A GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2017

ANDERSON SIMIONATO MILIOLI

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DE MARCADORES SNPs COM A
RESISTÊNCIA DO TRIGO A GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Benin

PATO BRANCO

2017

M644a Milioli, Anderson Simionato.
Associação genômica de marcadores SNPs com a resistência do trigo a germinação pré-colheita / Anderson Simionato Milioli. -- 2017
52 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Benin
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2017.
Bibliografia: f. 43 – 52.

1. Trigo – Melhoramento genético. 2. Marcadores genéticos. 3. Trigo – Germinação. I. Benin, Giovani, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD (22. ed.) 630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 141

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DE MARCADORES SNPs COM A RESISTÊNCIA DO
TRIGO A GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA**

por

ANDERSON SIMIONATO MILIOLI

Dissertação apresentada às treze horas e trinta minutos do dia nove de fevereiro de dois mil e dezessete, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Giovani Benin
Orientador

Prof.^a Dr.^a Taciane Finatto
UTFPR/Pato Branco

Prof. Dr. Paulo Henrique de Oliveira
UTFPR/Pato Branco

Dr. Ivan Schuster
Dow Agrosiences

Prof. Dr. Giovani Benin
Coordenador do PPGAG

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa

Aos meus pais, Vilmar e Maria Salete
Pelo carinho, apoio e educação
Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela saúde, foco e motivação.

Aos meus pais e ao meu irmão, que sempre me apoiaram e me incentivaram para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu orientador Giovani Benin, pela paciência e valiosa orientação para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Taciane Finatto, pela valiosa orientação repassada desde a graduação.

Ao Dr. Ivan Schuster, pelo auxílio na análise dos dados e interpretação dos resultados deste trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia e do grupo de melhoramento genético vegetal da UTFPR.

Aos professores e funcionários da UTFPR, e a todos que de alguma forma contribuíram para mais esta conquista.

Muito Obrigado.

RESUMO

MILIOLI, Anderson Simionato. Associação genômica de marcadores SNPs com a resistência do trigo a germinação pré-colheita. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2017.

A germinação pré-colheita em trigo, têm sido responsável por perdas consideráveis de produtividade e qualidade em diversas regiões produtoras a nível mundial. Diversos programas de melhoramento têm buscado selecionar genótipos com elevados níveis de resistência, mas em função da complexidade da característica, os avanços obtidos são pouco expressivos, e técnicas mais eficientes para identificação de genótipos superiores são necessárias. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi realizar uma análise de associação genômica, a fim de identificar marcadores SNPs e regiões genômicas associadas com a resistência a germinação pré-colheita em trigo, para posterior utilização em seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Para isso, foram utilizados 344 genótipos de trigo de diferentes empresas obtentoras e épocas de lançamento, que representam a base genética do trigo cultivado no Brasil. O experimento foi constituído por três etapas principais: a genotipagem, a fenotipagem e a análise de associação genômica. Para a genotipagem, foi realizada a extração e quantificação do DNA, e as amostras foram genotipadas com um chip de DNA para detecção de SNPs contendo 35 mil SNPs para o genoma do trigo. Na etapa de fenotipagem, foi conduzido um experimento em Cascavel-PR, em delineamento experimental de blocos casualizados com três repetições. Os genótipos foram avaliados na maturidade fisiológica, a partir da coleta de 20 espigas por genótipo, as quais foram submetidas a um simulador de chuva para germinação, sendo então atribuídas notas de acordo com o índice de germinação apresentado. Após as determinações genotípicas e fenotípicas, foi realizada a análise de associação genômica a fim de identificar marcadores moleculares associados com a resistência à germinação pré-colheita. Foram identificados dez marcadores significativos nos cromossomos 3B, 4A, 5B, 5D, 6D, 7B e 7D, onde estão presentes QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associados com a resistência a germinação pré-colheita. Os SNPs foram localizados em genes codificadores de enzimas envolvidas em vias de sinalização de giberelinas e ácido abscísico, hidrólise de maltose e alongamento e divisão celular. A explicação da variação fenotípica pelos marcadores significativos variou de 4,2 a 5,4%, o que é esperado para caracteres quantitativos. Os marcadores significativos identificados no presente estudo, após validados, poderão ser utilizados em programas de SAM, para a seleção precoce de genótipos mais resistentes a germinação pré-colheita, propiciando a obtenção de genótipos desejáveis de maneira mais ágil e precisa.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* L. Polimorfismos de um Único Nucleotídeo. Seleção precoce.

ABSTRACT

MILIOLI, Anderson Simionato. Genome-wide association of SNPs markers with wheat resistance to pre-harvest sprouting. 52 f. Dissertation (Masters in Agronomy) – Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2017.

Pre-harvest sprouting (PHS) in wheat, has been responsible for considerable losses in productivity and quality in several growing regions worldwide. Several breeding programs have sought to select genotypes with high levels of resistance, but due to the complexity of the trait, the advances achieved are inexpressive, and most efficient techniques to identify superior genotypes are demanded. Thus, the objective of this study was to perform a genome-wide association analysis, for identify SNPs markers and genomic regions associated with resistance to PHS in wheat, for later use in marker-assisted selection (MAS). For this, 344 wheat genotypes of different times and companies that represents the genetic basis of wheat grown in Brazil were used. The experiment consisted of three main steps: genotyping, phenotyping and genome-wide association analysis. In the genotyping step, the DNA extraction and quantification was conducted, and the samples were genotyped with a DNA chip for detection of SNPs containing 35,000 SNPs for the wheat genome. In the phenotyping step, an experiment was conducted in Cascavel-PR, in a randomized block design with three replicates. The genotypes were evaluated at physiological maturity, with the collection of 20 spikes per genotype, and these were subjected to a simulated rainfall for germination, being then allocated scores according to the germination rate observed. After the genotypic and phenotypic determinations, it was conducted a genome-wide association analysis to identify molecular markers associated with resistance to PHS. Ten significant markers were identified on chromosomes 3B, 4A, 5B, 5D, 6D, 7B and 7D, where QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associated with pre-harvest sprouting resistance are present. The SNPs were localized in genes encoding enzymes involved in the gibberellin and abscisic acid signaling pathways, maltose hydrolysis and cell division and stretching. The explanation of the phenotypic variation by the significant markers ranged from 4.2 to 5.4%, which is expected for quantitative traits. Significant markers identified in the present study, after being validated, could be used in MAS programs for the early selection of genotypes more resistant to PHS in wheat, allowing the obtainment of desirable genotypes in the more agile and precise way.

Keywords: *Triticum aestivum* L. *Single Nucleotide Polymorphism*. Early selection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Distribuição das frequências das notas de fenotipagem para germinação pré-colheita de 344 genótipos de trigo, de acordo com a metodologia proposta por McMaster e Derera (1976). UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017..... 32
- Figura 2 – Gráfico Manhattan Plot da análise de associação genômica para germinação pré-colheita em trigo. A linha paralela indica o valor de LOD score = 3, correspondendo ao limite de p -value < 0,001. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017. 34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Genótipos de trigo utilizados na análise de associação genômica para resistência a germinação pré-colheita. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017..... 27
- Tabela 2 – Marcadores SNPs significativos na análise de associação genômica para germinação pré-colheita em trigo, com a identificação dos alelos, cromossomos, posição (cM), valor - $\text{Log}^{10}(p)$ e R^2 . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017..... 34
- Tabela 3 – Cromossomos, *locus*, posição, funções descritas para os genes e sequências flanqueadoras dos dez SNPs significativos na análise de associação genômica para germinação pré-colheita em trigo. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017. 36

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

ABA	Ácido Abscísico
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AUX	<i>Auxin</i>
IAA	<i>Indole Acetic Acid</i>
CRL	<i>Subunidades de ubiquitinas E3 ligases do tipo CULLIN-RING</i>
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COODETEC	Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola
DELLA	Reguladores negativos da sinalização de giberelinas
DIC	<i>Deviance Information Criterion</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GA	Giberelina
GAMYB	<i>Giberelic Acid MYB</i>
GARE	<i>Gibberellin Response Elements</i>
GID1	<i>GA Insensitive Dwarf1</i>
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
MAS	<i>Marker assisted selection</i>
MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
MLM	Modelos Lineares Mistos
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NEDD8	<i>Neural precursor cell expressed developmental down-regulated8</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RAPD	<i>Randon Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RUB	<i>Related to ubiquitin</i>
SAM	Seleção Assistida por Marcadores
SCF	<i>Skp1 / Cullin or CDC53 / F-box protein</i>
SLY1	<i>F-box Sleepy1</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Vp	Vivíparos

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
cm	Centímetro
Dr.	Doutor
m	Metro
m^2	Metro quadrado
mm h^{-1}	Milímetro por hora
nm	Nanômetro
PR	Paraná
Prof.	Professor
RS	Rio Grande do Sul
1A	Cromossomo 1 do subgenoma A
2B	Cromossomo 2 do subgenoma B
3D	Cromossomo 3 do subgenoma D

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
R ²	Coefficiente de determinação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 A CULTURA DO TRIGO	18
2.2 GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA EM TRIGO	19
2.2.1 Impactos na Cultura	19
2.2.2 Controle Molecular da Germinação Pré-colheita.....	19
2.2.3 Caracterização/Seleção para Germinação Pré-colheita.....	21
2.3 SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES	22
2.4 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA (GWAS)	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO DE FENOTIPAGEM	27
3.2 GENOTIPAGEM E ANÁLISE DOS DADOS	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos cereais mais importantes na dieta humana (TIAN et al., 2011; FENG et al., 2014), sendo componente de inúmeros produtos na indústria alimentícia e fornecendo aproximadamente 20% das calorias consumidas a nível mundial (PFEIFER et al., 2014), estando entre os cereais mais produzidos e consumidos em todo o mundo. A produção nacional de trigo situa-se na faixa de 5,5 milhões de toneladas, tendo os estados do PR e RS como maiores produtores (CONAB, 2016).

Um dos principais problemas relacionados à produção de trigo, e que afeta negativamente a cultura, é a germinação pré-colheita. Esta é responsável por perdas consideráveis de produtividade e qualidade de uso, além de diminuir o valor comercial dos grãos (BIDDULPH et al., 2008; RASUL et al., 2012; CABRAL et al., 2014; CARVALHO e BELEIA, 2015). Esse problema é mais acentuado em regiões produtoras que apresentam chuvas excessivas no momento da colheita (GAO et al., 2013; LIU et al., 2013; SHU et al., 2015). Em algumas regiões produtoras, a obtenção da resistência tem sido considerada prioridade em programas de melhoramento desde o final da década de 1960 (DEPAUW et al., 2012).

A germinação pré-colheita é caracterizada como uma das principais limitações na obtenção de produtos finais de qualidade (SIMSEK et al., 2014), ocasionando perdas financeiras significativas tanto para agricultores, quanto para as indústrias de processamento (ANDREOLI et al., 2006; CARVALHO e BELEIA, 2015). Além do Brasil, a germinação pré-colheita afeta significativamente muitas outras regiões produtoras a nível mundial, principalmente na Europa, Austrália, EUA, Canadá, África do Sul, Ásia Central, Nova Zelândia, Chile, Argentina, entre outros (CUNHA et al., 2004; BIDDULPH et al., 2007; GAO et al., 2013; LIU et al., 2013). Frente as limitações existentes, o desenvolvimento de cultivares que apresentem níveis mais elevados de resistência é desejável (GAO et al., 2013) e fundamental para redução de perdas em áreas onde esse problema é mais pronunciado (DEPAUW et al., 2012; LIU et al., 2013).

Vários tipos de estudos já foram realizados visando o desenvolvimento de cultivares mais resistentes a germinação na pré-colheita (KUMAR et al., 2010; KULWAL et al., 2012; CABRAL et al., 2014). Uma das técnicas promissoras que vem

sendo implantadas em programas de melhoramento com o intuito de auxiliar no processo de seleção é a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Dentre os marcadores moleculares atualmente disponíveis, destacam-se os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), que depois de identificados no genoma, podem ser associados com fenótipos de interesse para posterior utilização em SAM (HAMBLIN et al., 2011).

A possibilidade de genotipagem em alta densidade, permite que marcadores SNPs sejam utilizados em análises de associação genômica ampla (GWAS – *Genome Wide Association Studies*). Esta técnica caracteriza-se pela associação de marcadores moleculares com fenótipos de interesse (KORTE e FARLOW, 2013), cuja associação se dá pelo desequilíbrio de ligação entre marcadores e genes/QTLs associados a característica em estudo.

Até o início deste século, a grande maioria dos estudos de mapeamento genético era baseado em mapas de ligação, os quais necessitavam do desenvolvimento de populações estruturadas. Nestes estudos, o mapeamento era realizado em populações F₂ ou em retrocruzamentos (COLLARD et al., 2005 apud CASTRO e PEREIRA, 2008). As principais limitações deste método era o baixo número de eventos de recombinação, resultando em baixa resolução no mapeamento, e ainda, o fato de poucos alelos por *locus* poderem ser estudados simultaneamente. Nem mesmo com o uso de linhas endogâmicas recombinantes, que permitem um maior número de eventos de recombinação, era possível obter uma boa resolução no mapeamento (FLINT-GARCIA et al., 2003 apud CASTRO e PEREIRA, 2008). Neste sentido, as análises GWAS superam muitas das limitações existentes no mapeamento convencional, pois não há necessidade de utilizar populações estruturadas. As mesmas podem ser utilizadas para vários caracteres simultaneamente, além de permitirem uma maior resolução dos dados, uma vez que o uso de populações naturais aproveita os eventos de mutação e recombinação acumulados ao longo das gerações (WRAY e VISSCHER, 2008 apud CASTRO e PEREIRA, 2008). Em função disso, análises GWAS estão sendo cada vez mais utilizadas para identificação de marcadores moleculares associados a características de interesse.

O objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores SNPs associados com a resistência a germinação pré-colheita em trigo via análise de associação genômica ampla (GWAS), para que estes possam ser utilizados como marcadores na seleção precoce para esta característica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO TRIGO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos cereais mais importantes na dieta humana em todo o mundo (TIAN et al., 2011; FENG et al., 2014), sendo matéria-prima de inúmeros produtos na indústria alimentícia e fornecendo aproximadamente 20% das calorias consumidas a nível mundial (PFEIFER et al., 2014). Segundo dados da FAO, a produção de trigo a nível mundial é de aproximadamente 730 milhões de toneladas (FAO, 2016).

A produção nacional de trigo situa-se na faixa de 5,5 milhões de toneladas, quantidade insuficiente para atender a demanda interna que é de 12 milhões de toneladas, o que torna o país um grande importador do cereal. A produção brasileira se concentra basicamente na região Sul do país, que detêm aproximadamente 90% da produção nacional, tendo os estados do PR e RS como maiores produtores (CONAB, 2016).

A cultura apresenta elevada importância a nível nacional, principalmente na região Sul do país, sendo considerada a principal opção de cultivo de inverno (VIOLA et al., 2013), por ser uma fonte extra de renda e por contribuir com o sistema de rotação de culturas, viabilizando o sistema de plantio direto. Na safra 2016, a área cultivada com trigo na região Sul superou 2 milhões de hectares (CONAB, 2016).

O genoma do trigo apresenta $2n=6x=42$ cromossomos, sendo um alohexaplóide composto por três subgenomas estreitamente relacionados (A, B e D). No ano de 2014, o trigo teve seu genoma sequenciado pelo *The International Wheat Genome Sequencing Consortium* (IWGSC), sendo identificadas mais de 17 bilhões de bases (Gb) e 124.201 locos gênicos. Além disso, foram identificados mais de 2,3 milhões de SNPs (IWGSC, 2014).

2.2 GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA EM TRIGO

2.2.1 Impactos na Cultura

A germinação pré-colheita caracteriza-se como um dos principais problemas da cultura do trigo (GAO et al., 2013), causando perdas consideráveis de produtividade e qualidade de uso, além de reduzir o valor comercial dos grãos (BIDDULPH et al., 2008; DEPAUW et al., 2012; RASUL et al., 2012; CABRAL et al., 2014). É responsável por causar prejuízos tanto para agricultores, quanto para indústrias de processamento, afetando não só a produção nacional, mas também diversas outras regiões a nível mundial, incluindo a Europa, Austrália, EUA, Canadá, África do Sul, Ásia Central, Nova Zelândia, Chile, Argentina, entre outras regiões produtoras onde ocorrem chuvas excessivas no momento da colheita (CUNHA et al., 2004; GAO et al., 2013; LIU et al., 2013).

Neste sentido, o desenvolvimento de cultivares de trigo com maiores níveis de resistência têm sido uma meta prioritária em programas de melhoramento (DEPAUW et al., 2012; GAO et al., 2013; LIU et al., 2013). No entanto, por ser uma característica de controle genético complexo, o sucesso na obtenção de genótipos resistentes têm sido reduzido. Neste contexto, o uso de técnicas como a SAM merece destaque (COLLARD e MACKILL, 2008; MARES e MRVA, 2014), pois permite identificar precocemente genótipos superiores com maior eficiência e precisão.

Comparada aos métodos convencionais de seleção, a SAM possui uma maior eficiência por ser realizada com base em variações genótípicas, e portanto, não sofre influência do ambiente. Além disso, possibilita a seleção dos genótipos em fases iniciais de desenvolvimento da cultura, reduzindo tempo e custos. Assim, a identificação de marcadores associados a germinação em pré-colheita, apresenta-se promissora para suprir muitas das limitações existentes atualmente nos programas de melhoramento.

2.2.2 Controle Molecular da Germinação Pré-colheita

No processo germinativo, ocorre o desencadeamento de uma série de processos fisiológicos nas sementes, incluindo a liberação de hormônios vegetais e

enzimas hidrolíticas (BASSOI et al., 2006). Os principais hormônios vegetais envolvidos no processo germinativo são as giberelinas (GAs) e o ácido abscísico (ABA), e as principais enzimas são a alfa e beta-amilase. Segundo Sponzel (2009), estudos moleculares têm demonstrado que as GAs atuam principalmente na indução da expressão do gene da alfa-amilase, aumentando o nível de mRNA na camada de aleurona.

Durante a germinação, as giberelinas (GA_1) sintetizadas pelo embrião ligam-se a receptores em células da camada de aleurona, formando um complexo GA-receptor, que ao interagir com a proteína G heterotrimérica inicia a transdução de sinais. Uma rota específica, envolvendo o mensageiro secundário GMP cíclico (cGMP) e outros componentes, resulta na ativação de uma proteína F-box, que é parte do complexo SCF-ubiquitina ligase. A proteína F-box (mediada por GID2) quando ativada, se liga a uma proteína repressora (SLN1) com domínio DELLA (repressor), que está bloqueando a transcrição do gene *GAMYB* (*Giberelic Acid MYB - fator de transcrição do tipo MYB dependente de ácido giberélico*). Esse repressor DELLA é degradado pelo complexo SCF-ubiquitina ligase, permitindo assim a expressão do gene *GAMYB*, que ao se ligar aos promotores (região GARE) do gene da alfa-amilase e de outras enzimas hidrolíticas, permite sua transcrição, síntese e liberação para o endosperma para degradação do amido. No entanto, qualquer mutação que ocorra nos elementos de resposta (GARE) pode resultar na inibição da ligação do fator de transcrição *GAMYB*, e conseqüentemente, a inibição da expressão do gene da enzima alfa-amilase, não ocorrendo assim a germinação (SPONSEL, 2009). Gubler et al. (1995) demonstraram que a síntese de mRNA do *GAMYB* aumenta após o tratamento com GA, com posterior aumento do mRNA da alfa-amilase, e que o pico no acúmulo de mRNA de *GAMYB* coincide com a taxa máxima de acúmulo do mRNA da alfa-amilase, indicando que *GAMYB* regula a expressão do gene da alfa-amilase.

Nesse processo, existe também a atuação do ácido abscísico (ABA), que tem como papel principal controlar o início e manutenção da dormência nas sementes (IEHISA et al., 2014). Segundo Finkelstein (2009), a dormência presente nas sementes é controlada pela relação entre GA e ABA, e estes possuem efeito antagônico. Altas concentrações de ABA inibem a transcrição de mRNA, bem como, a síntese de fatores de transcrição (*GAMYB*) e enzimas hidrolíticas induzidas por GA, que são fundamentais para a quebra das reservas armazenadas nas sementes em germinação, resultando na inibição da germinação.

Vários genes envolvidos na regulação da expressão de GA e ABA já foram identificados, e constatou-se participação dos mesmos na regulação da dormência e germinação. O gene Vp-1 é considerado o principal gene regulador da dormência e germinação em sementes, e vários QTLs associados a dormência e germinação pré-colheita já foram identificados através de marcadores moleculares. Também foi identificado que o gene Vp-1 é regulado por outros genes que participam da maturação de embriões, dormência e germinação das sementes, e os mesmos atuam conjuntamente no controle da característica (GAO et al., 2013). Chang et al. (2010), avaliando variações do alelo Vp-1 e sua relação com a resistência a germinação pré-colheita, encontraram que os alelos Vp-1Bb, Vp-1Bc, Vp-1Bd, Vp-1Be e Vp-1Bf ocorreram com maior frequência em cultivares mais resistentes, e que essas variações encontradas no alelo Vp-1B podem ser úteis para melhorar a resistência a germinação pré-colheita em trigo.

Vale destacar, que apesar dos inúmeros trabalhos publicados anualmente relacionados à dormência de sementes, e da identificação de genes de resistência para diversas espécies, os genes que conferem resistência a germinação pré-colheita em trigo ainda não estão suficientemente caracterizados (LIU et al., 2013), o que justifica esforços e investimentos nessa linha, com o intuito de identificar genes e/ou QTLs associados a esta característica, para posterior utilização em programas de melhoramento.

2.2.3 Caracterização/Seleção para Germinação Pré-colheita

Em função dos inúmeros problemas anteriormente discutidos referentes à germinação pré-colheita, a obtenção de genótipos com níveis mais elevados de resistência é considerada prioridade em muitos programas de melhoramento (MARES e MRVA, 2014), e várias técnicas para caracterização e seleção de genótipos resistentes já foram desenvolvidas.

No melhoramento convencional, a obtenção de genótipos resistentes é realizada através de avaliações fenotípicas, o que muitas vezes não traz resultados confiáveis. Para que se consiga obter eficiência na caracterização e seleção de genótipos superiores, é necessária a adoção de técnicas adequadas, e que estas

expressem resultados confiáveis. Franco (2008), destaca algumas das principais técnicas desenvolvidas para avaliação da germinação pré-colheita. Dentre elas destacam-se os germinadores com alta umidade (WEILENMANN, 1976), simuladores de chuva (McMASTER e DERERA, 1976), simuladores de chuva com posterior permanência em câmaras (CLARKE, 1983), e períodos alternados de imersão de espigas em água e exposição ao ar, com posterior condicionamento em germinadores envoltas em papel toalha (REIS e CARVALHO, 1989). O autor ressalta ainda, que para a avaliação dos genótipos, pode-se utilizar escalas de notas e contagem de grãos germinados (McMASTER e DERERA, 1976), espectrofotometria para determinação da atividade da enzima alfa-amilase (MARES, 1983) e índice de queda (ROSA, 1999).

No entanto, pelo fato da germinação pré-colheita ser uma característica complexa e fortemente influenciada pelo ambiente, existem muitas limitações relacionadas à seleção fenotípica, e técnicas mais apuradas e precisas são necessárias para aumentar a eficiência na seleção. Assim, a identificação de marcadores para utilização em programas de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) apresenta-se como uma alternativa promissora, e elimina muitas das limitações existentes no melhoramento convencional, sendo uma opção extremamente atrativa para melhoristas de trigo implantarem em programas de melhoramento (MARES e MRVA, 2014).

2.3 SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

Como já citado, no melhoramento de plantas convencional, a obtenção de genótipos superiores em populações segregantes é baseada em dados fenotípicos, o que em muitos casos se torna difícil em função da interação genótipo x ambiente, além de ser um processo demorado e oneroso (SCHUSTER, 2011). No entanto, apesar de algumas limitações, a seleção baseada em dados fenotípicos obteve ganhos genéticos expressivos ao longo dos anos em diversas culturas (PEREIRA et al., 2008).

Visando aumentar a eficiência no processo de seleção, uma das técnicas que vem sendo utilizada em programas de melhoramento e que supre muitas das limitações existentes no melhoramento convencional é a SAM (MIEDANER e

KORZUN, 2012). Essa técnica caracteriza-se pela utilização de marcadores moleculares no processo de seleção, de modo a auxiliar as avaliações fenotípicas (HE et al., 2014).

Por ser realizada com base em variações genotípicas, a SAM não sofre influência do ambiente e pode ser empregada em qualquer fase de desenvolvimento da cultura, principalmente em gerações precoces, reduzindo tempo e custos. Em função disso, a técnica apresenta um enorme potencial em aumentar a eficiência e precisão na seleção (COLLARD e MACKILL, 2008).

Segundo Schuster (2011), a SAM é útil em programas de melhoramento em quatro principais situações: quando a seleção fenotípica é inviável em função do custo e tempo demandado ou devido a herança complexa da característica; quando a seleção é dependente de condições ambientais ou estágios específicos de desenvolvimento para a expressão da característica; para acelerar a recuperação do genoma recorrente ou manter os alelos recessivos em retrocruzamentos; e para a piramidação de características monogênicas múltiplas ou QTLs de características de herança complexa.

Nas últimas décadas, vários tipos de marcadores foram desenvolvidos e empregados na SAM, tais como os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPDs (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*), entre outros. Um dos tipos de marcadores que merecem destaque são os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), ou polimorfismos de um único nucleotídeo, que são caracterizados por alterações em uma única base nas sequências de DNA, e são a forma mais abundante de variação no genoma de plantas (EDWARDS et al., 2009).

Marcadores SNPs possuem vantagens em relação aos demais tipos de marcadores em função de sua alta densidade no genoma, o que confere a estes marcadores uma maior probabilidade de estarem ligados a genes de interesse (XU e CROUCH, 2008). Em função disso, os SNPs estão tornando-se a forma dominante de marcadores moleculares para análises genômicas (LORENC et al., 2012) e vários estudos utilizando SNPs em alta densidade foram realizados nos últimos anos.

Em trigo, estudos utilizando estes marcadores têm sido relatados para diversas características, incluindo rendimento de grãos, características morfológicas, resistência a doenças, qualidade, precocidade, entre outros, tendo apresentado

resultados promissores (BORDES et al., 2011; LE GOUIS et al., 2012; SUKUMARAN et al., 2015; MACCAFERRI et al., 2015).

Com o advento da utilização de SNPs de alta densidade, foram realizadas varreduras no genoma de várias espécies a fim de identificar blocos de haplótipos correlacionados com variações fenotípicas para caracteres quantitativos, e estudos recentes obtiveram sucesso na identificação de *loci* que explicam grande parte da variação fenotípica (BRACHI et al., 2011).

Uma das técnicas que utilizam SNPs em alta densidade são as análises de associação genômica ampla. Essa abordagem tem avançado muito nos últimos anos, sendo uma ferramenta poderosa tanto para análises de características simples, quanto para arquiteturas genéticas mais complexas (KORTE e FARLOW, 2013; YANG et al., 2014b), e varreduras no genoma visando a identificação destas variações podem ajudar a identificar marcadores potencialmente informativos (LIAO e LEE, 2010).

2.4 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA (GWAS)

Com a utilização dos sequenciamentos de alto rendimento e da conclusão de sequências genômicas de referência, foi possível realizar o sequenciamento de diversas espécies de importância, permitindo a realização de estudos de associação genômica ampla para detecção da base genética de características complexas (HUANG E HAN, 2014).

Determinar a base genética de características agronômicas complexas é um dos maiores desafios no melhoramento de plantas (BRACHI et al., 2011), pois a maioria dos caracteres de interesse são quantitativos, e conseqüentemente, com uma maior dificuldade em discriminar diferenças genéticas subjacentes ao fenótipo de interesse (PASAM et al., 2012). Neste sentido, estudos GWAS são importantes ferramentas para auxiliar a seleção de genótipos promissores, pois permitem identificar a relação existente entre variações genéticas e fenotípicas (KORTE e FARLOW, 2013).

A técnica GWAS caracteriza-se pela associação entre marcadores moleculares com fenótipos de interesse (KORTE e FARLOW, 2013), visando identificar marcadores em alelos associados à característica buscada, para posterior

utilização em SAM (HAMBLIN et al., 2011). Essa abordagem supera várias limitações do mapeamento genético tradicional, por permitir maior resolução dos dados, bem como, por utilizar amostras de populações bem estudadas em que normalmente ocorrem variações genéticas, as quais podem ser associadas com variações fenotípicas (BRACHI et al., 2011).

A associação marcador x fenótipo na análise GWAS ocorre em função do desequilíbrio de ligação existente entre os marcadores e os genes/QTLs responsáveis pela característica. O desequilíbrio de ligação pode ser definido como uma medida de dependência entre alelos de dois ou mais *loci*, ou seja, se em uma população, alelos de *loci* diferentes são encontrados juntos com frequência maior do que a esperada com base no produto de suas frequências, pode-se inferir que estes alelos estão em desequilíbrio de ligação. Assim, o desequilíbrio de ligação entre marcadores e genes/QTLs é fundamental para que se consiga detectar QTLs responsáveis pela característica buscada (RESENDE et al., 2013).

Vários estudos utilizando essa abordagem foram realizados em culturas agronomicamente importantes, como arroz (YANG et al., 2014a; KUMAR et al., 2015), milho (YANG et al., 2014b), soja (HWANG et al., 2014; ZHANG et al., 2015), cevada (PASAM et al., 2012; WANG et al., 2012), entre outras, para diversos caracteres de interesse.

Em trigo, há relatos de análises de associação genômica para rendimento de grãos (SUKUMARAN et al., 2015), resistência a patógenos (KOLLERS et al., 2013; MACCAFERRI et al., 2015), germinação pré-colheita (KULWAL et al., 2012), qualidade (BRESEGHELLO e SORRELLS, 2006; BORDES et al., 2011), precocidade (LE GOUIS et al., 2012), entre outros.

Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Sukumaran et al. (2015) utilizando esta técnica em trigo, onde os autores encontraram *loci* associados a diferentes caracteres, incluindo rendimento de grãos, peso de mil grãos e estatura de planta, e relataram que a técnica caracteriza-se como uma ferramenta poderosa na identificação de marcadores moleculares para características fisiológicas e agrônomicas. Maccaferri et al. (2015) buscando identificar novas fontes de resistência para ferrugem amarela em trigo, realizaram análise de associação em uma coleção mundial de 1000 acessos utilizando um chip contendo 9000 SNPs. O estudo permitiu identificar novos *loci* de resistência, que serão úteis para diversificar o conjunto de genes de resistência já existentes para o controle da doença. Kulwal et al. (2012),

utilizando a técnica em 198 genótipos de trigo de inverno, identificaram QTLs associados a resistência a germinação pré-colheita. Os autores identificaram oito QTLs ligados a 13 marcadores mapeados em sete cromossomos, e destacam a eficiência da técnica para aplicação em programas de melhoramento.

Segundo Hamblin et al. (2011), o desenvolvimento de estratégias para o melhoramento de características complexas em plantas, tem exigido a utilização de modelos estatísticos que consigam explicar a variação genética presente. Modelos estatísticos utilizados nessa abordagem dependem da distribuição dos QTLs e dos marcadores genéticos existentes, bem como, da extensão do desequilíbrio de ligação entre eles, e as diferenças na extensão do desequilíbrio de ligação tem um efeito muito importante na densidade de marcadores necessários para a utilização dessa abordagem. Vale destacar ainda, que o sucesso da técnica irá depender dos fatores que influenciam a distribuição dos QTLs, bem como, da correlação destes com os marcadores.

As previsões são de que cada vez mais, conjuntos de dados estarão disponíveis para facilitar mapeamentos de associação genômica para características agronomicamente importantes em diversas culturas, e que mapeamentos para características complexas serão melhorados através do desenvolvimento de novos modelos estatísticos (HUANG e HAN, 2014).

Em função da eficiência apresentada pela técnica em diversos trabalhos já realizados em todo mundo, análises de associação genômica se tornaram ferramentas poderosas para auxiliar o melhoramento de características complexas, e mais estudos são necessários visando aumentar a eficiência em programas de melhoramento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO DE FENOTIPAGEM

Foram utilizadas 344 linhagens e cultivares de trigo de diferentes empresas obtentoras e épocas de lançamento (Tabela 1). Os genótipos foram selecionados visando obter uma amostra representativa da base genética do trigo cultivado no Brasil.

Tabela 1 - Genótipos de trigo utilizados na análise de associação genômica para resistência a germinação pré-colheita. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017.

CD 102	CD 13126	CD 15903	FRONTANA
CD 103	CD 13130	CD 15904	IAC 5 MARINGÁ
CD 104	CD 13165	CD 15905	IAN 10
CD 105	CD 13180	CD 15906	IAN 15
CD 106	CD 13181	CD 15907	IAPAR 17 CAETÉ
CD 107	CD 13191	CD 15908	IAPAR 1 MITACORÉ
CD 108	CD 13203	CD 15909	IAPAR 28 IGAPÓ
CD 1082	CD 13217	CD 15910	IAPAR 30 PIRATA
CD 110	CD 13244	CD 15911	IAPAR 6 TAPEJARA
CD 1104	CD 13290	CD 15912	IAPAR 78
CD 111	CD 13322	CD 15913	IAS 58
CD 113	CD 13326	CD 15914	IAS 64
CD 1135	CD 13359	CD 15915	IPR 128
CD 114	CD 13360	CD 15916	IPR 129
CD 1144	CD 13368	CD 15917	IPR 130
CD 1148	CD 14002	CD 15919	IPR 136
CD 115	CD 14048	CD 15920	IPR 144
CD 116	CD 14052	CD 15921	IPR 85
CD 117	CD 14134	CD 15922	IPR KATUARA TM
CD 118	CD 14151	CD 15923	ITAPUA 40
CD 119	CD 14152	CD 15924	ITAPUA 45
CD 120	CD 14156	CD 15925	ITAPUA 50
CD 12047	CD 14157	CD 1805	ITAPUA 60
CD 12048	CD 14173	ABALONE	ITAPUA 70
CD 12049	CD 14204	ALCOVER	JADEÍTE 11
CD 12056	CD 14209	ANAHUAC	JANDAIA
CD 12063	CD 14225	AVANTE	JF 90
CD 12075	CD 14226	BANDEIRANTES	JUPATECA 73
CD 12078	CD 14228	BR 34	KASORO
CD 12086	CD 14235	BR 37	LONDRINA
CD 12096	CD 14240	BR 43	MARFIM

Tabela 1 - Genótipos de trigo utilizados na análise de associação genômica para resistência a germinação pré-colheita. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017.

(continua)

CD 121	CD 14255	BRS 120	MGS1 ALIANÇA
CD 12126	CD 14258	BRS 177	MIRANTE
CD 12129	CD 14277	BRS 179	NAMBU
CD 12143	CD 14336	BRS 193	OCEPAR 10-GARÇA
CD 12164	CD 14342	BRS 207	OCEPAR 11-JURITI
CD 12175	CD 14350	BRS 208	OCEPAR 12-MAITACA
CD 12178	CD 14362	BRS 210	OCEPAR 13-ACAUÃ
CD 12183	CD 14366	BRS 220	OCEPAR 14
CD 12184	CD 14383	BRS 229	OCEPAR 15
CD 12192	CD 14387	BRS 254	OCEPAR 16
CD 12199	CD 1440	BRS 264	OCEPAR 17
CD 122	CD 14401	BRS 276	OCEPAR 18
CD 12203	CD 14434	BRS 296	OCEPAR 19
CD 12213	CD 14443	BRS 327	OCEPAR 20
CD 12223	CD 14451	BRS 49	OCEPAR 21
CD 12224	CD 14453	BRS ALBATROZ	OCEPAR 7-BATUIRA
CD 12228	CD 14455	BRS ANGICO	OCEPAR 8-MACUCO
CD 12236	CD 14478	BRS CAMBOATÁ	OCEPAR 9-PERDIZ
CD 12240	CD 14490	BRS CAMBOIM	ONIX
CD 12251	CD 14495	BRS LOURO	PAMPEANO
CD 12282	CD 14506	BRS PARDELA	PAVÃO
CD 123	CD 14517	BRS PARRUDO	QUARTZO
CD 12300	CD 14520	BRS SABIÁ	RUBI
CD 12343	CD 14526	BRS TIMBAÚVA	SHANGAI 5
CD 12356	CD 14531	BRS UMBU	SUPERA
CD 12361	CD 14533	CAMPEIRO	SUZHOE #2
CD 12365	CD 14536	CANDEIAS	SUZHOE #6
CD 12369	CD 14545	CANINDE 11	SUZHOE #8
CD 124	CD 14556	CANINDE 12	TAURUM
CD 12400	CD 14558	CANINDE 13	TBIO BANDEIRANTE
CD 12401	CD 14560	CANINDE 3	TBIO ITAIPU
CD 12417	CD 14562	CEP 14 TAPES	TBIO PIONEIRO
CD 1252	CD 14563	CEP 72 SULINO	TBIO SELETO
CD 12601	CD 14565	CHINESE SPRING	TBIO SINUELO
CD 12603	CD 14571	CNT 1	TBIO TORUK
CD 12604	CD 14901	CNT 10	TBR 18-TERENA
CD 12605	CD 14904	CNT 5	TBR 30-CADIVEU
CD 12611	CD 14905	CNT 9	TEC FRONTALE
CD 12614	CD 14906	COCORAQUE	TEC TRIUNFO
CD 12618	CD 14907	CONFIANÇA	TEC VELOCE
CD 12625	CD 14908	EMBRAPA 21	TEC VIGORE

Tabela 1 - Genótipos de trigo utilizados na análise de associação genômica para resistência a germinação pré-colheita. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017.

(conclusão)

CD 12629	CD 14909	EMBRAPA 42	TRIGO BR 1
CD 12634	CD 14911	ESPORÃO	TRIGO BR 14
CD 12638	CD 14913	ESTRELA ATRIA	TRIGO BR 15
CD 12662	CD 14915	FUNDACEP 30	TRIGO BR 23
CD 12664	CD 14917	FUNDACEP 37	TRIGO BR 27
CD 12666	CD 14921	FUNDACEP 40	TRIGO BR 4
CD 12807	CD 14922	FUNDACEP 52	TRIGO BR 5
CD 12829	CD 14924	FUNDACEP BRAVO	TRIGO BR 7
CD 12831	CD 14926	FUNDACEP CAMPO REAL	TRIGO BR 8
CD 12880	CD 150	FUNDACEP CRISTALINO	TUCANO
CD 13027	CD 154	FUNDACEP HORIZONTE	TURQUESA
CD 13032	CD 1550	FUNDACEP NOVA ERA	VALENTE
CD 13064	CD 15901	FUNDACEP RAÍZES	VANGUARDA
CD 13124	CD 15902	FPS NITRON	VAQUEANO

O experimento foi conduzido em Cascavel-PR, no ano de 2015, no campo experimental da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – COODETEC (24°52'57" S e 53°32'00" W a 690m de altitude), em solo classificado como Latossolo Roxo distrófico. Foi utilizado delineamento experimental de blocos casualizados com três repetições, e cada unidade experimental foi composta por três linhas de cinco metros de comprimento (2 m²), espaçadas 0,20 m entre si. A adubação de base foi realizada de acordo com a análise de solo e os tratos culturais de acordo com as recomendações técnicas para a cultura.

No estágio de maturação fisiológica (Z90) (ZADOKS et al., 1974), foi realizada a colheita, ao acaso, de 20 espigas de diferentes plantas de cada genótipo. Após colhidas, as espigas foram secas em telado coberto até atingirem a umidade de 13%. Posteriormente, as espigas foram submetidas a um simulador de chuva (FRANCO et al., 2009) programado para fornecer as condições ideais de umidade e temperatura para ocorrência da germinação na espiga.

Foi realizado o corte do pedúnculo a 4cm da base das espigas, e as mesmas foram fixadas e dispostas verticalmente em placas de isopor, equidistantes 5 cm entre si, em delineamento inteiramente casualizado. Foi fornecida chuva artificial

uniforme sobre as espigas com intensidade de 19 mm h⁻¹. O simulador foi programado para fornecer chuva artificial durante 1 hora com interrupções de 15 minutos, em um período total de 60 horas.

A caracterização dos genótipos quanto à tolerância a germinação pré-colheita foi realizada a partir da atribuição de notas visuais em uma escala de 1 a 11, de acordo com a metodologia descrita por McMaster e Derera (1976). Os grãos dos genótipos que não germinaram foram submetidos ao teste de tetrazólio para confirmar a presença de dormência, sendo realizado pré-condicionamento a partir da embebição das sementes em papel umedecido pelo período de 6 horas. Posteriormente, foi realizada a exposição dos tecidos para coloração, com corte longitudinal através do embrião e endosperma em solução de tetrazólio (0,5%), pelo período de 3 horas (BRASIL, 2009).

3.2 GENOTIPAGEM E ANÁLISE DOS DADOS

O isolamento do DNA genômico foi realizado a partir de 50mg de pó obtido da moagem de 100 sementes de cada genótipo. A moagem das sementes foi realizada em moinho tipo ciclone Udy (REF), e a extração de DNA foi realizada em equipamento Biosprint (Qiagen®), utilizando o Kit BioSprint 96 DNA Plant Mini Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Após a extração do DNA, a integridade do mesmo foi testada em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium) e fotografado sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro, a partir de leitura de absorbância a 260nm, onde cada unidade de absorbância corresponde a concentração de 50 ug mL⁻¹ de DNA (SAMBROOK et al., 1989).

Após a extração e quantificação do DNA, as amostras foram enviadas para a empresa Affymetrix, que realizou a genotipagem utilizando o chip 35K *Axiom Wheat Genotyping Arrays* (Affymetrix®), que possui 35.143 SNPs para o genoma do trigo.

Os dados da estrutura da população usados na análise de associação genômica foram obtidos utilizando-se o algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo) para o método de agrupamento Bayesian generalizado, implementado no software

InStruct (GAO et al., 2007). Este método não assume equilíbrio de Hardy-Weinberg para os marcadores utilizados, sendo estimadas as frequências genotípicas esperadas com base nas taxas de endogamia e autofecundação. As simulações foram realizadas para um número de grupos (parâmetro K) variando entre 2 e 10, sem informação prévia da população, com burn-in de 5.000 e 50.000 interações, utilizando o software InStruct. A melhor estimativa do número K de grupos foi determinada de acordo com o valor mais baixo de Deviance Information Criterion (DIC) entre os 10 K simulados (GAO et al., 2007).

A análise de associação entre os marcadores SNPs e os dados fenotípicos para resistência a germinação pré-colheita foi realizada a partir do método de Modelos Lineares Mistos (MLM), utilizando o software TASSEL 5.0 (BRADBURY et al., 2007), com nível de significância de 0,1%.

As sequências flanqueadoras dos SNPs foram alinhadas contra o genoma de *Triticum aestivum* (v2.1) (IWGSC, 2014) na base de dados Phytozome 11.0 (GOODSTEIN et al., 2012).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição das frequências fenotípicas observadas dos 344 genótipos de trigo avaliados para germinação pré-colheita está apresentada na Figura 1. Nenhum dos genótipos avaliados apresentou nota de suscetibilidade superior a 8,8, o que é positivo para o caractere em estudo e explica a baixa média observada para o conjunto de genótipos utilizado, que foi de 4,1.

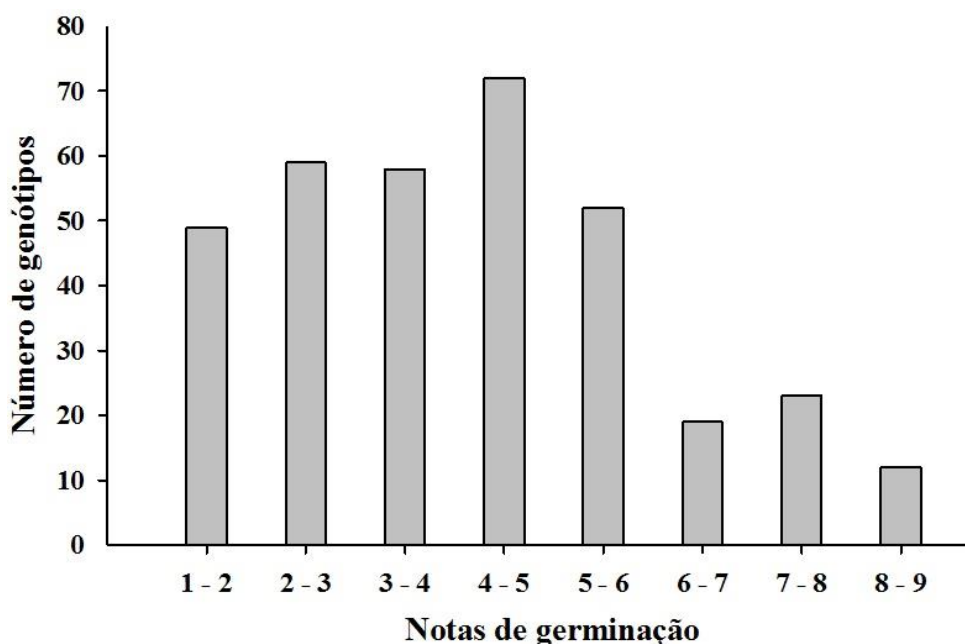


Figura 1 - Distribuição das frequências das notas de fenotipagem para germinação pré-colheita de 344 genótipos de trigo, de acordo com a metodologia proposta por McMaster e Derera (1976). UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017.

O valor médio obtido no presente estudo é inferior ao encontrado por Jaiswal et al. (2012), que realizaram um estudo de associação genômica com uma coleção de 242 genótipos de trigo indianos lançados entre 1910 e 2006, e utilizando a escala de McMaster e Derera (1976) modificada, encontraram um valor médio de 7,4. Segundo os autores, essa elevada frequência de genótipos suscetíveis se deve aos reduzidos esforços realizados pelos programas de melhoramento da Índia visando à obtenção de genótipos resistentes a germinação pré-colheita. No entanto, em muitas regiões produtoras, a obtenção da resistência tem sido considerada prioridade em programas de melhoramento desde o final da década de 1960 (DEPAUW et al., 2012),

o que tem resultado na obtenção de genótipos mais resistentes. Além do Brasil, a germinação pré-colheita afeta muitas outras regiões produtoras a nível mundial, incluindo países da Europa, Austrália, EUA, Canadá, África do Sul, Ásia Central, Nova Zelândia, Chile, Argentina, entre outros (CUNHA et al., 2004; BIDDULPH et al., 2007; GAO et al., 2013; LIU et al., 2013).

Dos 35.143 marcadores SNPs utilizados na genotipagem desta população de estudo, 375 apresentaram taxa superior a 10% de dados perdidos e foram excluídos. Além disso, 18.592 marcadores apresentaram frequência do alelo menos frequente inferior a 5%, e da mesma forma, não foram considerados. Portanto, para a análise foram considerados 16.176 marcadores, uma média de 770 marcadores por cromossomo.

Foram identificados dez SNPs significativos ($p < 0,001$), localizados em diferentes cromossomos e presentes em genes com distintas funções (Figura 2 e Tabela 2). Foram observados dois SNPs significativos em cada um dos cromossomos 5D, 7B e 7D, e um SNP significativo em cada um dos cromossomos 3B, 4A, 5B e 6D.

Vários estudos já foram conduzidos visando identificar regiões gênicas/QTLs associados a dormência de sementes e resistência a germinação pré-colheita em trigo. Em um estudo recente, Cao et al. (2016) identificaram QTLs associados a dormência nos cromossomos 1B, 3A e 4A, e relataram que o acúmulo de QTLs e suas interações epistáticas contribuem significativamente para maiores níveis de dormência nas sementes. Da mesma forma, Arif (2012) identificou QTLs associados a dormência na maioria dos cromossomos, exceto para os cromossomos 3D, 4D e 6D. Segundo o mesmo autor, QTLs para resistência a germinação pré-colheita tem sido mapeados nos cromossomos 2BS (MASWHEAT, 2012), 3A (KULWAL et al., 2005), 1AS, 3BL, 4AL, 5DL, 6BL (ANDERSON et al., 1993; SORRELLS e ANDERSON, 1996; FLINTHAM et al., 2002), 3B, 5A, 6A, 7B (ZANETTI et al., 2000), 6B, 7D (ROY et al., 1999) e todos os cromossomos do grupo 3 (GROOS et al., 2002). No entanto, Jaiswal et al. (2012) destaca que os *loci* mais importantes que controlam a germinação pré-colheita em trigo estão localizados nos cromossomos homólogos 3A, 3B e 3D, e no cromossomo 4A.

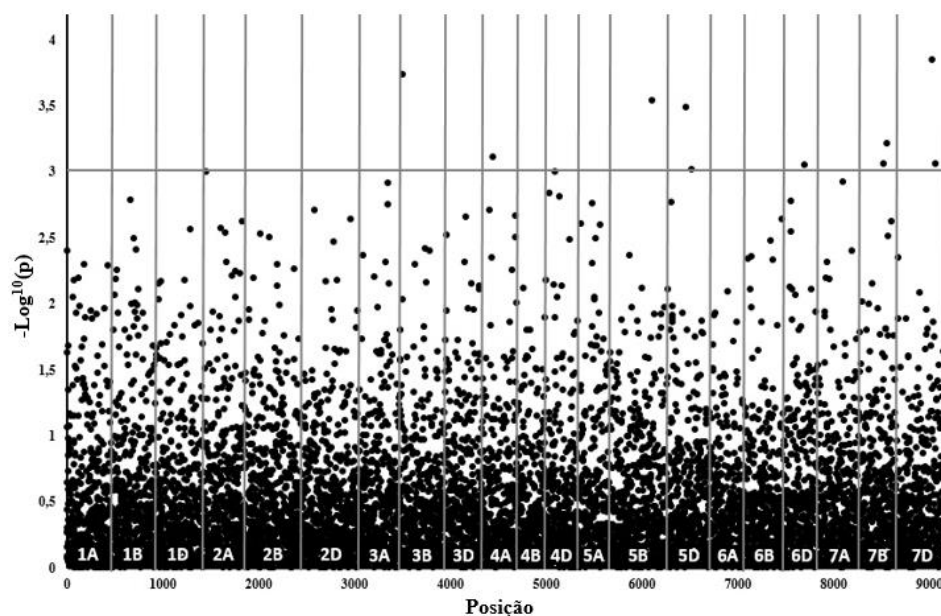


Figura 2 - Gráfico Manhattan Plot da análise de associação genômica para germinação pré-colheita em trigo. A linha paralela indica valor de LOD score = 3, correspondendo ao limite de p -value < 0,001. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017.

Tabela 2 - Marcadores SNPs significativos na análise de associação genômica para germinação pré-colheita em trigo, com a identificação dos alelos, cromossomos, posição (cM), valor $-\text{Log}^{10}(p)$ e R^2 . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017.

Código SNP	Identificação SNP	Alelos	Cromossomos	Posição (cM)	$-\text{Log}^{10}(p)$	R^2
SNP3504	AX-95081635	G/T	3B-	552	3,74	5,2%
SNP4426	AX-94683088	C/T	4AL	830	3,11	4,3%
SNP6052	AX-94582963	C/T	5BL	DES	3,54	4,9%
SNP6427	AX-94457166	A/G	5DL	DES	3,49	4,8%
SNP6482	AX-94449277	A/C	5DL	DES	3,02	4,2%
SNP7658	AX-95210225	A/C	6DL	DES	3,05	4,2%
SNP8488	AX-94895222	A/G	7BL	DES	3,06	4,2%
SNP8520	AX-95070133	A/T	7BL	DES	3,22	4,5%
SNP9026	AX-94556157	C/T	7DS	DES	3,85	5,4%
SNP9069	AX-94439880	C/T	7DS	DES	3,06	4,2%

DES: Desconhecida.

O SNP 3504 está posicionado a 552cM do início do grupo de ligação correspondente ao cromossomo 3B, e o SNP 4426 a 830cM do início do grupo de ligação do cromossomo 4A. Para os demais marcadores, a posição é desconhecida. A explicação da variação fenotípica pelos marcadores significativos variou de 4,2 a 5,4%, o que é esperado para caracteres quantitativos (Tabela 2).

As informações referentes aos cromossomos, *locus*, posição e funções descritas para cada gene onde os SNPs significativos foram localizados, obtidas no banco de dados *Phytozome* 11.0, estão apresentadas na Tabela 3. Foi identificado um marcador significativo (SNP 9069) em uma região codificadora do gene da Actina, uma enzima que desempenha importante papel na morfogênese das células vegetais, estando envolvida no transporte intracelular, na expansão celular, em respostas a estímulos do meio externo, entre outras funções (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2007 apud SILVEIRA, 2014).

Segundo Gilliland et al. (2003), o gene *ACT7* é o principal gene da actina envolvido no processo de divisão celular e crescimento da radícula, e por participar da divisão e expansão celular, afeta a protrusão da radícula e o crescimento das plantas. Assim, os autores sugerem que uma deficiência de actina pode dificultar a expansão e rompimento dos tecidos de cobertura da semente, impedindo assim a emissão da radícula, sendo também verificado que mutantes *ACT7* em *Arabidopsis* apresentaram falhas e atraso na germinação.

Além da actina ser um dos principais componentes do citoesqueleto de células vegetais, a mesma está envolvida na transdução de sinais de estímulos físicos, como por exemplo, o resfriamento (STAIGER e SCHLIWA, 1987; MCDOWELL et al. 1996 apud DENG et al., 2016). É conhecido que o resfriamento é uma das formas de superação de dormência em sementes de diversas espécies. Neste sentido, Deng et al. (2016) estudando o efeito da estratificação a frio sobre a dormência de *Cotinus coggygria*, verificaram mudanças na expressão e abundância de actina durante o resfriamento, e os autores sugerem que o resfriamento sinalizou e iniciou a quebra de dormência nas sementes durante o processo de estratificação.

O marcador significativo SNP 9026 foi identificado em uma região codificadora do gene da glicosidase, uma das principais enzimas envolvidas no processo germinativo. Segundo Fox et al. (2003), as quatro enzimas envolvidas no processo de conversão do amido em glicose no endosperma durante a germinação dos cereais são a Alfa-amilase, Beta-amilase, Dextrinase e Alfa-glicosidase, as quais degradam o amido em maltose e glicose, que são transportadas para o embrião em crescimento. Neste processo, a alfa-glicosidase é liberada pela camada de aleurona de forma semelhante a alfa-amilase, que é a principal enzima envolvida na germinação das sementes.

Tabela 3 - Cromossomos, *locus*, posição, funções descritas para os genes e sequências flanqueadoras dos dez SNPs significativos na análise de associação genômica para germinação pré-colheita em trigo. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2017.

Código do SNP	Cromossomo	<i>Locus</i>	Posição	Função descrita para o gene
SNP9026 (AX-94556157)	3B 3AS	Traes_3B_91C0A4F75 Traes_3AS_0D233DB25	ta_iwgsc_3b_v1_10661232:3013..8048 reverse ta_iwgsc_3as_v1_3441580:3..4677 reverse	Glicosidase
SNP9069 (AX-94439880)	1BL	Traes_1BL_D0A3F2067	ta_iwgsc_1bl_v1_3830761:4923..7765 reverse	Actina
SNP6427 (AX-94457166)	5DL	Traes_5DL_1DEAF0A75	ta_iwgsc_5dl_v1_4606625:5014..8328 reverse	F-box
SNP8488 (AX-94895222)	7AS	Traes_7AS_750B122E9	ta_iwgsc_7as_v1_4236595:1..1038 reverse	F-box
SNP6052 (AX-94582963)	5BL	Traes_5BL_373A53E96	ta_iwgsc_5bl_v1_10888030:5388..6160	Precursor de Tionina
SNP6482 (AX-94449277)	3B 3DS	Traes_3B_42192C400 Traes_3DS_7A9FDF4AD	ta_iwgsc_3b_v1_10548042:1110..3524 forward ta_iwgsc_3ds_v1_2603573:2..5916 forward	Nedd8
SNP8520 (AX-95070133)	7BL	NI	NI	NI
SNP4426 (AX-94683088)	4AL	NI	NI	NI
SNP7658 (AX-95210225)	6DL	NI	NI	NI
SNP3504 (AX-95081635)	3B	NI	NI	NI

Sequências flanqueadoras dos SNPs utilizados no alinhamento

SNP9026 (AX-94556157)	CATGATATACCAGAACCCGTAGAAGAAAATTATGC[C/T]GGCTATCATTGAGGATGATAGGCACAA
SNP9069 (AX-94439880)	TGCCTGCTGTATGAAATAATGAAATGGAACATATG[C/T]GTATGCCTAAGCGACATTGTGTGGTACGCCATACT
SNP6427 (AX-94457166)	GCCTTAACTTCTACAAGCCCATTGCATCCCAGGAC[A/G]GCTTCCTGGTTCTGCGCCGCAATCAGAAGTTGCC
SNP8488 (AX-94895222)	TCTCCGTCCGCGATGAAACAGCAAAAGCAACCCAC[A/G]TGTTGATATGATCCAGTACCCTCTTGTCAAACCCA
SNP6052 (AX-94582963)	ACCCTTCCGCCACCTTGTCTCTCACTCGCGAAAGC[C/T]CCGTCCACAGGTTACGTACGTGCGCAGAAACGAGA
SNP6482 (AX-94449277)	TGAAACTGAAGCTGAAATTTACACTTGCACAATCT[A/C]TTCGGGGTCAACTTAAATATATTTGGCAAACCTTA
SNP8520 (AX-95070133)	AAGAACCCAGGCAACAAGCACAGACGGAAGGCAAA[A/T]CTCAAGGTGGCGAAACCAAGGCACCAGCCTCTGAA
SNP4426 (AX-94683088)	AACGACTACGACTGTGATGAGATGGAGAGGATGAC[A/G]CTCGCTGCCTCGCTGTGCACGAGGACATCTTCCGA
SNP7658 (AX-95210225)	CGTGCTCCTGGTCGTGCAGGTGGTGCCATTCTTTG[A/C]TCTTTTTCTACCATCTCACTGGCACCCCGAGTACT
SNP3504 (AX-95081635)	CAGGCAAATACAACCTGACTGCCACATGCATGCT[G/T]GCTGGAAGGCTACTCATATTTGCTACTACAGGAGT

NI: Não identificado.

Inicialmente, a enzima alfa-amilase ataca os grânulos de amido e libera glucanos ramificados e lineares, que são desramificados pela ação da enzima dextrinase. A alfa-amilase e a beta-amilase atuam na hidrólise dos glucanos lineares para produção de maltose, a qual é convertida em glicose pela alfa-glicosidase. Tanto a glicose quanto a maltose são absorvidas pelo embrião em crescimento. Portanto, apesar de estar envolvida no processo, a alfa-glicosidase não é considerada essencial para a degradação do amido ou crescimento normal das plantas, apesar de alguns estudos indicarem que esta enzima também atua diretamente sobre grânulos de amido (RUGEN, 2015).

Konishi et al. (1994), visando identificar o papel da enzima alfa-glicosidase sobre a germinação de sementes de trigo, utilizaram o inibidor de alfa-glicosidase Bay m 1099, e observaram diminuição na atividade da enzima, resultando em acúmulo de maltose e diminuição nos teores de glicose nos tecidos. Os autores observaram ainda, que apesar de não ter afetado a germinação das sementes, houve redução no crescimento das plantas em função da diminuição dos teores de glicose, indicando que a alfa-glicosidase tem um papel fundamental e é essencial para a hidrólise da maltose e suprimento de glicose para as plantas de trigo em crescimento, assim como no início da degradação do amido, juntamente com a enzima alfa-amilase.

Neste estudo, também foram identificados dois marcadores significativos (SNP 6427 e SNP 8488) em regiões codificadoras de proteínas F-box, localizadas nos cromossomos 5D e 7A, respectivamente. As proteínas F-box desempenham importantes funções na regulação de processos fisiológicos em plantas (SONG et al., 2012), estando envolvidas na regulação da senescência foliar e ramificação, desenvolvimento de flores, sinalização fitohormonal, ritmos circadianos e respostas de defesa (WOO et al., 2001; KIM e DELANEY, 2002; BOYCHEVA et al., 2015). Estas proteínas, em eucariotos, tem sido caracterizadas como um dos principais componentes do complexo SCF (Skp1 / Cullin or CDC53 / F-box protein), pertencente à família das ubiquitinas E3 ligases (BOYCHEVA et al., 2015). Além disso, tem sido relatado que as proteínas F-box desempenham um importante papel no crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo múltiplas vias de sinalização fitohormonal, como das auxinas, giberelinas e etileno (MOON et al., 2004; SMALLE e VIERSTRA, 2004 apud ZHANG et al., 2008).

Destaca-se aqui a participação das proteínas F-box na via de sinalização por giberelinas durante a germinação das sementes, alongamento do caule e

fertilidade, as quais são promovidas pela proteólise de proteínas DELLA, que são reguladores negativos da sinalização de giberelinas (SUN, 2010; ARIIZUMI e STEBER, 2011). Assim, no processo de sinalização de giberelinas, a ligação destas ao receptor GID1 (*GA Insensitive Dwarf1*) aumenta a afinidade de GID1 com as proteínas DELLA. A ligação giberelina-GID1 com DELLA faz com que SLY1 (F-box Sleepy1, a subunidade F-box de um complexo SCF ubiquitina ligase E3) reconheça e se ligue as proteínas DELLA. Com isso, a perda da função de SLY1 promove respostas reduzidas das giberelinas, causando nanismo, atraso na floração, infertilidade e dormência de sementes (ARIIZUMI e STEBER, 2011). Estudando genes F-box em *Arabidopsis*, Ariizumi e Steber (2011) observaram que mutações no gene F-box *SNEEZY* resultaram em decréscimo na sinalização de giberelinas, ocasionando falhas na germinação, estatura reduzida e infertilidade. Da mesma forma, Fukazawa et al. (2015) também relatam que mutantes SLY1 exibem nanismo e redução na germinação das sementes devido ao acúmulo de proteínas DELLA.

Vale destacar ainda, que proteínas F-box também atuam como reguladores negativos na mediação de respostas ao ácido abscísico (ZHANG et al., 2008), o qual está diretamente relacionado com a sinalização durante o processo germinativo. Song et al. (2012), identificaram um gene que codifica uma proteína F-box em arroz (*OsFbx352*), e verificaram que este atua como regulador na supressão da germinação das sementes induzida pela glicose via metabolismo de ABA.

O marcador significativo SNP 6052 foi identificado em uma região codificadora de precursores da família da tionina, uma proteína envolvida no mecanismo de defesa natural das plantas, e que está presente em vários tecidos vegetais, incluindo raízes, caules e sementes. Dentre as suas funções, estas proteínas são capazes de inibir enzimas digestivas de insetos (α -amilases e proteinases) e agem contra fungos e bactérias (PELEGRINI e FRANCO, 2005). Segundo Bohlmann et al. (1988), seu papel na defesa das plantas é em função da sua toxicidade, sendo sua síntese ativada pelo ataque de pragas. Além disso, alguns autores afirmam que as mesmas podem estar envolvidas em regulações redox (GARCÍA-OLMEDO et al., 1992 apud ARIF, 2012), e as específicas de sementes de cereais, apresentam um possível papel como proteínas de armazenamento (ARIF, 2012).

Em um estudo recente com trigo, Lohwasser et al. (2013) identificaram QTLs associados a dormência no braço longo dos cromossomos 1A, 1B e 1D, sendo

que o gene da região do cromossomo 1B também é conhecido como precursor da tionina. Além disso, em um estudo com arroz, Kitanaga et al. (2006) verificaram que genes da tionina foram expressos em altos níveis logo após a germinação das sementes, e que na regulação gênica da tionina estão envolvidas giberelinas, brassinosteróides e ácido jasmônico.

Por fim, também foi identificado um marcador significativo (SNP 6482) em uma região codificadora de proteínas NEDD8 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated8*), também conhecidas como *related to ubiquitin* (RUB), que são proteínas altamente relacionadas com a ubiquitina. Segundo Mergner e Schwechheimer (2014), assim como a ubiquitina, as proteínas NEDD8 podem ser conjugadas e desconjugadas de proteínas alvo. Os autores relatam ainda, que uma característica única de NEDD8 em plantas é a existência de fusões de genes ubiquitina-NEDD8, diferentemente de animais e leveduras onde fusões gênicas não ocorrem.

Estas proteínas são conjugadas com proteínas alvo de uma maneira muito semelhante a conjugação da ubiquitina. Primeiramente, NEDD8 é ativada por uma enzima de ativação E1 NEDD8, posteriormente para uma enzima de conjugação E2 NEDD8 (da família de enzimas de conjugação de ubiquitinas - UBC), e então transferida para a sua proteína substrato. Os conjugados NEDD8 mais bem estudados são as subunidades cullin de ubiquitinas E3 ligases do tipo CULLIN-RING (CRL) (HUA e VIESTRA, 2011 apud MERGNER e SCHWECHHEIMER, 2014).

As proteínas NEDD8 tem sido consideradas essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Tem sido relatado, que plantas com expressão reduzida de genes NEDD8 apresentam nanismo, insensibilidade parcial para concentrações inibitórias do hormônio vegetal auxina no crescimento das raízes, e também apresentam-se parcialmente defeituosas na formação de raízes laterais induzidas por auxina (BOSTICK et al., 2004 apud MERGNER e SCHWECHHEIMER, 2014).

Alguns inibidores de proteínas NEDD8 em plantas, como o inibidor MLN4924, comprometem a função das CRLs pela degradação de inúmeros substratos de CRL, como AUX/IAA da via da auxina, proteínas DELLA da via das giberelinas, e reguladores de ciclo celular KRP1 (HAKENJOS et al., 2011 apud MERGNER e SCHWECHHEIMER, 2014). Vale destacar ainda, que a nedilação altera as propriedades bioquímicas de suas proteínas alvo por induzir alterações

conformacionais, bem como, por permitir ou inibir interações proteína-proteína (MERGNER e SCHWECHHEIMER, 2014).

Portanto, mutações ocorridas nas sequências de genes codificadores das proteínas sinalizadoras e enzimas envolvidas no processo germinativo, podem resultar em perda ou alteração de suas funções, o que pode explicar as diferenças nos níveis de resistência à germinação pré-colheita nas cultivares de trigo analisadas no presente estudo. Vale destacar, que apesar de terem sido identificados poucos marcadores localizados em regiões codificadoras de enzimas envolvidas diretamente no processo germinativo, ressalta-se que nem sempre os SNPs estão presentes em regiões codificadoras, mas conforme destacado por Brodie et al. (2016), podem estar influenciando a atividade de genes localizados próximos a região do SNP.

Vale destacar ainda, que foram observadas algumas discordâncias na posição dos marcadores SNPs entre as tabelas 2 e 3, após o alinhamento das frequências flanqueadoras dos SNPs no banco de dados Phytozome 11.0. A tabela 2 se refere ao mapa genético da cultura, enquanto a tabela 3 corresponde ao mapa físico, o que pode justificar as diferenças observadas na posição dos SNPs. Pelo fato do sequenciamento do genoma do trigo ser recente, muitas informações ainda estão sendo disponibilizadas e atualizadas, e diferenças na posição dos SNPs podem ocorrer. Outra possibilidade decorre do fato do trigo ser poliploide e apresentar em seu genoma uma grande quantidade de genes duplicados (IWGSC, 2014). Dentre as poáceas com genoma sequenciado (arroz, sorgo, cevada, milho e painço), o trigo apresenta o maior número de duplicações gênicas, em média, 23,6% dos genes são duplicados, o que pode contribuir para o sucesso desta espécie como planta cultivada em todo o mundo (IWGSC, 2014). Desta forma, mesmo que o mapa genético apresente uma posição diferente, a mesma poderia representar uma duplicação do *locus* em diferentes cromossomos ou braços de um mesmo cromossomo.

5 CONCLUSÕES

A explicação da variação fenotípica pelos marcadores significativos variou de 4,2 a 5,4%, o que é esperado para caracteres quantitativos. A maior explicação foi observada para o marcador SNP 9026, que está localizado na região codificadora do gene da glicosidase, uma das principais enzimas envolvidas no processo germinativo.

Dentre os marcadores significativos, foram observados marcadores localizados em genes codificadores de enzimas envolvidas na sinalização de giberelinas e ácido abscísico, hidrólise de maltose e alongamento e divisão celular, o que pode explicar as diferenças encontradas nos níveis de resistência a germinação pré-colheita para o grupo de genótipos avaliados, considerando que a resposta de resistência a germinação pré-colheita depende de complexas vias de sinalização.

Os marcadores significativos identificados no presente estudo, após validados, poderão ser utilizados em programas de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), para a seleção precoce de genótipos resistentes a germinação pré-colheita.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Identificar marcadores moleculares associados a características de interesse tem sido alvo de programas de melhoramento em todo o mundo, e tem contribuído significativamente para o sucesso no processo de seleção e obtenção de genótipos superiores.

A germinação pré-colheita em trigo também tem sido foco de estudos realizados em todo o mundo, e muitos programas de melhoramento tem empregado marcadores moleculares no processo de seleção visando aumentar sua eficiência, o que tem apresentado resultados positivos.

Os marcadores significativos identificados no presente estudo, após validados, contribuirão para aumentar o conjunto de marcadores já disponíveis para a seleção de genótipos resistentes a germinação pré-colheita, proporcionando a obtenção de genótipos desejáveis de maneira mais ágil e precisa.

No entanto, em função da complexidade da característica, e consequentemente, da dificuldade na obtenção de genótipos superiores, mais estudos nesta área são necessários a fim de continuar buscando marcadores úteis associados a característica.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. A.; SORRELS, M. E.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of genomic regions associated with resistance to pre-harvest sprouting in wheat. **Crop Science**, v. 33, p. 453-459, 1993.
- ANDREOLI, C.; BASSOI, M. C.; BRUNETTA, D. genetic control of seed dormancy and preharvest sprouting in wheat. **Scientia Agrícola**. v. 63, n. 6, p. 564-566, 2006.
- ARIF, M. A. R. **Seed longevity and dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.) – phenotypic variation and genetic mapping**. 2012. 205 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Halle-Wittenberg, 2012.
- ARIIZUMI, T.; STEBER, C. M. Mutations in the F-box gene SNEEZY result in decrease Arabidopsis GA signaling. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p. 831-833, 2011.
- BASSOI, M. C.; FLINTHAM, J.; RIEDE, C. R. Analysis of preharvest sprouting in three Brazilian wheat populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 583-590, 2006.
- BIDDULPH, T. B.; PLUMMER, J. A.; SETTER, T. L.; MARES, D. J. Influence of high temperature and terminal moisture stress on dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Field Crops Research**, v. 103, p. 139-153, 2007.
- BIDDULPH, T. B.; PLUMMER, J. A.; SETTER, T. L.; MARES, D. J. Seasonal conditions influence dormancy and preharvest sprouting tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field. **Field Crops Research**, v. 107, p. 116-128, 2008.
- BOHLMANN, H.; CLAUSEN, S.; BEHNKE, S.; GIESE, H.; HILLER, C.; REIMANN-PHILIPP, U.; SCHRADER, G.; BARKHOLT, V.; APEL, K. Leaf-specific thionins of barley – a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanism of plants. **The EMBO journal**, v. 7, p. 1559-1565, 1988.
- BORDES, J.; RAVEL, C.; LE GOUIS, J.; LAPIERRE, A.; CHARMET, G.; BALFOURIER, F. Use of a global wheat core collection for association analysis of flour and dough quality traits. **Journal of Cereal Science**, v. 54, p. 137-147, 2011.
- BOSTICK, M.; LOCHHEAD, S. R.; HONDA, A.; PALMER, S.; CALLIS, J. Related to ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 16, p. 2418-2432, 2004.
- BOYCHEVA, I.; VASSILEVA, V.; REVALSKA, M.; ZEHIROV, G.; LANTCHEVA, A. Cyclin-like F-box protein plays a role in growth and development of the three model species *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, and *Arabidopsis thaliana*. **Research and Reports in Biology**, v. 6, p. 117-130, 2015.
- BRACHI, B.; MORRIS, G. P.; BOREVITZ, J. O. Genome-wide association studies in plants: the missing heritability is in the field. **Genome Biology**, v. 12, n. 232, 2011.

BRADBURY, P. J.; ZHANG, Z.; KROON, D. E.; CASSTEVENS, T. M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E. S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2633-2635, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395p.

BRESEGHELLO, F.; SORRELLS, M. E. Association Mapping of Kernel Size and Milling Quality in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. **Genetics**, v. 172, p. 1165-1177, 2006.

BRODIE, A.; AZARIA, J. R.; OFRAN, Y. How far from the SNP may the causative genes be?. **Nucleic Acids Research**. v. 44, p. 6046-6054, 2016.

CABRAL, A. L.; JORDAN, M. C.; MCCARTNEY, C. A.; YOU, F. M.; HUMPHREYS, D. G.; MACLACHLAN, R.; POZNIAK, C. J.. Identification of candidate genes, regions and markers for pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 1-12, 2014.

CAO, L.; HAYASHI, K.; TOKUI, M.; MORI, M.; MIURA, H.; ONISHI, K. Detection of QTLs for traits associated with pre-harvest sprouting resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Breeding Science**, v. 66, p. 260-270, 2016.

CARVALHO, P. T.; BELEIA, A. D. P. Alterações físico-químicas e atividade enzimática de trigo com germinação pré-colheita. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, p. 524-531, 2015.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. 2 ed. Barueri: Manole, 2007, 380p.

CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. S. **Mapeamento por associação em plantas: conceitos básicos e perspectivas de uso no melhoramento de batata**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008, 30p (Documento).

CHANG, C.; ZHANG, H. P.; FENG, J. M.; YIN, B.; SI, H. Q.; MA, C. X. Identifying alleles of Viviparous-1B associated with pre-harvest sprouting in micro-core collections of Chinese wheat germplasm. **Molecular Breeding**, v. 25, p. 481-490, 2010.

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

COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, M. Z. Z.; BROUWER, J. B.; PANG, E. C. K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, p. 169-196, 2005

COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 363, p. 557–572, 2008.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 3 - Safra 2015/16, n. 12 – Décimo Segundo Levantamento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_setembro.pdf>. Acesso em: 30 out. 2016.

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

DENG, Z. J.; HU, X. F.; AI, X. R.; YAO, L.; DENG, S. M.; PU, X.; SONG, S. Q. Dormancy release of *Cotinus coggygria* seeds under a pre-cold moist stratification: an endogenous abscisic acid/gibberellic acid and comparative proteomic analysis. **New Forests**, v. 47, p. 105-118, 2016.

DEPAUW, R. M.; KNOX, R. E.; SINGH, A. K.; FOX, S. L.; HUMPHREYS, D. G.; HUCL, P. Developing standardized methods for breeding preharvest sprouting resistant wheat, challenges and successes in Canadian wheat. **Euphytica**, v. 188, p. 7-14, 2012.

EDWARDS, K. J.; REID, A. L.; COGHILL, J. A.; BERRY, S. T.; BARKER, G. L. A. Multiplex single nucleotide polymorphism (SNP)-based genotyping in allohexaploid wheat using padlock probes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, p. 375-390, 2009.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>>. Acesso em: 30 out. 2016.

FENG, W.; GUO, B.; WANG, Z.; HE, L.; SONG, X.; WANG, Y.; GUO, T. Measuring leaf nitrogen concentration in winter wheat using double-peak spectral reflection remote sensing data. **Field Crops Research**, v. 159, p. 43-52, 2014.

FINKELSTEIN, R. **Ácido Abscísico: Um sinal para a maturação de semente e antiestresse**. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Tradução Eliane Romanato Santarém... [et al.]. –4. Ed. –Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, E. S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 357-374, 2003.

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

FOX, G. P.; PANOZZO, J. F.; LI, C. D.; LANCE, R. C. M.; INKERMAN, P. A.; HENRY, R. J. Molecular basis of barley quality. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 54, p. 1081-1101, 2003.

FRANCO, F. de A. **Estudo da tolerância à germinação na pré-colheita e identificação de marcadores moleculares associados à dormência em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.)**. 2008. 119f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, 2008.

FRANCO, F. de A.; PINTO, R. J. B.; SCAPIM, C. A.; SCHUSTER, I.; PREDEBOM, C. T.; MARCHIORO, V. S. Tolerância à germinação na espiga em cultivares de trigo colhido na maturação fisiológica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 2396-2401, 2009.

FUKAZAWA, J.; ITO, T.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S.; TAKAHASHI, Y. Binding of GID1 to DELLAs promotes dissociation of GAF1 from DELLA in GA dependent manner. **Plant Signaling and Behavior**, v. 10, p. 1-4, 2015.

GAO, H.; WILLIAMSON, S.; BUSTAMANTE, C. D. A. Markov Chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. **Genetics**, v. 176, p. 1635-1651, 2007.

GAO, X.; HU, C. H.; LI, H. Z.; YAO, Y. J.; MENG, M.; DONG, J.; ZHAO, W. C.; CHEN, Q. J.; LI, X. Y. Factors affecting pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): A review. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 23, p. 556-565, 2013.

GARCÍA-OLMEDO, F.; CARMONA, M. J.; LÓPEZ-FANDO, J. J.; FERNÁNDEZ, J. A.; CASTAGNARO, A.; MOLINA, A.; HERNÁNDEZ-LUCAS, C.; CARBONERO, P. **Characterization and analysis of thionin genes**. In: BOLLER, T.; MEINS, T. (Ed) Plant Gene Research Series. Genes involved in plant defense. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 283-302, 1992.

GILLILAND, L. U.; PAWLOSKI, L. C.; KANDASAMY, M. K.; MEAGHER, R. B. Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. **The Plant Journal**, v. 33, p. 319-328, 2003.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v.40, p.1178-1186, 2012.

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

GUBLER, F.; KALLA, R.; ROBERTS, J. K.; JACOBSEN, J. V. Gibberelin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: Evidence of myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. **Plant Cell**, v. 7, p. 1879-1891, 1995.

HAKENJOS, J. P.; RICHTER, R.; DOHMANN, E. M.; KATSIARIMPA, A.; ISONO, E.; SCHWECHHEIMER, C. MLN4924 is an efficient inhibitor of NEDD8 conjugation in plants. **Plant Physiology**, v. 156, p. 527-536, 2011.

HAMBLIN, M. T.; BUCKLER, E. S.; JANNINK, J. Population genetics of genomics-based crop improvement methods. **Trends in Genetics**, v. 27, p. 98-106, 2011.

HE, J.; ZHAO, X.; LAROCHE, A.; LU, Z.; LIU, H.; LI, Z. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-8, 2014.

HUA, Z.; VIESTRA, R. D. The cullin-RING ubiquitin protein ligases. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 299-334, 2011.

HUANG, X.; HAN, B. Natural Variations and Genome-Wide Association Studies in Crop Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 531-51, 2014.

HWANG, E.; SONG, Q.; JIA, G.; SPECHT, J. E.; HYTEN, D. L.; COSTA, J.; CREGAN, P. B. A genome-wide association study of seed protein and oil content in soybean. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1-12, 2014.

IEHISA, J. C. M.; MATSUURA, T.; MORI, I. C.; YOKOTA, H.; KOBAYASHY, F.; TAKUMI, S. Identification of quantitative trait loci for abscisic acid responsiveness in the D-genome of hexaploid wheat. **Journal of Plant Physiology**, v.171, p.830-841, 2014.

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

JAISWAL, V.; MIR, R. R.; MOHAN, A.; BALYAN, H. S.; GUPTA, P. K. Association mapping for pre-harvest sprouting tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica**, v. 188, p. 89-102, 2012.

KIM, H. S.; DELANEY, T. P. Arabidopsis SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 14, p. 1469-1482, 2002.

KITANAGA, Y.; JIAN, C.; HASEGAWA, M.; YAZAKI, J.; KISHIMITO, N.; KIKUCHI, S.; NAKAMURA, H.; ICHIKAWA, H.; ASAMI, T.; YOSHIDA, S.; YAMAGUCHI, I.; SUZUKI, Y. Sequential regulation of gibberellin, brassinosteroid, and jasmonic acid biosynthesis occurs in rice coleoptiles to control the transcript levels of anti-microbial thionin genes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 2410-2419, 2006.

KOLLERS, S.; RODEMANN, B.; LING, J.; KORZUN, V.; EBMEYER, E.; ARGILLIER, O.; HINZE, M.; PLIESKE, J.; KULOSA, D.; GANAL, M. W.; Roder, M. S. Whole Genome Association Mapping of Fusarium Head Blight Resistance in European Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plos one**, v. 8, p. 1-10, 2013.

KONISHI, Y.; OKAMOTO, A.; TAKAHASHI, J.; AITANI, M.; NAKATANI, N. Effects of Bay m 1099, an α -Glucosidase Inhibitor, on Starch Metabolism in Germinating Wheat Seeds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, p. 135-139, 1994.

KORTE, A; FARLOW, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: A review. **Plant Methods**, v. 9, p. 1-9, 2013.

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

KULWAL, P.; ISHIKAWA, G.; BENSCHER, D.; FENG, Z.; YU, L.; JADHAV, A.; MEHETRE, S.; SORRELLS, M. E. Association mapping for pre-harvest sprouting resistance in white winter wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, p. 793-805, 2012.

KUMAR, J.; MIR, R. R.; KUMAR, N.; KUMAR, A.; MOHAN, A.; PRABHU, K. V.; BALYAN, H. S.; GUPTA, P. K. Marker-assisted selection for pre-harvest sprouting tolerance and leaf rust resistance in bread wheat. **Plant Breeding**, v. 129, p. 617-621, 2010.

KUMAR, V.; SINGH, A.; MITHRA, S. V. A.; KRISHNAMURTHY, S. L.; PARIDA, S. K.; JAIN, S.; TIWARI, K. K.; KUMAR, P.; RAO, A. R.; SHARMA, S. K.; KHURANA, J. P.; SINGH, N. K.; MOHAPATRA, T. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). **DNA Research**, p. 1-13, 2015.

LE GOUIS, J.; BORDES, J.; RAVEL, C.; HEUMEZ, E.; FAURE, S.; PRAUD, S.; GALLIC, N.; REMOUÉ, C.; BALFOURIER, F.; ALLARD, V. Genome-wide association analysis to identify chromosomal regions determining components of earliness in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, p. 597-611, 2012.

LIAO, P.; LEE, K. H. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 149-158, 2010.

LIU, S.; SEHGAL, S. K.; LI, J.; LIN, M.; TRICK, H. N.; YU, J.; GILL, B. S.; BAI, G.. Cloning and Characterization of a Critical Regulator for Preharvest Sprouting in Wheat. **Genetics**, v. 195, p. 263-273, 2013.

LOHWASSER, U.; REHMAN ARIF, M. A.; BORNER, A. Discovery of loci determining pre-harvest sprouting and dormancy in wheat and barley applying segregation and association mapping. **Biologia Plantarum**, v. 57, p. 663-674, 2013.

LORENC, M. T.; HAYASHI, S.; STILLER, J.; LEE, H.; MANOLI, S.; RUPERAO, P.; VISENDI, P.; BERKMAN, P. J.; LAI, K.; BATLEY, J.; EDWARDS, D. Discovery of Single Nucleotide Polymorphisms in Complex Genomes Using SGSautoSNP. **Biology**, v. 1, p. 370-382, 2012.

MACCAFERRI, M.; ZHANG, J.; BULLI, P.; ABATE, Z.; CHAO, S.; CANTU, D.; BOSSOLINI, E.; CHEN, X.; PUMPHREY, M.; DUBCOVSKY, J. A Genome-Wide Association Study of Resistance to Stripe Rust (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*) in a

Worldwide Collection of Hexaploid Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.). **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 20, p. 449-65, 2015.

MARES, D.J.; MRVA, K. Wheat grain preharvest sprouting and late maturity alpha-amylase. **Planta**, v. 240, p. 1167-1178, 2014.

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

MASWHEAT – Marker Assisted Selection in Wheat. Department of Plant Sciences, University of California, Davis, USA. Disponível em: <maswheat.ucdavis.edu>. Acesso em: 12 dez 2016.

McDOWELL, J. M.; HUANG, S.; McKINNEY, E. C.; AN, Y. Q.; MEAGHER, R. B. Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 142, p. 587-602, 1996.

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

MERGNER, J.; SCHWECHHEIMER, C. The NEDD8 modification pathway in plants. **Frontier in Plant Science**, v. 5, p. 1-15, 2014.

MIEDANER, T.; KORZUN, V. Marker-Assisted Selection for Disease Resistance in Wheat and Barley Breeding. **Phytopathology**, v. 102, p. 560-566, 2012.

MOON, J.; PARRY, G.; ESTELLE, M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. **Plant Cell**, v. 16, p. 3181-3195, 2004.

PASAM, R. K.; SHARMA, R.; MALOSETTI, M.; EEUWIJK, F. A. V.; HASENEYER, G.; KILIAN, B.; GRANER, A. Genome-wide association studies for agronomical traits in a world wide spring barley collection. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 1-22, 2012.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 2239-2253, 2005.

PEREIRA, H. S.; SANTOS, J. B. dos; SOUZA, T. P. de; LIMA, I. A. Seleção fenotípica e assistida por marcadores moleculares de famílias de feijoeiro-comum com alta produtividade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1551-1558, 2008.

PFEIFER, M.; KUGLER, K. G.; SANDVE, S. R.; ZHAN, B.; RUDI, H.; HVIDSTEN, T. R.; IWGSC; MAYER, K. F. X.; OLSEN, O. Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat. **Science**, v. 345, p. 1-10, 2014.

RASUL, G; HUMPHREYS, G. D.; WU, J.; BRULE-BABEL, A.; FOFANA, B.; GLOVER, K. D. Evaluation of preharvest sprouting traits in a collection of spring wheat

germplasm using genotype and genotype x environment interaction model. **Plant Breeding**, v. 131, p. 244-251, 2012.

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

RESENDE, M. D. V.; SILVA, F. F.; RESENDE JÚNIOR, M. F. R. **Genética de Associação (GWAS)**. In: BOREM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed.). Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas. Viçosa: Suprema, p.119-150, 2013.

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

ROY, J. K.; PRASAD, M.; VARSHNEY, R. K.; BALYAN, H. S.; BLAKE, T. K.; DHALIWAL, H. S.; SINGH, H.; EDWARDS, K. J.; GUPTA, P. K. Identification of a microsatellite on chromosomes 6B and a STS on 7D of bread wheat showing an association with pre-harvest sprouting tolerance. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 336-340, 1999.

RUGEN, M. D. **The generation of tools to interrogate carbohydrate metabolism during cereal germination**. 2015. 295 f. Tese (Doutorado) – John Innes Centre, Norwich, 2015.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., v. 3, 1989.

SCHUSTER, I. Marker-assisted selection for quantitative traits. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 50-55, 2011.

SHU, K.; MENG, Y. J.; SHUAI, H. W.; LIU, W. G.; DU, J. B.; LIU, J.; YANG, W. Y. Dormancy and germination: How does the crop seed decide?. **Plant Biology**, v. 17, p. 1104-1112, 2015.

SILVEIRA, L. E. D. **Expressão de genes no embrião e endosperma durante a germinação de sementes de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill)**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu, 2014.

SIMSEK, S.; OHM, J.; LU, H.; RUGG, M.; BERZONSKY, W.; ALAMRI, M. S.; MERGOUM, M. Effect of pre-harvest sprouting on physicochemical changes of proteins in wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 205-212, 2014.

SMALLE, J.; VIERSTRA, R. D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 555-590, 2004.

SONG, S.; DAI, X.; ZHANG, W. A rice F-box gene, OsFbx352, is involved in glucose-delayed seed germination in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 5559-5568, 2012.

SORRELS, M. E.; ANDERSON, J. A. **Quantitative trait loci associated with pre-harvest sprouting in white wheat.** 1996. In: NODA, K.; MARES, D. J. (Ed.). Pre-harvest sprouting in cereals. Center for Academic Societies, Japan, Osaka, p.137-142, 1996.

SPONSEL, V. **Giberelinas: Reguladores da altura das plantas e da germinação de sementes.** In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Tradução Eliane Romanato Santarém... [et al.]. –4. Ed. –Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

STAIGER, C. J.; SCHLIWA, M. Actin localization and function in higher plants. **Protoplasma**, v. 141, p. 1-12, 1987.

SUKUMARAN, S.; DREISIGACKER, S.; LOPES, M.; CHAVEZ, P.; REYNOLDS, M. P. Genome-wide association study for grain yield and related traits in an elite spring wheat population grown in temperate irrigated environments. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 353-363, 2015.

SUN, T. Gibberellin-GID1-DELLA: A pivotal regulatory module for plant growth and development. **Plant Physiology**, v. 154, p. 567-570, 2010.

TIAN, Z.; JING, Q.; DAI, T.; JIANG, D.; CAO, W. Effects of genetic improvements on grain yield and agronomic traits of winter wheat in the Yangtze River Basin of China. **Field Crops Research**, v. 124, p. 417-425, 2011.

VIOLA, R.; BENIN, G.; CASSOL, L. C.; PINNOW, C.; FLORES, M. F.; BORNHOFEN, E. Adubação verde e nitrogenada na cultura do trigo em plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v. 72, p. 1-11, 2013.

WANG, M.; JIANG, N.; JIA, T.; LEACH, L.; COCKRAM, L.; WAUGH, R.; RAMSAY, L.; THOMAS, B.; LUO, Z. Genome-wide association mapping of agronomic and morphologic traits in highly structured populations of barley cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, p. 233-246, 2012.

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

WOO, H. R.; CHUNG, K. M.; PARK, J. H.; OH, S. A.; AHN, T.; HONG, S. H.; JANG, S. K.; NAM, H. G. ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 13, p. 1779-1790, 2001.

WRAY, N. R.; VISSCHER, P. M. **Population genetics and its relevance to gene mapping.** In: NEALE, B. N. M.; FERREIRA, M. A. R.; MEDLAND, S. E.; POSTHUMA, D. (Ed.). Statistical genetics: Gene mapping through linkage and association. New York, Taylor and Francis Group, p. 87-112, 2008.

XU, Y.; CROUCH, J. H. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. **Crop Science**, v. 48, p. 391-407, 2008.

YANG, W.; GUO, Z.; HUANG, C.; DUAN, L.; CHEN, G.; JIANG, N.; FANG, W.; FENG, H.; XIE, W.; LIAN, X.; WANG, G.; LUO, Q.; ZHANG, Q.; LIU, Q.; XIONG, L. Combining high-throughput phenotyping and genome wide association studies to reveal natural genetic variation in rice. **Nature Communications**, v. 5, p. 1-9, 2014a.

YANG, N.; LU, Y.; YANG, X.; HUANG, J.; ZHOU, Y.; ALI, F.; WEN, W.; LIU, J.; LI, J.; YAN, J. Genome Wide Association Studies Using a New Nonparametric Model Reveal the Genetic Architecture of 17 Agronomic Traits in an Enlarged Maize Association Panel. **Plos Genetics**, v. 10, p. 1-14, 2014b.

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

ZANETTI, S.; WINZELER, M.; KELLER, M.; KELLER, B.; MESSMER, M. Genetic analysis of pre-harvest sprouting resistance in a wheat x spelt cross. **Crop Science**, v. 40, p. 1406-1417, 2000.

ZHANG, J.; SONG, Q.; CREGAN, P. B.; NELSON, R. L.; WANG, X.; WU, J.; JIANG, G. Genome-wide association study for flowering time, maturity dates and plant height in early maturing soybean (*Glycine max*) germplasm. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1-11, 2015.

ZHANG, Y.; XU, W.; LI, W.; DENG, X. W.; WU, W.; XUE, Y. F-box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under drought stress in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 148, p. 2121-2133, 2008.