



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANE DALLA NORA MONTECELLI

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES E QTLs
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A GIBERELA EM TRIGO**

Londrina
2012

TATIANE DALLA NORA MONTECELLI

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES E QTLs
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A GIBERELA EM TRIGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de concentração em Fitossanidade.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri

Londrina
2012

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M773v Montecelli, Tatiane Dalla Nora.

Validação de marcadores moleculares e QTLs associados à resistência a giberela em trigo / Tatiane Dalla Nora Montecelli. – Londrina, 2012. 75 f.: il.

Orientador: Marcelo Giovanetti Canteri.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Trigo – Resistência a doenças e pragas – Teses. 2. Marcadores biológicos – Teses. 3. Fusarium – Teses. 4. Mapeamento cromossômico – Teses. 5. Trigo – Melhoramento genético – Teses. I. Canteri, Marcelo Giovanetti. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 633.11

TATIANE DALLA NORA MONTECELLI

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES E QTLs
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A GIBERELA EM TRIGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de concentração em Fitossanidade.

BANCA EXAMINADORA

Orientador. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Ana Paula Silva Campos Gaino
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Carlos Roberto Riede
Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR

Dr. Ivan Schuster
Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola –
COODETEC

Dra. Valéria Carpentieri Pípolo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de fevereiro de 2012.

DEDICO

À Deus, de quem sou apenas um instrumento imperfeito, que me capacita para realizar tudo aquilo que acredito ser impossível e que me acompanha em todos os momentos, pois nunca me deixou desistir e sempre me carregou em seus braços.

Aos meus pais, Paulo e Judith, minha eterna gratidão ao seu amor e dedicação.

Ao meu esposo Alfredo, por toda compreensão e companherismo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Departamento de Agronomia e ao Centro de Pós-Graduação.

Ao professor Dr. Marcelo Giovanetti Canteri, pela orientação deste trabalho, apoio e pela confiança em mim depositada.

Ao professor Dr. Martin Homechin (*in memoriam*) pela oportunidade da convivência, pelos ensinamentos e confiança. Meu reconhecimento e gratidão.

À COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, pela oportunidade e viabilização desta formação.

Ao Dr. Ivan Schuster, pelo exemplo diário, ensinamentos, dedicação e contribuições valiosas em todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. Francisco de Assis Franco por todo incentivo aos desafios, sugestões, auxílio, amizade e confiança.

Aos colegas da COODETEC que sempre me incentivaram e auxiliaram em minhas ausências em função do curso, especialmente aos funcionários da Fitopatologia, Biotecnologia e Programa de Melhoramento de Trigo.

Aos colegas Franciele Mioranza e Luiz Carlos de Oliveira pelo suporte ao longo destes anos de trabalho e de dedicação incansável.

Às colegas Fabiane Lazzari, Joselaine Viganó e Adriane Scherloski por todo auxílio e dedicação.

À comissão examinadora, pelas contribuições valiosas.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Dona Weda Aparecida Westin, por todo auxílio e suporte ao longo destes anos.

As grandes amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela amizade e grande força em todos os momentos.

À todos meus familiares e amigos, pelo entendimento e força aos desafios da vida. Vocês me tornam uma pessoa melhor e mais feliz.

Epígrafe:

A todo cientista minucioso deve ser natural algum tipo de sentimento religioso, pois não consegue supor que as dependências extremamente sutis por ele vislumbradas tenham sido pensadas pela primeira vez por ele. No universo incompreensível revela-se uma razão ilimitada.

(Albert Einstein)

MONTECELLI, Tatiane Dalla Nora. **Validação de marcadores moleculares e qtls associados à resistência a giberela em trigo**. 2012. 75 f. Tese de Doutorado em Agronomia - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Visando validar marcadores moleculares e mapear QTLs associados à resistência a Giberela (*Fusarium graminearum*) foram obtidas 3 populações $F_{2:3}$ de trigo (*Triticum aestivum* L.) provenientes dos cruzamentos entre Frontana x Weebil, Ning 7840 x Frontana e Ning 7840 x Kosoro. As populações foram fenotipadas para resistência à infecção inicial, Tipo I, em campo e de disseminação, Tipo II, em casa de vegetação. Para identificar os marcadores moleculares associados à resistência à giberela foram analisados os marcadores amplificados e os dados fenotípicos de cada população pelo método de regressão linear simples e múltipla (método *stepwise*). Para resistência do Tipo I na população $F_{2:3}$ derivada de Frontana x Weebil houve associação do marcador *Xgwm376* explicando (R^2) 8,83% da variação fenotípica. Associação do marcador *Xbarc76* ($R^2 = 10,81$) na população $F_{2:3}$ derivada de Ning 7840 x Kosoro foi observada, entretanto, pela análise de regressão múltipla desta população houve associação de *Xbarc76* e *Xbarc87* que juntos explicam 18,07% da variação fenotípica, indicando existência de efeito epistático entre os QTLs associados a estes marcadores. No estudo de resistência do Tipo II pela análise de regressão simples da população Ning 7840 x Frontana houve associação do marcador *Wmc398* ($R^2 = 7,49$), pela análise de regressão múltipla foram associados os marcadores *Wmc398*, *Xbarc180* e *Xgwm369* que juntos explicam 16,53% da variação fenotípica da população, também indicando existência de epistasia entre os QTLs associados a estes marcadores. O mapeamento de QTLs de resistência a giberela foi realizado pelo método de mapeamento por intervalo. Neste estudo foi identificado um pico que ultrapassou o valor de LR crítico (9,1) indicando existência de um QTL entre os marcadores *Xbarc147* e *Wmc808*, localizado no cromossomo 3BS sendo proveniente da cultivar Ning 7840. Os resultados deste trabalho serão úteis para utilização em programas de seleção assistida por marcadores moleculares, no melhoramento genético de trigo.

Palavras-chaves: *Triticum aestivum*. *Fusarium graminearum*. Seleção assistida por marcadores moleculares. Marcadores microsatélites. Mapeamento molecular.

MONTECELLI, Tatiane Dalla Nora. **Molecular markers and qtls validation of fusarium head blight resistance in weath.** 2012. 75 p. Tese de Doutorado em Agronomia - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

To validate molecular markers and map QTLs linked with Fusarium head blight (*Fusarium graminearum*) resistance, three F_{2:3} wheat (*Triticum aestivum* L.) populations were obtained from the crosses between Frontana x Weebil, Ning 7840 x Frontana and Ning 7840 x Kosoro. The populations were phenotyped for resistance to initial infection, Type 1, in the field, to spread, Type 2, in greenhouse. To identify molecular markers linked with FHB resistance markers were amplified and analyzed with the phenotypic data of each population by the simple and multiple linear regression method (stepwise method). For type 1 resistance in the F_{2:3} population, derived from Frontana x Weebil was a linked with *Xgwm376*, that explaining 8.83% of the phenotypic variation. Association of *Xbarc76* with R² value (10,81) in the F_{2:3} population derived from Ning 7840 x Kosoro was observed, however, by multiple regression analysis of this population *Xbarc76* and *Xbarc87* was associated which together explain 18.07% of the phenotypic variation, indicating the existence of the epistatic effects of QTLs linked with these SSR markers. In Type II resistance the study by simple regression analysis of the population Ning 7840 x Frontana, *Wmc398* marker was linked (R² = 7.49), by multiple regression analysis *Wmc398*, *Xbarc180* and *Xgwm369* markers were associated, together explain 16.53% of the phenotypic variation of these population, also indicating the existence of epistasis between QTLs associated with these markers. The mapping of FHB resistance QTLs was performed by the interval mapping method. This study identified a peak that exceeded the critical value of *likelihood ratio* (LR=9.1) indicating of a QTL existence between SSR markers *Xbarc147* and *Wmc808*, located on 3BS chromosome being from the cultivar Ning 7840. The results of this study will be useful for use in programs of marker-assisted selection in wheat breeding.

Key words: *Triticum aestivum*. *Fusarium graminearum*. Marked-assisted selection. SSR markers. Molecular mapping.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	CULTURA DO TRIGO	12
2.2	OCORRÊNCIA DE DOENÇAS NO TRIGO.....	13
2.3	GIBERELA.....	14
2.3.1	Danos	15
2.3.2	Ciclo da Doença e Epidemiologia.....	17
2.3.3	Sintomas e Sinais	21
2.3.4	Medidas de Controle.....	22
2.4	RESISTÊNCIA A GIBERELA EM TRIGO.....	23
2.4.1	Fontes de Resistência	26
2.4.2	Base Genética da Resistência.....	28
2.5	IDENTIFICAÇÃO DE QTLs	29
2.6	MARCADORES MOLECULARES.....	31
2.6.1	Tipos de Marcadores Moleculares.....	32
2.6.2	Seleção Assistida por Marcadores Moleculares	35
2.6.3	Validação de Marcadores Moleculares Associados a QTLs.....	36
3	REFERÊNCIAS	37
4	ARTIGO: VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES E QTLs ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA À GIBERELA EM TRIGO	48
4.1	INTRODUÇÃO	50
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.2.1	Material Genético	51
4.2.2	Avaliação Fenotípica	52
4.2.3	Extração de DNA.....	57
4.2.4	Seleção e Amplificação dos Locos Microsatélites	58
4.2.5	Análise de Dados	59
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.3.1	Fenotipagem.....	60

4.3.2	Validação de Marcadores Moleculares.....	65
4.3.3	Mapeamento de QTLs Associados a Resistência a Giberela.....	69
4.4	CONCLUSÕES	71
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

Para o Brasil o trigo é uma cultura de grande importância econômica, especialmente na região Sul. A área cultivada com este cereal na safra 2011 foi de aproximadamente 2,15 milhões de hectares, com uma produção de 5,8 milhões de toneladas de grãos, sendo o Estado do Paraná o maior produtor com 3,3 milhões de toneladas, seguido pelo Rio Grande do Sul com 1,9 milhões de toneladas produzidas (CONAB, 2012).

Entre os fatores que podem afetar a produção de trigo estão a ocorrência e a intensidade das doenças (REIS et al., 2001). A giberela é uma das mais importantes doenças do trigo em todo mundo. É observada causando danos nas regiões tritícolas onde o ambiente é úmido e quente, com precipitações pluviais frequentes na fase do florescimento do trigo (REIS; CASA, 2007). Muitas espécies de *Fusarium* podem causar a doença. *Fusarium graminearum* Schwabe, [Teleomórfica = *Gibberella zeae* (Schwabe) Petch] é a principal espécie envolvida com a patogenicidade em muitos países (PARRY et al., 1995; BAI; SHANER, 2004).

A natureza esporádica da doença esta associada à dependência climática. Nos últimos anos, registram-se incremento na intensidade da doença em quase todas as regiões produtoras de trigo no mundo (WINDELS, 2000; CASA; KUHNE JUNIOR, 2011). Os danos causados pela giberela manifestam-se pela redução do rendimento, entretanto, estes não são apenas quantitativos, mas também qualitativos, principalmente devido à produção de micotoxinas prejudiciais a saúde humana e animal (PARRY et al., 1995; BAI; SHANER, 2004).

Medidas de controle culturais como rotação de culturas não tem sido eficientes, devido à ampla gama de hospedeiros do agente causal (REIS; CASA, 2007). A aplicação de fungicidas tornou-se uma prática comum, entretanto esta prática também apresenta eficiência limitada pelas dificuldades inerentes ao momento e tecnologias de aplicação, bem como, adiciona custos elevados aos produtores, principalmente em anos de severas epidemias (DEL PONTE et al., 2004).

O desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes à giberela representa a principal forma de reduzir as perdas em rendimento e danos na qualidade dos grãos (BAI; SHANER, 2004).

O mecanismo de resistência complexo combinado com o fato de que a expressão dos sintomas é variável e extremamente dependente de condições ambientais, dificultam e oneram o custo das estratégias de seleção convencional (HANDA et al., 2008; XUE et al., 2010). O entendimento dos mecanismos genéticos de resistência e o desenvolvimento de novas estratégias de melhoramento são necessárias para o desenvolvimento de cultivares de trigo com efetiva resistência a giberela (XUE et al., 2010).

Recentemente com a disponibilidade de marcadores moleculares e de mapas genéticos, mais de 200 locos para características quantitativas (QTLs) para resistência a giberela foram identificados em germoplasma de trigo e espécies afins (BUERSTMAYR et al., 2009; LÖFFLER et al., 2009; LIU et al., 2009). Com marcadores moleculares associados a estes QTLs a seleção assistida (SAM) para a resistência a giberela torna-se possível (ZHOU et al., 2003; XUE et al., 2010).

Para utilização em programas de melhoramento de trigo os marcadores associados à QTLs de resistência a giberela devem ser validados, isto é, deve-se testar sua efetividade na determinação do fenótipo alvo em populações independentes e em diferentes *backgrounds* genéticos, para que sejam definidos os marcadores mais eficientes para uso efetivo na SAM (COLLARD et al., 2005; CUTHBERT et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi validar os marcadores moleculares associados à resistência a giberela e fenotipando diferentes populações de trigo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO TRIGO

Botanicamente o trigo pertence ao Reino *Plantae*, Superdivisão *Spermatophyta*, Divisão *Magnoliophyta*, Classe *Liliopsida*, Ordem *Poales*, Família *Poaceae* e Gênero *Triticum aestivum* L. É uma série poliploide que consiste em três níveis diferentes de ploidia: diploide com $2n = 14$, tetraplóide com $2n = 28$ e hexaplóide com $2n = 42$. O trigo utilizado para panificação é o *Triticum aestivum* (L.) Thell $2n = 6X = 42$. No trigo, cada genoma possui sete cromossomos (CASTRO; KLUGE, 1999).

Originário da Ásia, o trigo foi introduzido na Índia, na China e na Europa desde 5.000 anos AC, constituindo importância significativa na alimentação da humanidade. Com a Revolução Industrial no século XVII e a Revolução Verde em 1960 foi favorecido o aumento na produtividade e na expansão de sua área cultivada (WIESE, 1987).

Atualmente, a cultura do trigo é a segunda em expressão em nível mundial. Dados preliminares da safra 2010/2011 destacam a produção de 651,6 milhões de toneladas, sendo esta liderada pela União Européia, com 135,7 milhões de toneladas. A primeira cultura em expressão mundial é o milho com 827,56 milhões de toneladas produzidas (USDA, 2012).

Para o Brasil o trigo é uma cultura de grande importância econômica, especialmente na região Sul. A área cultivada com este cereal na safra 2011 foi de aproximadamente 2,15 milhões de hectares, com uma produção de 5,8 milhões de toneladas de grãos, sendo o Estado do Paraná o maior produtor com 3,3 milhões de toneladas, seguido pelo Rio Grande do Sul com 1,9 milhões de toneladas produzidas (CONAB, 2012).

Para um consumo nacional de cerca de 10,39 milhões de toneladas, a produção interna atende somente 60% desta demanda. A produção anual brasileira é muito variável em função das condições adversas principalmente relacionadas ao clima e ocorrência de doenças que atuam limitando a produtividade. O Brasil jamais conseguiu a auto suficiência em relação a este cereal. Neste contexto a Argentina se firmou como um importante fornecedor de trigo para o País. Tal realidade ganhou força com a consolidação do Mercosul a partir de 1991. Desta

forma o Brasil se destaca como um dos principais importadores de trigo do mundo (BRUM; HECK, 2005).

A principal característica das grandes áreas produtoras de cereais de estação fria como o trigo é o fato de situarem-se em regiões de baixa ou de média precipitação pluvial e com períodos de baixa temperatura no início do cultivo (MUNDSTOCK, 1983).

No Brasil, as melhores condições de clima para o cultivo de trigo, são encontradas nos três estados da região Sul do país, apesar do clima ser muito instável (no ano e entre anos) principalmente, em relação à precipitação pluviométrica e à temperatura (REIS et al., 1988).

A cultura do trigo é de grande importância para a atividade agrícola no Sul do Brasil. É uma gramínea de ciclo anual, cultivada durante o inverno, e é um dos alimentos básicos do povo brasileiro, consumido em diferentes formas como pães, massas alimentícias, bolos e biscoitos (SOUZA; LORENZI, 2008). A produção interna abrange vários setores econômicos como a pesquisa, a produção de grãos, a comercialização, a industrialização, gerando em sua cadeia produtiva milhares de empregos (ENCONTRO..., 2003).

2.2 OCORRÊNCIA DE DOENÇAS NO TRIGO

Entre os fatores que podem afetar a produção de trigo estão a ocorrência e a intensidade das doenças (REIS et al., 2001). A cultura do trigo no Brasil frequentemente é afetada por um grande número de doenças. As condições climáticas onde predominam temperaturas altas e precipitações pluviais frequentes, favorecem o desenvolvimento de inúmeras enfermidades, principalmente aquelas causadas por fungos. Essas podem ser responsáveis por perdas elevadas no rendimento e na qualidade dos grãos de trigo. O volume de danos é variável de ano para ano, dependendo das condições climáticas (FERNANDES; PICININI) (1999).

A temperatura age como catalisador dos processos biológicos, razão pela qual tanto as plantas como os patógenos requerem uma temperatura mínima para crescer e desenvolver-se normalmente suas atividades. Os patógenos diferem em seus requerimentos térmicos, de tal maneira que muitas doenças se desenvolvem melhor em áreas, estações ou anos com temperaturas mais baixas, ao passo que outras são favorecidas quando predominam temperaturas relativamente

altas. A água influencia no estabelecimento e no desenvolvimento das doenças parasitárias de muitas maneiras. Seu efeito mais importante é estimular a germinação dos esporos dos fungos e a penetração do tubo germinativo; também ativa as bactérias e nematóides para que infectem a planta. A água como respingos de chuva e a água corrente desempenham, igualmente, um papel importante como veículo de transporte na dispersão de muitos patógenos dentro da mesma planta ou de uma planta para outra (REIS, 2004).

As doenças em trigo podem ser de origem biótica ou abiótica, sendo que, as doenças bióticas são causadas basicamente por três grandes grupos: bactérias, fungos e vírus (GARCIA JR., 2006).

Dentre as doenças do trigo provocadas por fungos destacam-se a giberela, cujo agente etiológico é *Fusarium graminearum*, ferrugem da folha (*Puccinia triticina*), Ferrugem linear (*Puccinia striiformis*), mancha da gluma (*Leptosphaeria nodorum*), mancha marrom (*Bipolaris sorokiniana*), manchas foliares (*Drechslera tritici-repentis*, *Drechslera siccans*, *Septoria tritici*), Oídio (*Erysiphe graminis*), brusone (*Magnaporthe grisea*), podridão comum das raízes (*Cochiobolus sativus*), mal-do-pé (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*), carvão (*Ustilago tritici*). (REIS; CASA, 2007).

2.3 GIBERELA

A giberela é uma das mais importantes doenças do trigo em todo mundo. Foi descrita pela primeira vez em 1891 nos Estados Unidos (ARTHUR, 1891). Após esta data a doença foi relatada gradativamente em outros países. Na América do Sul o primeiro relato foi feito em 1927, na Argentina (MARCHIONATO, 1927 *apud* GALICH, 1989). No Brasil, COSTA NETO (1947) realizou o primeiro estudo descrevendo a epidemia de 1939.

Embora muitas espécies de *Fusarium* possam causar a doença, *Fusarium graminearum* Schwabe, [Teleomórfica = *Gibberella zeae* (Schwabe) Petch] é a principal espécie envolvida com a patogenicidade em muitos países (PARRY et al., 1995; BAI; SHANER, 2004). *F. culmorum* e *F. poae* foram relatados como espécies prevalentes em alguns países da Europa (LEONARD; BUSNELL, 2003). Estudos de ANGELOTTI, et al. (2006) identificaram apenas *F. graminearum* como agente de giberela em trigo na Região Sul do Brasil.

A giberela é considerada uma doença de infecção floral podendo também atacar o sistema radicular, sendo denominada nesta fase de podridão comum de raízes (PCR). A principal fonte de inóculo para a PCR são as sementes infectadas (REIS, 1988; REIS et al., 1995).

As fontes de inóculo mais importantes para a infecção das espigas de trigo são os peritécios de *Giberella zeae* formados sobre restos culturais de inúmeros substratos na superfície do solo. Desse modo, são favorecidas a sobrevivência do patógeno, a liberação do inóculo e a inoculação. O fungo *G. zeae* é um parasita necrotrófico com habilidade de competição saprofítica. Por isso, os restos culturais de hospedeiros suscetíveis são as principais fontes de inóculo do patógeno (REIS, 1988; CASA, et al., 2004). BAI; SHANER (1994) salientam que é nestes tecidos que o fungo sobrevive durante o inverno.

Existem relatos de sobrevivência de *G. zeae* em uma ampla gama de hospedeiros. As principais espécies de expressão econômica suscetíveis ao patógeno são o trigo, tritcale, cevada, aveia, centeio, azevém, arroz, milho, trevo, alfafa, sorgo. Outras gramíneas como diferentes espécies de *Brachiaria* sp., *Digitaria* sp., *Paspalum* sp., e *Panicum maximum* também foram relatadas como hospedeiros (WIESE, 1987; REIS, 1988; CASA; KUHNEM JÚNIOR, 2011). No Brasil YUYAMA; HENNING (1999), destacaram que *F. graminearum* é incidente em sementes de soja e FERNADEZ; FERNANDES (1990), reportaram a presença de peritécios nos restos culturais desta cultura.

2.3.1 Danos

Em geral, epidemias severas de giberela ocorrem esporadicamente, associadas a períodos prolongados de molhamento nas espigas, desde o início da antese até a maturação fisiológica (SUTTON, 1982; REIS, 1988, PARRY et al., 1995; PANISSON et al., 2003; CASA et al, 2004). Pode ser considerada uma doença altamente devastadora quando coincidirem as condições necessárias para a infecção e progresso da doença (McMULLEN et al., 1997).

MAULER-MACHNIK; ZAHN (1994) observaram que a ocorrência da doença no mundo vem aumentando nos últimos anos, apresentando uma variação de intensidade de ano para ano, destacando como principais causas o cultivo intensivo das áreas em monocultura e plantio direto.

Na Região Sul do Brasil a giberela era considerada uma doença de importância secundária, mas com a adoção e incremento do sistema plantio direto na palha sua importância tem aumentado. No final da década de 1980 e início da década de 1990 houve uma mudança significativa nos sistemas de manejo de solo e de sucessão e rotação de culturas (REIS; SANTOS, 1993). Tais fatos proporcionaram a manutenção dos restos culturais infectados, favorecendo epidemias. Atualmente ocorrem epidemias frequentes, e em virtude dos danos causados é considerada uma doença de importância primária (LIMA; FERNANDES, 2002; PANISSON et al., 2003; CASA; KUHNEM JÚNIOR, 2011).

Na China a giberela afetou mais de 7 milhões de hectares de trigo e causou perdas de mais de um milhão de toneladas em severas epidemias no período de 1957 a 1984 (LIU, 1985). Nos Estados Unidos, as epidemias ocorridas no período entre 1991 e 1997, resultaram em perdas diretas de \$1,3 bilhões (BAI; SHANER, 2004). Na Argentina, na região de Córdoba, Moschini e Fortugno (1996) citaram danos de 5 a 30%.

No Brasil, em trabalho realizado entre 1984 e 1994, na Embrapa em Passo Fundo, RS, as estimativas dos danos variaram de 0,4% a 14% no rendimento de grãos, com média de 5,4% (REIS et al., 1996).

PANISSON et al. (2003) quantificaram os danos médios em sete cultivares de trigo na safra do ano 2000 que resultaram em 640 kg.ha⁻¹ ou 17,5%. Os danos encontrados nesta safra foram três vezes superiores aos obtidos por REIS et al. (1996). Em experimentos realizados por CASA et al. (2004), nas safras 2001 e 2002 a redução do rendimento médio de grãos corresponderam a 13,4% ou a 6,57 sacas de trigo/ha. O dano foi variável dependendo da cultivar e das condições de cultivo. Na safra de 2002 a redução do rendimento médio de grãos correspondeu a 11,6% ou a 5,94 sacas de trigo/ha.

Os danos causados pela doença se manifestam através da redução do rendimento de grãos; redução do peso hectolitro; diminuição do teor de proteína nos grãos afetando a taxa de extração da farinha; redução do poder germinativo e do vigor das sementes podendo originar plantas com sintomas de podridão radicular (BAI; SHANER, 1994; PARRY et al, 1995, PANISSON, 2001).

Além das perdas diretas, a giberela pode causar perdas indiretas, devido à contaminação dos grãos com micotoxinas, especialmente deoxynivalenol

(DON). A contaminação dos grãos de trigo com DON acarreta um sério problema de segurança alimentar (BAI; SHANER, 2004).

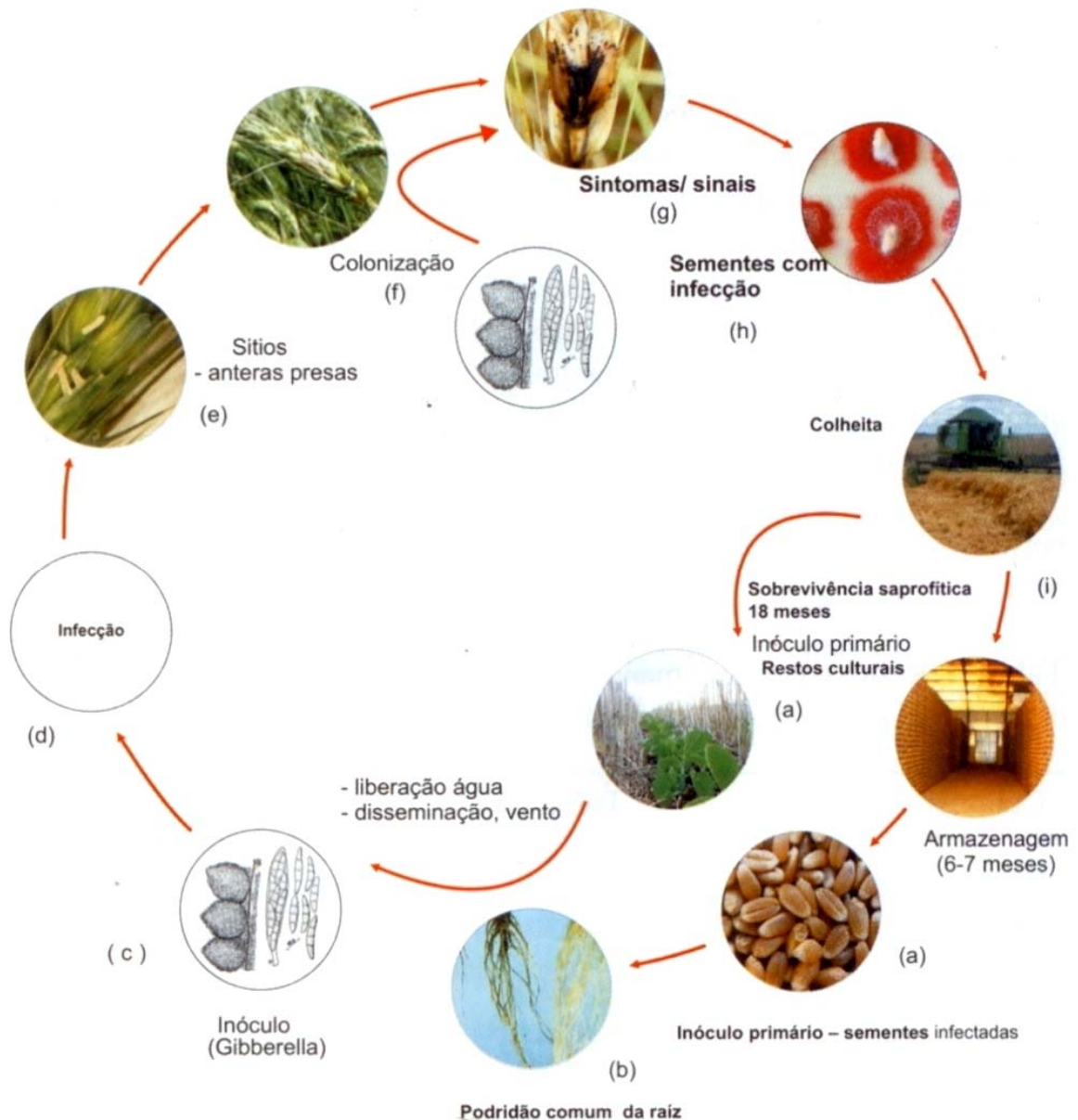
2.3.2 Ciclo da Doença e Epidemiologia

O ciclo da doença também chamado de ciclo das relações patógeno-hospedeiro é a corrente de eventos que envolvem desenvolvimento da doença, Na figura 1 observa-se o ciclo de *G. zae* em cereais de inverno. O ciclo da doença é constituído de cinco sub processos básicos: sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno (AGRIOS, 2005; AMORIM, 1995).

A giberela é considerada uma doença monocíclica. O fungo sobrevive, entre as estações de cultivo, como saprófita em resíduos vegetais de culturas hospedeiras e não hospedeiras (SUTTON, 1982; DEL PONTE et al., 2004). PARRY et al. (1995) salientaram que todas as espécies de *Fusarium* que infectam cereais de inverno são capazes de sobreviver saprofiticamente em restos culturais.

Sobre estes resíduos o fungo produz esporos assexuais, macroconídios, que são liberados e dispersos a curta distância por meio de respingos de chuva ou pela ação do vento, podendo ser elevados para o dossel da cultura. Em ambiente sem umidade não ocorre sua disseminação pelo vento, ficando assim aderido ao substrato (REIS, 1988; BAI; SHANER, 1994; DEL PONTE et al., 2004).

Figura 1 – Ciclo biológico de *Gibberella zae* (Fonte: DANIELLI et al.,2011).



Em condições de elevado molhamento, o estágio sexual do fungo, *G. zae*, se desenvolve nos resíduos infectados. Peritécios negros se formam na superfície destes resíduos e, forçadamente, liberam os esporos sexuais (ascósporos) no ambiente, acima do dossel das plantas. Estes ascósporos, ao encontrarem correntes turbulentas de vento, podem ser disseminados a longas distâncias da fonte de origem (PARRY et al.,1995; DEL PONTE et al., 2004; SCHMALLE; BERGSTROM, 2010). A população de ascósporos presentes no ar é considerada um indicador do potencial da doença (BAI; SHANER, 1994).

A infecção ocorre quando os ascosporos, e também macroconídios, se depositam sobre espigas suscetíveis de trigo em condições de temperatura entre 20 e 30°C do período que vai da extrusão das anteras, consideradas o sítio primário de infecção, até estágios de grão em massa (REIS, 1988; PARRY et al., 1995; DEL PONTE et al., 2004).

Desde os estudos conduzidos por ATANASOFF (1920), existe um consenso de que a giberela é uma doença que ocorre no florescimento com pico de suscetibilidade no momento de extrusão das anteras. Alguns autores associaram uma maior extensão da janela de infecção às cultivares de trigo que retêm as anteras (PUGH et al., 1933; LIANG et al., 1981, DEL PONTE et al., 2004). Reis et al, (1996) sugeriram que as anteras desempenham importante papel epidemiológico, uma vez que foi observada maior correlação da incidência da doença em espigas com anteras presas, sendo este valor duas vezes superior em relação as espigas com anteras soltas. PANISSON et al. (2002) quantificando a importância relativa das anteras soltas e presas no processo infeccioso da giberela em trigo, em Passo Fundo/RS, no ano 2000, concluíram que no estágio de floração plena a infecção foi de 11,8% nas anteras soltas e de 24,3% nas anteras presas.

LIMA (2003) observou em inoculações artificiais conduzidas em casa de vegetação, que espigas de trigo de uma cultivar brasileira foram igualmente suscetíveis a giberela desde a emergência completa das espigas, em anteras extrusadas, até 15 dias após o florescimento.

O consenso gerado em relação ao florescimento como principal sítio de infecção está relacionado ao fato de que é no momento da extrusão das anteras que tem início o processo de infecção (DEL PONTE et al., 2004). A dependência das anteras, para o fungo invadir a flor, foi demonstrada por uma série de trabalhos conduzidos por STRANGE et al. (1974). Estes autores demonstraram que a remoção das anteras, através da emasculação, reduzia drasticamente a intensidade da doença. Realizaram estudos comparativos do crescimento do fungo em diferentes tecidos e concluíram que nestes órgãos havia substâncias estimulantes ao crescimento do patógeno. Isolaram dois compostos quaternários de amônio como os responsáveis pelo efeito estimulante ao crescimento, identificados como colina e betaína. Estudos recentes de ENGLE et al. (2002), não verificaram influência positiva da adição destes dois compostos na germinação de conídios de *F.*

graminearum, mas sim, mostraram efeito promotor para o rápido crescimento inicial ao estimularem a extensão das hifas.

Quando as anteras do trigo são infectadas logo após a extrusão, o fungo coloniza e leva a morte das inflorescências, não havendo desenvolvimento de grãos. Inflorescências infectadas mais tardiamente produzem grãos chochos e enrugados. Os grãos que são colonizados pelo patógeno durante o seu desenvolvimento, embora assintomáticos, podem estar contaminados com micotoxinas (DEL PONTE et al, 2004; SCHMALLE; BERGSTROM, 2010).

A giberela é descrita como uma doença de clima quente e úmido, entretanto, o fungo pode crescer em ampla gama de temperaturas. Nenhum crescimento fúngico foi observado em temperaturas de 4 e 36°C, um crescimento lento foi observado de 8 a 32°C e crescimento rápido de 12 a 28°C (BAI; SHANER, 1996). Tem sido demonstrado que a umidade e temperatura são os principais fatores que influenciam a ocorrência e severidade de epidemias de giberela, sendo que a temperatura ótima para a infecção situa-se entre 20 e 30°C (SUTTON, 1982; DEL PONTE et al., 2004). Estas condições, quando presentes antes, durante ou após o florescimento favorecem a produção de inóculo, infecção das anteras e a colonização dos grãos. (REIS, 1988; REIS et al., 1995; PARRY et al., 1995; CASA et al., 2004).

Após a infecção o fungo propaga-se pela ráquis, sendo os sintomas percebidos após alguns dias por meio da senescência prematura de espigas infectadas, podendo se expandir por toda a espiga (PARRY et al., 1995; DEL PONTE, 2004). O período de incubação, ou seja, o tempo para o aparecimento dos sintomas diminui com o aumento da concentração de esporos, aumento da temperatura e molhamento (SUTTON, 1982).

A reprodução da giberela é o processo de produção de inóculo que ocorre sobre as glumas do hospedeiro. Quando ocorre a formação de uma massa rosada de macroconídios e, mais tarde a formação de peritécios de giberela nos tecidos senescidos. Na colheita os restos culturais infectados e as sementes gibereladas retornam ao solo, servindo de fonte de inóculo para o próximo ano de cultivo ou até mesmo para futuras infecções na cultura do milho (REIS, 1988; DANIELLI et al., 2011).

2.3.3 Sintomas e Sinais

Os sintomas de giberela podem ser observados em várias partes da planta, como espigas, aristas, glumas, ráquis e pendúnculo. Os sintomas podem ser facilmente reconhecidos em espigas jovens, quando suas espiguetas exibem anasarca seguida da destruição da clorofila e com a evolução da colonização do fungo, estas se apresentam despigmentadas, de coloração palha que contrastam com o verde normal das espiguetas saudáveis. As aristas das espiguetas infectadas mostram-se brancas e arrepiadas (LIMA, 2003, REIS; CASA, 2007).

Quando a ocorrência da doença é severa com predominância de dias consecutivos com chuva, pode ocorrer a colonização da ráquis de um grupo de espiguetas, segundo Van Ginkel et al., (1996), cultivares suscetíveis apresentam maiores índices de desenvolvimento da doença na ráquis. Em ambiente quente e úmido, é possível visualizar estruturas do patógeno (sinais) como agregações de micélio e conídios de *F. graminearum* de coloração rosa claro a salmão (esporodóquios) na ráquis e nas glumas das espiguetas (Figura 2A). No caso de alta severidade o pedúnculo da espiga também escurece. Por ocasião da colheita observa-se abundante formação de peritécios sobre as glumas infectadas (LIMA 2011; REIS; CASA, 2007).

Nas espiguetas atacadas, formam-se grãos chochos, enrugados, de coloração branco-rosada a pardo-clara. Em condições climáticas favoráveis, toda espiga pode ser afetada (REIS, 1988; PARRY et al., 1995, LIMA, 2004). Os grãos infectados, conhecidos como grãos giberelados (Figura 2B) são de menor peso, delgados, enrugados e podem estar cobertos por um micélio branco, laranja claro ou rosa, ou ainda apresentar peritécios escuros (SUTTON, 1982; RIVADENEIRA, 2001). Além disto, a presença do fungo em grãos ou derivados pode indicar a presença de micotoxinas.

Muitas espécies de *Fusarium* (incluindo *F. graminearum*) produzem micotoxinas, que são substâncias químicas produzidas por fungos e que são nocivas a seres humanos e animais. Estas substâncias químicas operam na natureza afetando os mecanismos de defesa da planta ou defendendo o fungo contra outros microorganismos (SCHMALLE; BERGSTROM, 2010).

Figura 2 – (A) Agregação de micélio, sinais de *F. graminearum* em espiguetas infectadas e sintoma de escurecimento do pedúnculo. (B) Grãos de trigo sadios (esquerda) e grãos giberelados (direita).



As principais toxinas produzidas por *F. graminearum* em associação com a giberela do trigo são as toxinas do grupo dos tricotecenos como deoxynivalenol (DON), seus derivados 3 AC-DON, 15-AC DON e Nivalenol (NIV) (SCUSSEL et al., 2011).

2.3.4 Medidas de Controle

Vários fatores dificultam o controle da giberela, como a capacidade do patógeno de sobreviver saprofiticamente nos restos culturais de muitas espécies cultivadas e os propágulos do fungo serem transportados a longas distâncias pelo vento, bem como, a baixa eficiência da utilização da rotação de culturas (REIS, 1988; WIESE, 1987; BAI; SHANER, 1994, REIS et al., 2001).

Em relação à rotação de culturas para o controle de giberela em trigo, a utilização de gramíneas hospedeiras tem sido considerado um fator que contribuiu para o aumento do risco de epidemias. Um estudo de três anos conduzido em parcelas de trigo no Estado de Minnesota, EUA, indicou que a incidência de giberela foi mais alta em rotações de trigo com milho e menor no sistema soja com trigo, levando a hipótese de que o milho, além de ser hospedeiro de *G. zeae*,

apresenta maior volume de resíduo e menor velocidade de decomposição, aumentando o risco da doença (DILL-MACKY; JONES, 2000).

REIS (1990) afirma que a rotação de culturas é uma medida pouco prática para o controle da doença, devido a abundância de inóculo na Região Sul do Brasil. Tem sido evidenciado que plantios de trigo sobre resíduo de milho são um fator de risco que favorece maior incidência da doença (DILL-MACKY; JONES, 2000).

O controle pela utilização de cultivares de trigo resistentes é considerada a melhor opção de controle, entretanto, ainda com disponibilidade escassa. A resistência genética presente nas cultivares de trigo disponíveis no Brasil é insuficiente quando as condições climáticas são muito favoráveis ao desenvolvimento da doença. Em situações de alto risco, em ambiente favorável no florescimento, e levando em consideração fatores econômicos, a aplicação de fungicidas pode ser uma alternativa no controle da doença. Porém, embora se disponha de fungicidas eficientes contra o fungo, existem problemas relacionados à tecnologia de aplicação no campo, como a cobertura insuficiente dos órgãos suscetíveis da planta, as anteras, o que afeta a eficiência do controle. Ainda, o incremento dos custos de produção com aplicações sequenciais de fungicidas a partir da floração é outro fator limitante, uma vez que estas protegeriam mais eficientemente a cultura, já que a janela suscetível pode se estender por um período relativamente longo até o enchimento dos grãos (DEL PONTE, 2007).

Mesmo nos casos em que o tratamento com fungicida reduz a perda de produtividade, não reduz a contaminação por DON a níveis inferiores aos tolerados para o consumo humano (BAI; SHANER, 2004).

2.4 RESISTÊNCIA A GIBERELA EM TRIGO

A diferença no nível de resistência de cultivares de trigo à giberela tem sido identificada há vários anos (IMMER; CHRISTENSEN, 1943; BAI; SHANER, 1994). O efeito do uso de cultivares resistentes baseia-se na redução da taxa de incremento de doença, o que resultaria em menores danos (FRY, 1982). A proteção genética pelo uso de cultivares resistentes é uma das alternativas mais procuradas para o controle da enfermidade, entretanto ainda não existem cultivares de trigo com resistência completa ou imunidade a giberela (PARRY et al., 1995; BAI; SHANER,

2004). Embora diferenças na reação de cultivares ocorram, a maioria das cultivares brasileiras são suscetíveis e algumas moderadamente resistentes (INFORMAÇÕES, 2010; DALLA NORA et al., 2011).

BAI; SHANER (1994) indicam que a pesquisa para identificação de cultivares resistentes pode durar anos sem obter os resultados esperados. Estes autores comentam estudos realizados na China onde foram avaliadas mais 17000 linhas de trigo durante seis anos, encontrando apenas 32 com aceitável nível de resistência. No entanto, a maior parte destas fontes de resistência possui muitas características indesejáveis para os programas de melhoramento, tais como plantas muito altas, espigas muito pequenas e ciclo muito tardio.

Os mecanismos de resistência para o gênero *Fusarium* em trigo são classificados em morfológicos ou fisiológicos, sendo ambos os mecanismos, governados por expressão genética. Portanto, algumas características morfológicas estão associadas com o aumento da doença, como: em genótipos com aristas, pedúnculo curto e uma espiga compacta a tendência é da doença se espalhar mais rapidamente, do que em genótipos sem aristas, com pedúnculo longo, e uma espiga laxa. Além disso, os genótipos de porte baixo podem ser mais infectados do que os genótipos de porte alto (RUDD et al., 2001). OSÓRIO et al. (1998) também identificaram uma tendência das cultivares de trigo de porte baixo serem mais suscetíveis à giberela. Quanto às características de espiga verificaram tendência das cultivares com maior número de espiguetas na espiga serem menos suscetíveis e, das cultivares com maior peso de grãos por espiga serem mais suscetíveis. Salientaram então, a necessidade da adoção de métodos de melhoramento genético eficientes em quebrar correlações indesejadas para programas que buscam cultivares resistentes à giberela de porte baixo e alto rendimentos de grãos.

Ênfase especial foi dada no passado para associação da resistência a giberela com altura de planta, geralmente reportando associação negativa entre altura de planta e suscetibilidade. Entretanto, recentemente alguns artigos tem mostrado que o alelo de semi-nanismo *RhtD1b* está fortemente associado ao incremento da suscetibilidade a giberela, e não a altura de planta per se (DRAEGER et al., 2007; HOLZAPFEL et al., 2008).

O escape à infecção pode ser obtido através de cultivares cujas flores não exponham as anteras ou cujas anteras sejam expostas, porém que se desprendam em poucas horas, não permitindo sua colonização, constituindo um

mecanismo de escape por supressão do órgão suscetível. Outro mecanismo que impede a penetração é encontrado em cultivares que apresentam teores mais baixos de colina e betaína em anteras e grãos de pólen. O mecanismo relativo à restrição da colonização impede a passagem do fungo de espiguetas infectadas para o ráquis. Basicamente, havendo este mecanismo, a doença limita-se a espiguetas infectadas. O ideal para os programas de melhoramento seria obter-se cultivares que combinem fatores que condicionam a resistência ou escape a penetração com os que conferem resistência à colonização (REIS, 1988).

A resistência fisiológica envolve conseqüentemente, rotas bioquímicas envolvendo a produção de compostos que inibem o patógeno após a infecção (RUDD, 2001). Entretanto, os mecanismos bioquímicos e moleculares da resistência a giberela do trigo ainda são desconhecidos. Expressão de proteínas relacionadas à patogênese como PR-1, PR-2 (glucanase), PR-3 (quitinase), PR-4, PR-5 e peroxidase foram induzidas em linhagens de trigo resistentes e suscetíveis (BAI; SHANER, 2004).

Em função de sua natureza, MESTERHAZY (1995) descreveu os cinco mecanismos de resistência do trigo à giberela:

Tipo I: resistência à infecção inicial;

Tipo II: resistência à disseminação do fungo na espiga;

Tipo III: redução do acúmulo de DON não correlacionado com as resistências do tipo I e II;

Tipo IV: resistência dos grãos à infecção (mesmo que a espiga esteja infectada);

Tipo V: tolerância (menor perda de produtividade, mesmo com elevada infecção).

Várias metodologias têm sido desenvolvidas para avaliar e distinguir estes tipos de resistência pelos melhoristas de plantas. Os tipos de resistência I e II são os mais bem estudados, sendo que a do tipo II é considerada mais estável e a menos afetada por fatores não genéticos (BAI; SHANER, 1994).

Os programas brasileiros de melhoramento de trigo têm concentrado esforços em estudos relacionados às resistências do Tipo I, II e recentemente ao Tipo III (LIMA, 2002; DALLA NORA et al., 2011).

Estudos até então conduzidos tem indicado que em condições de epidemias severas a resistência do Tipo I é facilmente superada, e conseqüentemente a resistência do Tipo II é mais promissora para reduzir as perdas devido à infecção de giberela (MESTERHAZY, 1995).

Plantas de trigo que possuam apenas resistência do Tipo I ou do Tipo II podem aparecer como suscetíveis no campo. Quando apenas o Tipo I está presente, a espiga tem um número menor de pontos de infecção, mas a infecção é rapidamente transmitida para todas as espiguetas, e a espiga pode apresentar-se com 100% de espiguetas infectadas. Quando apenas o Tipo II de resistência está presente, um grande número de pontos iniciais de infecção pode ser observado, mas apenas as espiguetas que recebem o inóculo externo apresentam o sintoma da doença. Desta forma, reunir as resistências do Tipo I e Tipo II em cultivares deve promover um incremento de resistência a giberela em nível de campo (BAI; SHANER, 2004).

2.4.1 Fontes de Resistência

O primeiro relato de diferenças de suscetibilidade a giberela entre cultivares de trigo foi feito por Arthur (ARTHUR, 1891). Desde então esforços tem sido dispensados para encontrar fontes de resistência que possam ser utilizadas em programas de melhoramento em todo o mundo (BAI; SHANER, 2004).

Nas avaliações de grandes coleções mundiais de trigo, principalmente na China, Japão e Estados Unidos, tem sido identificadas poucas fontes de resistência ao *Fusarium* spp. As fontes de resistência mais conhecidas são provenientes do Japão (Nobeoka Bozu, Nyu Bai, Sinchunaga), da China (Sumai 3, seus derivados como Ning 7840), do Brasil (Frontana) e trigos de inverno da Europa (Arina, Renan, Praa 8, Novokrunka) (GERVAIS et al., 2003; BAI; SHANER, 2004; ZHANG et al., 2008).

Programas de melhoramento de diferentes regiões do mundo utilizam quase que exclusivamente trigos chineses como fontes de resistência. Isso demonstra que no mundo, os materiais resistentes são escassos (BAI; SHANER, 1994). No próprio CIMMYT (Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo) o progresso do melhoramento para resistência a giberela foi construído amplamente com a colaboração de cientistas chineses da Academia Chinesa de Ciências Agrícolas (CAAS). As cultivares chinesas mais utilizadas no programa do CIMMYT para transmitir resistência à giberela são: Sumai 3, Ning7840, Shangai 5, Yangmai 6, Suzhou 6, Wuhan 3 e Chuangmai 18 (SINGH; VAN GINKEL, 1997).

Para a resistência do tipo II, a principal fonte utilizada por todos os grupos de pesquisa tem sido a variedade chinesa Sumai 3, ou variedades derivadas desta, como Ning7840. Para a resistência do tipo I, a variedade Frontana tem sido utilizada com frequência nos estudos de herança e mapeamento. QTLs para resistência do Tipo I foram identificadas na cultivar Frontana, nos cromossomos 3A e 5A (STEINER, et al., 2004).

A variedade Ning7840 (derivada de Sumai 3) apresenta a mesma resistência de Sumai 3 para giberela, e possui maior potencial de rendimento, resistência às ferrugens da folha e do colmo (BAI; SHANER, 2004).

Recentemente, milhares de acessos foram também testados nos Estados Unidos (U.S. WHEAT AND BARLEY SCAB INITIATIVE), provenientes de diversos países, e aqueles com melhor resistência foram os acessos derivados de Sumai 3. Além disso, a resistência em Sumai 3 é bastante estável, uma vez que esta cultivar está sendo utilizada nos programas de melhoramento da China, e CIMMYT como fonte de resistência, a mais de 20 anos e o nível de resistência continua o mesmo (BAI; SHANER, 2004).

Alguns grupos estão recorrendo ao melhoramento por mutagenese com sucesso, como forma de produzir linhas de trigo com variabilidade para característica de resistência a giberela (CLARK et al., 2011).

Algumas espécies afins ao trigo tem sido identificadas com fontes de elevados níveis de resistência. *Aegilops squarrosa*, uma espécie diploide, foi reportada como sendo uma boa fonte de resistência quando usada como doadora do genoma D em trigos sintéticos (GILCHRIST et al., 1997; BAI; SHANER, 2004). *Triticum monococcum* (genoma A), *Aegilops speltoides* (genoma B) *Triticum timopheevi* (genoma AG), *A. cylindrica* (genoma CD), *Triticale miguschovae* (genoma AGD), *Elymus repens* (genoma StStH), e espécies tetraploides como *Triticum carthlicum* e *Tritordeum* (ABH) tem sido reportados como fontes promissoras de outros genes de resistência a giberela (FEDACK, et al., 2011). Entretanto a utilização de genes de outras espécies requerem esforços significantes e tempo para o pré-melhoramento remover suas “características selvagens” (BAI; SHANER, 2004).

2.4.2 Base Genética da Resistência

Baseado na complexidade dos mecanismos de resistência, numerosos estudos tem mostrado que a resistência a giberela é condicionada por múltiplos genes, com efeito dominante ou aditivo, cujo efeito é pequeno e fortemente afetado pelo ambiente, com resultados de baixa herdabilidade (SINGH e VAN GINKEL, 1997; BAI; SHANER, 2004).

Herança da resistência do Tipo II é a mais estável e tem sido muito estudada em trigo (BAI et al., 1989, LIU; WANG, 1991, BUERSTMAYR et al., 1999; BAI; SHANER, 2000). Pesquisas de genética clássica indicam que poucos genes de efeito maior acompanhados de alguns genes de menor efeito controlam a resistência do Tipo II com herdabilidade relativamente alta (LIU; WANG, 1991; VAN GINKEL et al., 1996, BAI; SHANER, 2004).

Nos estudos de herança utilizando populações derivadas de Sumai 3 têm sido identificados dois genes (VAN GINKEL et al., 1996), três genes (YAO et al., 1997) ou mais de três genes (YU, 1982). Locos de caracteres quantitativos (QTLs) composto por um ou mais genes como *Fhb1* foram identificados do cultivar chinês Sumai 3. VAN GINKEL et al. (1996), utilizando uma população de Ning7840 (derivada de Sumai 3) identificou também dois genes dominantes para a resistência do tipo II.

O maior efeito até então identificado ocorre com a presença gene *Fhb1* (sin: *Qfhs.ndsu-3BS*) (WHALDRON, et al., 1999), seu efeito para a resistência do tipo II tem sido relatado como explicando em torno de 20 a mais de 50% da variação fenotípica (LIU; ANDERSON, 2003; PUMPHREY, et al., 2007). A maioria dos QTLs de resistência a giberela estão localizados nos cromossomos 3BS e 5AS, entretanto, muitos QTLs em outros cromossomos foram identificados (BAI; SHANER, 2004; ANDERSON, 2007; BUERSTMAYR, et al., 2009).

A cultivar Frontana também tem sido bastante utilizada como fonte de resistência à giberela, especialmente resistência do tipo I. Frontana também produz enzimas que degradam DON (BAI; SHANER, 2004). Para a resistência do tipo I, derivada de Frontana, alguns estudos têm identificado 3 ou mais genes (SINGH et al., 1995), enquanto que outros tem identificado dois genes dominantes (VAN GINKEL et al., 1996). Estudos de herança tem indicado que a resistência de Frontana é devida a 2 ou 3 genes de efeito aditivo (STEINER et al., 2004).

Divergências no número de genes para a mesma cultivar resistente têm sido proposto por diferentes estudos (LU et al., 2001; BAI; SHANER, 2004). KOLB et al., (2001) apontaram algumas das possíveis razões para os resultados inconsistentes nas investigações, incluindo, controle poligênico da resistência a giberela em trigo, efeito dos diferentes backgrounds genéticos, diferentes tipos de resistência avaliados, interações genótipo ambiente, fontes heterogêneas de parentais resistentes ou as técnicas de inoculação utilizadas nos diferentes estudos. A tecnologia dos marcadores moleculares pode prover informações mais precisas do número e localização de QTL para a resistência a giberela (BAI; SHANER, 2004).

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE QTLS

Um QTL (*Quantitative Trait Loci* ou Locus de Caracteres Quantitativos) corresponde a uma região do DNA a qual genes com herança poligênica, de efeito menor, estão associados atuando sobre uma característica específica. Estes genes contribuem com uma parcela do efeito sobre o fenótipo, causando uma variação contínua sobre este (BROGIN, 2005).

Existem QTLs associados a uma grande variedade de características dentro de um genoma, que podem estar localizados em um mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes, e muitas vezes a influencia de um QTL sobre uma determinada característica pode ser influenciada por outro QTL. Se um pequeno número de QTLs (1-3) explicar grande parte da variação fenotípica, a característica pode ser trabalhada como se fosse qualitativa (BROGIN, 2005).

A associação entre avaliações fenotípicas e marcadores moleculares representa a principal alternativa para o conhecimento do número aproximado de locos atuando no controle dos caracteres quantitativos. Além disso, é possível determinar onde os locos encontram-se distribuídos no genoma e em que intensidade atuam sobre os caracteres (BENTO, 2006). A determinação de ligação genética entre marcadores e QTLs depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os alelos no loco do marcador e os alelos do QTL. O desequilíbrio de ligação entre dois locos ocorre quando as frequências genotípicas dos gametas diferem do produto das frequências alélicas. Esse desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador, que podem ser detectados e estimados por análises estatísticas específicas (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

A presença de ligação entre um QTL e um marcador molecular permite que os efeitos fenotípicos do caráter em estudo sejam verificados, possibilitando o uso dessa informação para a seleção (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Os métodos de avaliação de QTLs mais utilizados envolvem análises de marcas simples (que incluem análise de variância, razão de verossimilhança, teste *t* e regressão linear simples), análise de regressão linear múltipla, mapeamento por intervalo, mapeamento por intervalo múltiplo e mapeamento por intervalo composto (SILVA, 2002).

A resistência a giberela encontrada na cultivar Sumai 3, tem sido caracterizada através de mapeamento molecular, resultando na detecção de um QTL de maior efeito no cromossomo 3B que explica mais de 60% da variação fenotípica da disseminação da doença na espiga. Este QTL, *Qfsh.ndsu-3BS*, tem sido verificado por muitos grupos de pesquisa e tem se mostrado consistente em diferentes *backgrounds* e ambientes (ANDERSON et al., 2001; BUERSTMAYR et al., 2002; SHEN et al., 2003). No grupo 3BS, ANDERSON et al., (2001) identificaram o marcador Xgwm533, que explicou 25% da variação fenotípica em população obtida da linhagem ND2603. Nesta mesma região, GUO et al., (2003) identificaram o marcador microssatélite Xgwm369 e um marcador STS (SRTS.3B1), derivado de um marcador AFLP, associados com resistência. Estes marcadores estão aproximadamente ligados ao marcador Xgwm533, e juntos explicam até 50% da variação fenotípica.

Outros QTLs conferindo resistência a giberela em Sumai 3 e seus derivados tem sido reportados no cromossomo 6B (marcadores Xbarc146, Xgwm508, Xgwm191, Xgwm608, Xgwm644, Xwmc397 e Xwmc398) (WALDRON et al., 1999, ANDERSON et al., 2001; BUERSTMAYR et al., 2002; SOMERS et al., 2003.; YANG et al., 2003), 5A (marcadores Xbarc117, Xgwm508, Xgwm293, Xgwm304 e Xwmc705) (BUERSTMAYR et al., 2002; SOMERS et al., 2003) e 2A e 2B (ZHOU et al., 2003).

A identificação de QTLs promissores para uma característica de interesse é um passo importante, mas preliminar no desenvolvimento de um programa de seleção assistida por marcadores para o melhoramento genético. Os QTLs identificados devem ser validados em *backgrounds* genéticos e ambientes adicionais e não deve ter efeitos indesejáveis sobre outras características

importantes. O meio mais comum de validação de QTL é a análise de populações segregantes adicionais para confirmar a posição do QTL e contribuição fenotípica para a característica de interesse (PUMPHREY et al., 2007).

2.6 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores genéticos são conhecidos pelos melhoristas de plantas desde longa data e podem ser definidos como caracteres de herança simples e visível, cuja expressão não é influenciada por fatores ambientais. Quatro tipos de marcadores genéticos têm sido utilizados em plantas: morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares (BORÉM, 1998; RUMIN; VENCOVSKI, 2001).

Com o surgimento das tecnologias modernas da Genética e da Biologia Molecular, surgiram diversos tipos de marcadores que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA (FALEIRO, 2007). Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, correspondente a uma região expressa ou não do genoma. O princípio da utilização destes marcadores é baseado no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam na maioria das vezes, diferenças fenotípicas (BORBA, 2007; FALEIRO, 2007).

Os marcadores moleculares hoje disponíveis são utilizados nos programas de melhoramento nas etapas que envolvem a criação de variabilidade e seleção, para sinalização de genes de resistência a doenças, insetos e pragas; avaliação e caracterização de germoplasma, melhoramento de linhagens progenitoras de híbridos, introgressão gênica e seleção assistida por marcadores, mapeamento de genes e QTLs de interesse, determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam heterose, reconstituição de *pedigrees*, seleção de resistência a patógenos exóticos ainda inexistentes em determinada região, associação com caracteres quantitativos, estudos de interação genótipo-ambiente, processos legais; certificação da pureza de sementes genéticas, avaliação da pureza genética de lotes de sementes, identificação de genealogias, entre outras (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998; PEREIRA; PEREIRA, 2006; SCHUSTER et al., 2006).

De acordo com LANZA et al., (2000) a aplicação das técnicas que fazem uso dos marcadores moleculares de DNA, para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético tem como consequência grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas.

2.6.1 Tipos de Marcadores Moleculares

Os principais marcadores moleculares utilizados na análise genética de plantas são as isoenzimas, RFLPs, RAPDs, microssatélites, AFLPs e SNPs (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

As isoenzimas abrangem um grupo de múltiplas formas moleculares de uma mesma enzima ocorrente em uma espécie resultante de variações alélicas dos genes codificadores. A obtenção de marcadores isoenzimáticos envolve a preparação da amostra do tecido, a separação por eletroforese dos polimorfismos em géis de poliacrilamida ou de amido e a visualização por meio de corantes enzimáticos. O padrão de expressão das isoenzimas é de co-dominância, permitindo a diferenciação dos locos em homozigose e heterozigose (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; ALFENAS, 1998).

RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* ou Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) são fragmentos de DNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* curtos com cerca de dez nucleotídeos, que irão então se parear em diversos pontos do genoma, não exigindo o conhecimento prévio da sequência que esta sendo amplificada, portanto muitas regiões do DNA repetitivo podem ser amostradas (WILLIANS et al. 1990; CAIXETA et al., 2006). Estes marcadores RAPD são dominantes, não sendo possível distinguir indivíduos homozigotos dominantes de indivíduos heterozigotos em uma população, pois apenas um alelo é detectado pela amplificação do fragmento (CAIXETA et al., 2006). Outra desvantagem da técnica refere-se à baixa reprodutibilidade das marcas devido a sensibilidade às condições experimentais. Esta limitação pode ser contornada com o desenho de *primers* específicos SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions* ou Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequências) a partir do sequenciamento de um determinado primer RAPD ligado a uma característica de interesse do geneticista (PARAN; MICHELMORE, 1993; FALEIRO, 2007).

O marcador de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) são fragmentos gerados pela digestão do DNA com enzimas de restrição, resultando fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Essas diferenças ou polimorfismos entre indivíduos podem ocorrer principalmente devido à mutação de ponto, inserções e inversões (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2006). Estes fragmentos serão detectados por sondas específicas, que vão se parear ou hibridar a estas sequências complementares do DNA do indivíduo em estudo, sendo as sondas marcadas por radiatividade ou fluorescência para visualização. Este tipo de marcador é co-dominante e possui alta reprodutibilidade, entretanto, necessita de grande quantidade e qualidade do DNA a ser analisado (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007).

Marcadores Microsatélites também denominadas SSR (*Simple Sequence Repeats* ou Sequência Simples Repetidas ou Sequências de DNA Microsatélites) têm sido um dos mais utilizados nos programas de melhoramento de plantas e é baseado na técnica de PCR. Os microsatélites consistem de unidades núcleo de 2-5 nucleotídeos tais como (CA), (ATT) ou (ATGT) que são repetidas em tandem no genoma (LITT; LUTY, 1989). As repetições em tandem destas pequenas sequências podem ocorrer de dezenas a centenas de vezes. As regiões que flanqueiam um microsatélite são geralmente únicas e conservadas entre genótipos da mesma espécie e *primers* são construídos para estas regiões e utilizados para amplificar fragmentos de DNA contendo o microsatélite. Polimorfismo de comprimento é criado quando produtos de PCR de diferentes alelos variam no comprimento, como resultado da variação do número de unidades repetidas no microsatélite, podendo então ser analisados por eletroforese em gel de acrilamida ou gel de agarose. O alto nível de informação e a co-dominância de marcadores microsatélites, sua grande ocorrência em genomas eucarióticos e sua fácil amplificação via tecnologia padrão de PCR, tornou os microsatélites marcadores preferidos para várias espécies (LANZA et al, 2000; FALEIRO, 2007). Marcadores microsatélites têm sido amplamente utilizados em estudos de herança, mapeamento molecular de locos para caracteres quantitativos (QTLs) e genes de resistência e seleção assistida de linhagens e cultivares de trigo com resistência a giberela (ANDERSON, 2007; BUERSTMAYR et al., 2009).

O marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) baseia-se na obtenção e análise de fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição, seguidos da ligação por oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva via PCR. Este tipo de marcador combina os princípios do RAPD e RFLP, contudo, menos laborioso que RFLP e com melhor resolução e eficiência que RAPD (CARPENTIERI-PIPOLLO et al., 2006; FALEIRO, 2007). Estas características fazem com que o AFLP seja muito utilizado em mapeamento genômico (XU et al., 2005), seleção de genitores para programas de melhoramento (GORAL et al., 2005), diversidade genética, entre outros (TAKAMI et al., 2004).

Polimorfismo de única base ou *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) são marcadores moleculares do DNA utilizados para identificar mutações e polimorfismos, baseados na posição de um único nucleotídeo (FALEIRO, 2007). Os SNPs são fontes abundantes de variação genética, sendo gerados por substituição de uma única base ou pequenos eventos de inserção ou deleção. As mutações mais comuns são as chamadas transições, nas quais ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A – G), ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C – T). Mutações menos frequentes chamadas de transversões ocorrem quando existe a troca de pirimidina por uma purina ou vice-versa (A - C, A - T, G - C e G - T) (CAETANO, 2009). SNP's são marcadores bi-alélicos, ou seja, normalmente são detectados apenas dois variantes. Sendo assim, o conteúdo de polimorfismo detectado é menor quando comparado com o polimorfismo detectado por marcadores microssatélite (SSR), que são multialélicos (CAETANO, 2009).

A disponibilidade e facilidade de buscar sequências de genes nos bancos de dados fez com que uma grande quantidade de marcadores SNP's pudesse ser desenvolvida. Os marcadores SNP's são uma fonte inesgotável de marcadores polimórficos para estudo de associação baseados em genes candidatos. Tal polimorfismo pode ser usado para o desenho de marcadores próximos ou até mesmo dentro do próprio gene de interesse (FALEIRO, 2007; GUIMARÃES et al., 2007).

2.6.2 Seleção Assistida por Marcadores Moleculares

Para que os marcadores moleculares sejam utilizados nos programas de melhoramento, eles devem ser eficientes e econômicos. Na maior parte das vezes em que os marcadores moleculares são utilizados no melhoramento de plantas, eles complementam os métodos tradicionais de melhoramento, dando-lhes um refinamento, e aumentando as chances de sucesso. A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) deve ser vista, então, como um suplemento aos métodos convencionais de melhoramento (SCHUSTER; OLIVEIRA, 2006).

Deve-se considerar critérios práticos para efetivamente implementar a utilização de SAM num programa de melhoramento, como: eficiência ou ganho comparado a seleção fenotípica, utilidade dos marcadores em populações relevantes e o custo, o rendimento e a expertise requerida (ANDERSON et al., 2007).

A utilização como rotina da seleção assistida para características de interesse em programa de melhoramento deve considerar que o gene ou QTL já tenha sido previamente mapeado, a natureza qualitativa ou quantitativa da característica, o modo de ação gênica, o efeito do gene na expressão do fenótipo, a complexidade da avaliação do fenótipo e a eficiência com que o marcador pode discriminar a característica já tenham sido discriminados (GUIMARÃES et al., 2006).

Recentemente, numerosos projetos de mapeamento molecular da resistência a giberela em trigo têm sido desenvolvidos por grupos de pesquisa em todo mundo abrindo o caminho para a SAM. Nestes casos, é praticada a seleção com base em marcas genéticas típicas dos genes ou QTLs de resistência (BUERSTMAYR et al., 2009).

Marcadores moleculares podem ajudar melhoristas a selecionar genes que conferem resistência a giberela em trigo. A base deste conceito é que as diferenças que naturalmente ocorrem na sequência do DNA em variedades de trigo são identificadas como sendo geneticamente ligadas a um gene que confere resistência a giberela. Estas diferenças no DNA podem ser devido à diferença no número de unidades repetidas na sequência (microsatélites - SSR), pela inserção ou deleção de um segmento do DNA ou pela diferença de um único par de bases (polimorfismo de um único nucleotídeo – SNP). A maioria dos marcadores em trigo

atualmente são microssatélites baseados na técnica de PCR (ANDERSON, et al., 2007).

No caso ideal, marcadores perfeitos que possam predizer a presença ou ausência de um alelo desejado em um loco de resistência são preferíveis, mas estes não são disponíveis para a maioria dos QTLs que conferem resistência a giberela já conhecidos (BUERSTMAYR et al., 2009).

Recentemente, houve muito progresso no melhoramento de cereais de inverno, especialmente trigo e cevada para resistência a giberela (KOSOVÁ et al., 2009). Na revisão sobre mapeamento de QTLs, BUERSTMAYR et al., (2009) sumarizaram mais de 52 estudos mostrando que nos últimos 10 anos com a disponibilidade de marcadores moleculares e mapas genéticos mais de 100 QTLs para a resistência a giberela foram identificados, incluindo 22 regiões de cromossomos independentes detectados em diferentes germoplasmas. Com os marcadores ligados a estes QTLs a seleção assistida para a resistência a giberela torna-se viável (XUE et al., 2010).

2.6.3 Validação de Marcadores Moleculares Associados à QTLs

Segundo YUE et al., (2001) mesmo quando um único gene controla a característica, não há garantia que os marcadores de DNA identificados em uma população serão úteis em populações diferentes, principalmente quando as populações são originadas de germoplasma pouco relacionados. Além disso, os marcadores devem revelar polimorfismos em diferentes populações derivadas de uma ampla variação de genótipos parentais para serem mais úteis nos programas de melhoramento (LANGRIDGE et al., 2001).

Para o uso efetivo da SAM, os marcadores associados à QTLs, antes de serem utilizados nos programas de melhoramento, devem ser validados, isto é, deve-se testar sua efetividade na determinação do fenótipo alvo em populações independentes e em diferentes *backgrounds* genéticos (COLLARD et al., 2005; ALZATE-MARIN et al., 2005).

A identificação de QTLs necessita de boa qualidade dos dados fenotípicos, de grandes populações avaliadas, de verificação independente em populações paralelas para se determinar a significância de uma QTL e sua confirmação em vários *backgrounds* genéticos (SILVA, 2006).

3 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005.
- ALFENAS, A. C. 1998. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG. 574p.
- ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase no feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, vol:30, n.4, p.333-342, 2005.
- AMORIM, L. Ciclos de doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo. Ceres, p. 325-330. 1995.
- ANDERSON, J. A.; STACK, R. W.; LIU, S.; WALDRON B. L.; FJELD A.D.; COYNE C.; MORENO-SEVILLA B.; FETCH J. M.; SONG Q. J.; CREGAN P. B.; FROHBERG R. C. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations. **Theoretical Applied Genetics**. Vol: 102, p. 1164-1168. 2001.
- ANDERSON, J. A. Marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat. **Int. Journal of Food Microbiol.** v.119, p.51-53. 2007.
- ANGELLOTTI, F.; TESSMANN, D. J.; ALBUQUERQUE, T. C.; VIDA, J. B.; FILHO D. S. J.; HAKAKAVA, R. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticales no sul do Brasil. **Summa Phytopathologica** 32: 177-79. 2006
- ARTHUR, J. C. Wheat scab. Indiana. **Agric. Exp. St. Paul**: v. 36, p.192-232, 1891.
- ATANASOFF, D. Fusarium-blight (scab) of wheat and other cereals. **Journal of Agricultural Research**. v. 20, p.1-4. 1920.
- BAI, G.H.; ZHOU, C.F.; QIAN, C.M.; GEY, F. A study of scab-resistance in new wheat cultivars and advanced lines. **Jiangsu Agric. Sci.** Vol: 7, p.20-22. 1989.
- BAI, G.H.; SHANER, G. Scab of wheat: Prospects for control. **Plant Disease**, 78:760-766, 1994.
- BAI G.H.; PLATTNER, R.; SHANER, G.E.; KOLB, F.L. A QTL for deoxynivalenol tolerance in wheat. **Phytopathology** v.90(6):S4. 2000.
- BAI, G.H.; SHANER, G. Management and resistance in wheat and barley to Fusarium head blight. **Annual Review Phytopathology**, 42:135-161, 2004.
- BAN, T. Review – studies on the genetics of resistance to fusarium head blight by *Fusarium graminearum* in wheat. **Proceedings...** International symposium on wheat improvement for scab resistance, Suzhou and Nanjing. China: 2000, p. 82-93.

BENTO, D.A.V. **Mapeamento de QTLs para a produção de grãos e seus componentes em uma população de milho tropical. 2006.** 133 f. Tese (Doutorado – Genética e melhoramento de plantas) – Escolar Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

BORBA, V.S. **Marcadores Moleculares.** Disponível em: <<http://www.ufv.com.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL005.htm>>. Acesso em 10 dezembro de 2011.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas.** 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. 453p.

BROGIN, R.L. Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja, **Ph. D. Thesis**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2005.

BRUM, A.L.; HECK, C.R. A economia do trigo no Rio Grande do Sul: Breve histórico do cereal na economia do estado. **Revista Análise**, Porto Alegre, v.16, n.1, p.29-44. 2005.

BUERSTMAYR, H.; LEMMENS, M.; FEDAK, G.; RUCKENBAUER, P. Back-cross reciprocal monosomic analysis of *Fusarium* head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical Applied Genetics**. Vol: 98, p.76-85, 1999.

BUERSTMAYR, H.; LEMMENS, M.; HARTL, L.; DOLDI, L.; STEINER, B. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). **Theoretical Applied Genetics**. Vol:104 (1), p.84–91, 2002.

BUERSTMAYR, H.; BAN, T.; ANDERSON, J.A. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. **Plant Breeding**, 128, p. 1-26, 2009.

CAETANO, A.R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **R. Bras. Zootec.**, 38:64-71, 2009.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B de; BRITO, G. G. de; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. (Eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: p.9-78, 2006.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V. GARCIA, J.E., RINALDI, D.A. Desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares. In: Carpentieri-Pípulo V. (Ed) **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: COODETEC. 392p. 2006.

CASA, R.T., REIS, E.M., BLUM, M.M.C., BOGO, A., SCHEER, O. ZANATA, T. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira** 29:289-293. 2004.

CASA, R.T.; CASTRO, R.L.; OLIVEIRA, F.S.; OLIVEIRA, M.A.; CAMARGO, F.C.; VANDRESSEN, P.B. Intensidade de giberela em cultivares de trigo. **Tropical Plant Pathology** 35: 136, 2010.

CASA, R.T.; KUHNE JUNIOR, P.R. Danos causados nos hospedeiros. In: REIS, E.M. (Ed) Seminário sobre giberela em cereais de inverno. **Coletânea de Trabalhos**. Passo Fundo: Berthier, p.264. 2011.

CASTRO, P.R.C; KLUGE, R.A. **Ecofisiologia de cultivos anuais: trigo, milho, soja, arroz e mandioca**. São Paulo: Livraria Nobel S.A., 1999.

CLARK, A.; FINNESETH, C.; VAN SANFORD, D. Mutation Breeding for Fusarium Head Blight Resistance. In: **Proceedings of the 2011 National Fusarium Head Blight Forum**. U.S. Wheat & Barley Scab Initiative. St, Louis. Missouri, USA. 2011.

COLLARD, B.C.Y; JAHFER, 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.

CUTHBERT P.A.; SOMERS, D.J.; THOMAS, J.; CLOUTIER, S.; BRULÉ-BABEL, A. Fine mapping FHB1, a major gene controlling fusarium head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical Applied Genetics**. Vol:112, p.1465-1472, 2006.

CONAB. **Indicadores agropecuários**. Disponível em: www.conab.gov.com. Acesso em: janeiro 2012.

COSTA NETO, K. P. **Parasitas de plantas cultivadas no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio. 1947.

DALLA NORA, T.; FRANCO, F.A.; CANTERI, M.G. Progresso no melhoramento genético de trigo visando a resistência a giberela. In: REIS, E.M. (Ed) Seminário sobre giberela em cereais de inverno. **Coletânea de Trabalhos**. Passo Fundo: Berthier, p.264. 2011.

DANIELLI, A.L.D; CAMERA, J.; CERBARO, L. Ciclo da doença em trigo. In: REIS, E.M. (Ed) Seminário sobre giberela em cereais de inverno. **Coletânea de Trabalhos**. Passo Fundo: Berthier, p.264. 2011.

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

DEL PONTE, E. M. Fontes de contaminação. **Cultivar Grandes Culturas**. Ano IX nº100. Setembro, p. 26-28. 2007.

DILL-MACKY, R.; JONES, R.K. The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. **Plant Disease**, 84:71-76. 2000.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.

DRAEGER, R.; GOSMAN, N.; STEED, A.; CHANDLER, E.; THOMSETT, SRINIVASACHARY, M.; SCHONDELMAIER, J.; BUERSTMAYR, H.; LEMMENS, M.; SCHMOLKE, M.; MESTERHAZY, A.; NICHOLSON, P. Identification of QTLs for

resistance to *Fusarium* head blight, DON accumulation and associated traits in the winter wheat variety Arina. **Theoretical Applied Genetics**. Vol:115, p.617-625, 2007.

ENCONTRO TÉCNICO 5. Novas tecnologias em trigo / COODETEC / BAYER CropScience. **Anais**. Cascavel-PR: COODETEC / BAYER CropScience, 110p. 2003.

ENGLE, J.S.; LIPPS, P. E.; GRAHAM, T.L.; BOEHM, M.J. Effect of floral structure extracts and endogenous compounds on the growth of *Fusarium graminearum*. **Anais**, Fusarium Head Blight Forum, Erlanger, KY, USA, 2002. pp.151-153.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina. DF: Embrapa Cerrados, 102p. 2007.

FEDAK, G.; CAO, W.; CHI, D.; SOMERS, D.; MILLER, S.; OUELLET, T., XUE, A. GILBERT, J.; SAVARD, M.; VOLDENG, H. New Sources of Resistance to Fusarium Head Blight and their Mode of Action. In: **Proceedings of the 2011 National Fusarium Head Blight Forum**. U.S. Wheat & Barley Scab Initiative. St. Louis. Missouri, USA. 2011.

FERNANDES, J. M.; PICCININI, E. C. Controlando as doenças de trigo na hora certa. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. (**Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 22**). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co22.htm>. Acesso em janeiro/2012.

FERNANDEZ, M.R.; FERNANDES, J.M.C. Survival of wheat pathogens in wheat and soybean residues under conservation tillage systems in southern and central Brazil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.12, p.289-294. 1990.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20). 1998.

FRY, W.E. Epidemiology: dynamics of interacting pathogen and host populations. In: Fry, W.E. (Ed.). **Principles of plant management**. New York, Academic Press. 1982. pp.43-65.

GALICH, M. T. Importancia y difusion de la fusariose del trigo em Argentina. In: KOHLI, M. M. (Ed.) **Taller sobre la fusariosis de la espiga en America del Sur**. México. Cimmyt. 1989, p. 7-26.

GARCIA, J.R.D. *Fusarium graminearum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.): detecção, efeitos e controle. 78p. **Tese (Doutorado)** – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

GERVAIS L.; DEDRYVER, F.; MORLAIS, J.Y.; BODUSSEAU, V.; NEGRE, S.; BILOUS, M.; GROOS, C.; TROTET, M. Mapping of quantitative trait loci field resistance to *Fusarium* head blight in a European winter wheat. **Theoretical Applied Genetics**. Vol:106, p.961-970, 2003.

GILCHRIST, L.; RAJARAM, S.; MUJEEB-KAZI, A., VAN GINKEL, M.;VIVAR,H. Fusarium scab screening program at CIMMYT. In: DUBIN, H.J.; GILCHRIST, L.;

REEVES, J.; MC-NAB, A. Eds. 1997. **Fusarium Head Scab: Global Status and Future Perspectives**. Mexico, DF: CIMMYT. 130 p. 1997.

GORAL, H.; TYRKA, M.; SPISS, L. Assessing genetic variation to predict the breeding value of winter triticale cultivars and lines. **Theoretical Applied Genetics**. v. 46, p.125-131, 2005.

GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J.V. de; SOUZA Jr, C.L. de. Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG: UFV, Cap. 4, p. 107-144. 2006.

GUIMARÃES, E.P.; RUANE, J.; SCHERF, B.D.; SONNINO, A.; DARGIE, J.D. **Marker-assisted selection**. Roma: Editora Food and agriculture organization of the united nations, 494p. 2007.

GUO, P. G.; BAI, G.H.; SHANER, G.E. AFLP and STS tagging of a major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. **Theoretical Applied Genetics**. Vol:106, p.1011-1017. 2003.

HANDA, H.; NAMIKI, N.; XU, D.; BAN, T. Dissecting of the FHB resistance QTL on the short arm of wheat chromosome 2D using a comparative genomic approach: from QTL to candidate gene. **Molecular Breeding**, vol. 22, p. 71-84. 2008.

HOLZAPFEL, J.; VOSS, H.H.; MIEDANER, T.; KORZUN, V.; HÄBERLE, J.; SCHWEIZER, G.; MOHLER, V.; ZIMMERMANN G.; HARTL, L. Inheritance of resistance to Fusarium head blight in three European winter wheat populations. **Theoretical Applied Genetics**. Vol:117, p.1119-1128. 2008.

IMMER, F.R.; CHRISTENSEN, J.J. Studies on susceptibility of varieties and strains of barley to *Fusarium* and *Helminthosporium* kernel blight when tested under muslin tents or in nurseries. **Journal American Society Agronomy** 35:515-522, 1943.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS PARA TRIGO E TRITICALE. Safra 2011. COODETEC. Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 170p. 2010.

KOLB, F.L.; BAI, G.H.; MUEHLBAUER, G.J.; ANDERSON, J.A.; SMITH, K.P.; FEDAK, G. Host plant resistance for Fusarium head blight: Mapping and manipulation with molecular markers. **Crop Science**, 41:611-619, 2001.

KOSOVÁ, K.; CHRPOVÁ, J.; ŠÍPCEREAL, V. Resistance to Fusarium Head Blight and Possibilities of its Improvement through Breeding. **Czech J. Genet. Plant Breed**. V.45, (3): p.87–105. 2009.

LANGRIDGE, P.; LAGUDAH, E.S.; HOLTON, T.A.; APPELS, R.; SHARP, P.J.; CHALMERS, K.J. Trends in genetic and genome analysis in wheat: a review. **Aust J Agric Res**. Vol: 52, p.1043–1077, 2001.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.204, p. 97-108, 2000.

LEONARD, K.J.; BUSHNELL, W.R., (Eds.) **Fusarium Head Blight of Wheat and Barley**. St Paul, MN: **APS Press**. p.512, 2003.

LIANG, X., CHEN, X. & CHEN, C. Factors affecting infection of some winter wheat cultivars to scab disease caused by *Fusarium graminearum*. **Acta Phytopathologica Sinica** 11:7-12. 1981.

LIMA, M. I.P.M.; FERNANDES, JOSÉ M.C. Avaliação da resistência à giberela em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, vol.25, n. 1. p. 30-35, 2000.

LIMA, M.I.P.M; FERNANDES, J.M.C. Avaliação da resistência à giberela de genótipos de cereais de inverno. Embrapa – Trigo, Passo Fundo/RS. **Fitopatologia Brasileira**, 27 (1), p. 104, jan-fev. 2002.

LIMA, M.I.P.M. Estádios de suscetibilidade de espigas de trigo a giberela. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.296, 2003. Suplemento.

LIMA, M.I.P.M. Giberela ou Brusone? Orientações para a identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 56 p. 2004.

LIMA, M.I.P.M. Sintomas e sinais de giberela em trigo, cevada e triticale. In: REIS, E.M. (Ed) Seminário sobre giberela em cereais de inverno. **Coletânea de Trabalhos**. Passo Fundo: Berthier, p.264. 2011.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398:401, 1989.

LIU, Z.Z. Recent advances in research on wheat scab in China. In: International Symposium on wheats for more tropical environments, Mexico, 1984. **Proceedings**. Mexico. CIMMYT, 1995.

LIU, Z.Z.; WANG, Z.Y. Generality of scab-resistance transgression in wheat and utilization of scab-resistance genetic resources. **Acta Agric Shanghai (Suppl)** Vol: 7, p.65–70, 1991.

LIU, S.; ANDERSON, J. A. Marker assisted evaluation of Fusarium head blight resistant wheat germplasm. **Crop Science**. Vol.43: p. 760-766, 2003.

LIU, S.; HALL, M.D.; GRIFFEY, C. A.; MCKENDRY, A.L. Meta-Analysis of QTL Associated with Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. **Crop Science**. Vol. 49: p. 1955–1968, 2009.

LU, W.Z.; CHEN, S.H.; WANG, Y.Z. Eds. Research on Wheat Scab. Beijing, China: **Sci. Publ. House**, 2001.

LÖFFLER, M.; SCHON, C.C.; MIEDANER, T. Revealing the genetic architecture of FHB resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) by QTL meta-analysis. **Molecular Breeding**, vol. 23: p.473–488. 2009.

- MAULER-MACHNIK, A.; ZAHN, K. Ear fusarioses in wheat – new findings on their epidemiology and control with Folicur. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, v.47. n.2, p. 129-155, 1994.
- McMULLEN, M., JONES, R. ; GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. ***Plant Disease***, v.81, n.12, p. 1340-1348, 1997.
- McNEW, G.L. The nature, origin, and evolution of parasitism. In: HORSFALL, J.G.; DIMOND, A.E. (Eds.) ***Plant Pathology***, New York. Academic Press, v.2, p 2-66. 1960.
- MESTERHAZY, A. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. ***Plant Breeding***. Vol:114, p.377–386, 1995.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. ***Proceedings of National Academy of Science-USA***, v.88, p. 9828-9832, 1991.
- MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. ***BIOTECNOLOGIA Ciência e Desenvolvimento***, v.5, p.14-17, 1998.
- MUNDSTOCK, C.M. ***Cultivo dos cereais de estação fria: trigo, cevada, aveia, centeio, alpiste, triticale***. Porto Alegre: (s.n), 265p. 1983.
- MOSCHINI, R. C.; FORTUGNO, C. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. ***European Journal of Plant Pathology***, v.102, p. 211-218, 1996.
- OPENSHAW, S.J.; JARBOE, S.G.; BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium, 2, Corvallis ***Proceedings...*** Corvallis: Oregon State University, 1994.
- OSÓRIO, E. A., PIEROBOM, C. R., LUZZARDI, G. C.; FRANCO, L. B. Correlação de suscetibilidade à giberela com caracteres da planta 147 de trigo. ***Revista Brasileira de Agrociência***, v.2 n.2, 111-114 Mai.- Ago., 1998
- PANISSON, E. Giberela em trigo: Intensidade, danos e controle químico. ***(Dissertação de mestrado em Agronomia)***. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, RS. 174p. 2001.
- PANISSON, E., REIS, E.M. & BOLLER, W. Quantificação de propágulos de giberela no ar e infecção de anteras em trigo. ***Fitopatologia Brasileira***, v. 27, p. 489-494, 2002.
- PANISSON, E., REIS, E.M. & BOLLER, W. Quantificação de danos causados pela Giberela em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. ***Fitopatologia Brasileira***, v. 28, p.189-192. 2003.
- PARAN, I.; KESSELI, R. e MICHELMORE, R.W. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to

downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. **Genome**, v.34, p. 1021-1027, 1991.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical Applied Genetics**. Vol:85, p.985-993, 1993.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; McLEOD, L. Fusarium head blight (scab) in small grain cereals – a review. **Plant Pathology**, v. 44, p. 07- 238, 1995.

PEREIRA, M. G. e PEREIRA, T. N. S. Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. (Eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, p.85-106, 2006.

PUGH, G.W., JOHANN, H. & DICKSON, J.G. Factors affecting infection of wheat heads by *Gibberella saubinetii*. **Journal of Agricultural Research** 46:771-797. 1933.

PUMPHREY, M.O.; BERNARDO, R.; ANDERSON, J.A. Validating the Fhb1 QTL for fusarium head blight resistance in nearisogenic wheat lines developed from breeding populations. **Crop Science** 47:200–206. 2007.

REIS, E. M. **Doenças do trigo III – Giberela**. 2ed revisada e ampliada, 1988, 13p.

REIS, E.M. Effects of rain and relative humidity on the release of ascospores and on the infection of wheat heads by *Gibberella zeae*. **Fitopatologia Brasileira** 15:339-343. 1990.

REIS, E.M.; SANTOS, H.P. Interações entre doenças de cereais de inverno e sistema plantio direto. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (Passo Fundo,RS). **Plantio Direto no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa CNPT/FUNDACEP FECOTRIGO/ Fundação ABC/Ed. Aldeia Norte, p.105-110. 1993.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; FORCELINI, C. A. Doenças do trigo. In: KIMATI *et al.* **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 3. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 1995, 2v:il., p. 725- 736.

REIS, E. M.; BLUM, M. M. C.; CASA, R. T.; MEDEIROS, C. A. Grain losses caused by the infection of wheat heads by *Gibberella zeae* in southern Brazil, from 1984 to 1994. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 134-137,1996.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Patologia de sementes de cereais de inverno**. Aldeia Norte Editora. 1998, 88p.

REIS, E.M., CASA, R.T. & MEDEIROS, C.A. **Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno**. Londrina, PR. ES Comunicação S/C Ltda. 2001.

REIS, E. M.; **Previsão de doenças de plantas**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 316p. 2004.

REIS, E.M.; CASA R. T. **Doenças dos cereais de inverno: diagnose, epidemiologia e controle**. 2. Ed. Lages: Graphel, 176p. 2007.

- RIVADENEIRA, M. Variabilidade de *Fusarium* spp. agente etiológico de giberela em trigo e identificação de fontes de resistência à fusariose da espiga em trigos sintéticos. Passo Fundo/RS, 71f. (**Dissertação de mestrado em Agronomia**). Passo Fundo/RS, 2001.
- RUDD, J.C.; HORSLEY, R.D.; MCKENDRY, A.L.; ELIAS, E.M. Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: I. Sources mechanisms and utility in conventional breeding systems. **Crop Science** 41:620-627, 2001.
- RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, v.40, p. 442-450, 1997.
- RUMIN, G.C.R.; VENCOVSKI, R. Índice baseado em RFLPs para seleção de linhagens visando sintéticos de milho. **Scientia Agricola**, v.28, n.2. Piracicaba, 2001.
- SAMBROOCK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**, 2nd Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, V. 3, 1989.
- SCHMALE III, D.G., BERGSTROM, G.C. **Fusarium head blight in wheat. The Plant Health Instructor. 2003**. Updated 2010. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Fusarium.aspx>>. Acesso em: 15/12/2011.
- SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; PADILHA, L. Marcadores moleculares no pós-melhoramento. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. (Eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, p.205-230, 2006.
- SCHUSTER, I.; OLIVEIRA, M.A.R. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas. In: Carpentieri-Pípolo V. (Ed) **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: COODETEC. 392p. 2006.
- SCUSSEL, V.M.; BEBER, M.; TONON, K.M. Efeitos da infecção por *Fusarium/Gibberella* na qualidade e segurança dos grãos, farinhas e produtos derivados. In: REIS, E.M. (Ed) Seminário sobre giberela em cereais de inverno. **Coletânea de Trabalhos**. Passo Fundo: Berthier, p.264. 2011.
- SHEN, X.R.; ZHOU, M.; LU, W.; OHM, H. Detection of *Fusarium* head blight resistance QTL in a wheat population using bulked segregant analysis **Theoretical Applied Genetics**. Vol:106, p.1041–1047, 2003.
- SILVA, A. R. Análise genética de caracteres quantitativos em milho com o delineamento III e marcadores moleculares. 2002. 143 f. **Tese (Doutorado – Genética e melhoramento de plantas)** – Escolar Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2002.
- SILVA, M. F. Mapeamento e validação de QTLs de resistência ao nematoide de cisto da soja. 2006. 110 f. **Tese (Doutorado – Genética e melhoramento de plantas)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2006.

SINGH, R.P.; MA, H.; RAJARAM, S. Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Fontana. **Plant Disease**. Vol:79, p.238-240,1995.

SINGH, R.P.; VAN GINKEL, M. Breeding strategies for introgressing diverse scab resistance into adapted wheat. In: DUBIN,H.J.; GILCHRIST, L.; REEVES, J.; MC-NAB,A. Eds. 1997. **Fusarium Head Scab: Global Status and Future Perspects**. Mexico,DF: CIMMYT. 130 p. 1997.

STEINER, B.; LEMMENS, M.; GRISSER, M.; SCHOLZ, U.; SCHONDELMAIE, J.; BUERSTMAYR, H. Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. **Theoretical Applied Genetics**.Vol:109, p.215-224, 2004.

SOMERS, D.J.; FEDAK, G.; SAVARD, M. Molecular mapping of novel genes controlling Fusarium head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat. **Genome**, 46:555-564, 2003.

SOUZA,V.C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2ª Ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, p. 238-270. 2008.

STACK, R.W.; MCMULLEN, M. **A visual scale to estimate severity of Fusarium head blight in wheat**. Extension Publication PP-1095. North Dakota State University Extension Service. 1995.

STRANGE, R.N.; MAJER, J.R.; SMITH, H. The isolation and identification of coline and betaine as two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. **Physiol. Plant Pathology**, v.4, p.277-290, 1974.

SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize era rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal Plant Pathology**. v.4, n.2. p. 195-209. 1982.

TAKAMI, Y., KOSHIO,C.; ISHII, M.; FUJII, H.; HIDAKA, T.; SHIMIZU, I. Genetic diversity and structure of urban populations of Pieris butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. **Molecular Ecology**, Oxford, v.13, n.2, p. 245-258, 2004.

USDA - United States Department of agriculture. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/home/reports.asp>>. Acesso em: janeiro 2012.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids**. v.18(22): p.6532-6535, 1990.

VAN GINKEL, M.; VAN DER SHAAR, W.; ZHUPING, Y.; RAJARAM, S. Inheritance of resistance to scab in two wheat cultivars from Brazil and China. **Plant Disease** 80:863-867, 1996.

WALDRON, B. L.; MORENO-SEVILLA, B.; ANDERSON, J. A.; STACK, R. W.; FROHBERG, R. C. RFLP mapping of QTL for fusarium head blight resistance in wheat. **Crop Science**. Vol: 39, p. 805-811, 1999.

WIESE, M. V. **Compendium of wheat diseases**. American Phytopathological Society. St. Paul. 2ed. 1987.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBLECLIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALKI, J. A.; TINGEY, S.V. DNA amplified by arbitrary primers are useful as a genetic marker. **Nucleic Acids Research**, vol. 18, p.6531-6355, 1990.

WINDELS, C.E. Economic and social impacts of Fusarium Head Blight: Changing farms and rural communities in northern great plains. **Phytopathology**, v. 90: p. 17-21. 2000.

XU, X.Y.; BAI, G.H.; CARVER, B.F.; SHANER, G.E.; HUNGER, R.M. Mapping of QTLs prolonging the latent period of *Puccinia triticina* infection in wheat. **Theoretical Applied Genetics**. Berlin, v.110, n.2, p. 244-251, 2005.

XUE, S.; LI, G.; JIA, H.; LIN, F.; CAO, Y.; XU, F.; TANG, M.; WANG, Y.; WU, X.; ZHANG, Z.; KONG, Z.; MA, Z. Marker-assisted development and evaluation of near-isogenic lines for scab resistance QTLs of wheat. **Molecular Breeding**, v. 25: p. 397-405. 2010.

YANG, Z.P.; GILBERT, J.; SOMERS, D.J.; FEDAK, G.; PROCUNIER, J.D.; MCKENZIE, I.H. Marker assisted selection of Fusarium head blight resistance genes in two double haploid population of wheat. **Molecular Breeding**, 12:309-317, 2003.

YAO, J.B.; GE, Y.F.; WANG, S.W.; YAO, G.C.; ZHOU, C.F.; QIAN, C.M. Chromosomal location of genes for scab resistance in wheat cultivar Sumai 3. **Acta Agron. Sin.** Vol:23, p.450-53, 1997.

YU, Y.J. Monosomic analysis for scab resistance and yield components in the wheat cultivar Soom-mo 3. **Cereal Res. Com.** Vol:10, p.185-189, 1982.

YUE, P., ARELLI, P.R.; SLEPER, D.A. Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI438489B. **Theoretical Applied Genetics**. Vol: 102, p.921-928, 2001.

YUYAMA, M.M.; HENNING, A.A. **Ocorrência de *Fusarium* do grupo *Roseum* em sementes de soja: levantamento e identificação da espécie**. Congresso Brasileiro de Soja, 1999. Anais... Londrina: Embrapa Soja, p. 454. 1999.

ZHANG, X.J.; JIN, Y.; RUDD, J., BOCKELMAN, H.E. New fusarium head blight resistance spring wheat germplasm identified in the USDA National Small Grain Collection. **Crop Science**. 48:223-235. 2008.

ZHOU, W-C.; KOLB, F.L.; BAI, G-H.; DOMIER, L.L.; BOZE, L.K.; SMITH, N.J. Validation of major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker assisted selection in wheat. **Plant Breeding**, 122:40-46, 2003.

4 VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES E QTLs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A GIBERELA EM TRIGO

RESUMO

Visando validar marcadores moleculares e mapear QTLs associados à resistência a Giberela (*Fusarium graminearum*) foram obtidas 3 populações $F_{2:3}$ de trigo (*Triticum aestivum* L.) provenientes dos cruzamentos entre Frontana x Weebil, Ning 7840 x Frontana e Ning 7840 x Kosoro. As populações foram fenotipadas para resistência à infecção inicial, Tipo I, em campo e de disseminação, Tipo II, em casa de vegetação. Para identificar os marcadores moleculares associados à resistência à giberela foram analisados os marcadores amplificados e os dados fenotípicos de cada população pelo método de regressão linear simples e múltipla (método *stepwise*). Para resistência do Tipo I na população $F_{2:3}$ derivada de Frontana x Weebil houve associação do marcador *Xgwm376* explicando (R^2) 8,83% da variação fenotípica. Associação do marcador *Xbarc76* ($R^2 = 10,81$) na população $F_{2:3}$ derivada de Ning 7840 x Kosoro foi observada, entretanto, pela análise de regressão múltipla desta população houve associação de *Xbarc76* e *Xbarc87* que juntos explicam 18,07% da variação fenotípica, indicando existência de efeito epistático entre os QTLs associados a estes marcadores. No estudo de resistência do Tipo II pela análise de regressão simples da população Ning 7840 x Frontana houve associação do marcador *Wmc398* ($R^2 = 7,49$), pela análise de regressão múltipla foram associados os marcadores *Wmc398*, *Xbarc180* e *Xgwm369* que juntos explicam 16,53% da variação fenotípica da população, também indicando existência de epistasia entre os QTLs associados a estes marcadores. O mapeamento de QTLs de resistência a giberela foi realizado pelo método de mapeamento por intervalo. Neste estudo foi identificado um pico que ultrapassou o valor de LR crítico (9,1) indicando existência de um QTL entre os marcadores *Xbarc147* e *Wmc808*, localizado no cromossomo 3BS sendo proveniente da cultivar Ning 7840. Os resultados deste trabalho serão úteis para utilização em programas de seleção assistida por marcadores moleculares, no melhoramento genético de trigo.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*. *Fusarium graminearum*. Seleção assistida por marcadores moleculares. Marcadores microssatélites. Mapeamento molecular.

4 MOLECULAR MARKERS AND QTLs VALIDATION OF FUSARIUM HEAD BLIGHT RESISTANCE IN WEATH

ABSTRACT

To validate molecular markers and map QTLs linked with Fusarium head blight (*Fusarium graminearum*) resistance, three F_{2:3} wheat (*Triticum aestivum* L.) populations were obtained from the crosses between Frontana x Weebil, Ning 7840 x Frontana and Ning 7840 x Kosoro. The populations were phenotyped for resistance to initial infection, Type 1, in the field, to spread, Type 2, in greenhouse. To identify molecular markers linked with FHB resistance markers were amplified and analyzed with the phenotypic data of each population by the simple and multiple linear regression method (stepwise method). For type 1 resistance in the F_{2:3} population, derived from Frontana x Weebil was a linked with *Xgwm376*, that explaining 8.83% of the phenotypic variation. Association of *Xbarc76* with R² value (10,81) in the F_{2:3} population derived from Ning 7840 x Kosoro was observed, however, by multiple regression analysis of this population *Xbarc76* and *Xbarc87* was associated which together explain 18.07% of the phenotypic variation, indicating the existence of the epistatic effects of QTLs linked with these SSR markers. In Type II resistance the study by simple regression analysis of the population Ning 7840 x Frontana, *Wmc398* marker was linked (R² = 7.49), by multiple regression analysis *Wmc398*, *Xbarc180* and *Xgwm369* markers were associated, together explain 16.53% of the phenotypic variation of these population, also indicating the existence of epistasis between QTLs associated with these markers. The mapping of FHB resistance QTLs was performed by the interval mapping method. This study identified a peak that exceeded the critical value of *likelihood ratio* (LR=9.1) indicating of a QTL existence between SSR markers *Xbarc147* and *Wmc808*, located on 3BS chromosome being from the cultivar Ning 7840. The results of this study will be useful for use in programs of marker-assisted selection in wheat breeding.

Key words: *Triticum aestivum*. *Fusarium graminearum*. Marker-assisted selection. SSR markers. Molecular mapping.

4.1 INTRODUÇÃO

Para o Brasil o trigo é uma cultura de grande importância econômica, especialmente na região Sul. A área cultivada com este cereal na safra 2011 foi de aproximadamente 2,15 milhões de hectares, com uma produção de 5,8 milhões de toneladas de grãos, sendo o Estado do Paraná o maior produtor com 3,3 milhões de toneladas, seguido pelo Rio Grande do Sul com 1,9 milhões de toneladas produzidas (CONAB, 2012).

Entre os fatores que podem afetar a produção de trigo estão a ocorrência e a intensidade das doenças (REIS et al., 2001). A giberela é uma das mais importantes doenças do trigo em todo mundo. É observada causando danos nas regiões tritícolas onde o ambiente é úmido e quente, com precipitações pluviais frequentes na fase do florescimento do trigo (REIS; CASA, 2007). Muitas espécies de *Fusarium* podem causar a doença, *Fusarium graminearum* Schwabe, [Teleomórfica = *Gibberella zeae* (Schwabe) Petch] é a principal espécie envolvida com a patogenicidade em muitos países (PARRY et al., 1995; BAI; SHANER, 2004).

A natureza esporádica da doença esta associada à dependência climática. Nos últimos anos, registram-se incremento na intensidade da doença em quase todas as regiões produtoras de trigo no mundo (WINDELS, 2000; CASA; KUHNE JUNIOR, 2011). Os danos causados pela giberela manifestam-se pela redução do rendimento, entretanto, estes não são apenas quantitativos, mas também qualitativos, principalmente devido à produção de micotoxinas prejudiciais a saúde humana e animal (PARRY et al., 1995; BAI; SHANER, 2004).

Medidas de controle culturais como rotação de culturas não tem sido eficientes, devido à ampla gama de hospedeiros do agente causal (REIS; CASA, 2007). A aplicação de fungicidas tornou-se uma prática comum, entretanto esta prática também apresenta eficiência limitada pelas dificuldades inerentes ao momento e tecnologias de aplicação, bem como, adiciona custos elevados aos produtores, principalmente em anos de severas epidemias (DEL PONTE et al., 2004).

O desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes a giberela representa a principal forma de reduzir as perdas em rendimento e danos na qualidade dos grãos (BAI; SHANER, 2004).

O mecanismo de resistência complexo combinado com o fato de que a expressão dos sintomas é variável e extremamente dependente de condições ambientais, dificultam e oneram o custo das estratégias de seleção convencional (HANDA et al., 2008; XUE et al., 2010). O entendimento dos mecanismos genéticos de resistência e o desenvolvimento de novas estratégias de melhoramento são necessárias para o desenvolvimento de cultivares de trigo com efetiva resistência a giberela (XUE et al., 2010).

Recentemente, com a disponibilidade de marcadores moleculares e de mapas genéticos, mais de 200 locos para características quantitativas (QTLs) para resistência a giberela foram identificados em germoplasma de trigo e espécies afins (BUERSTMAYR et al., 2009; LÖFFLER et al., 2009; LIU et al., 2009). Com marcadores moleculares associados a estes QTLs a seleção assistida (SAM) para a resistência a giberela torna-se possível (ZHOU et al., 2003; XUE et al., 2010).

Para utilização em programas de melhoramento de trigo os marcadores associados à QTLs de resistência a giberela devem ser validados, isto é, deve-se testar sua efetividade na determinação do fenótipo alvo em populações independentes e em diferentes *backgrounds* genéticos, para que sejam definidos os marcadores mais eficientes para uso efetivo na SAM (COLLARD et al., 2005; CUTHBERT et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi validar os marcadores moleculares associados à resistência a giberela, fenotipando diferentes populações de trigo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material Genético

Para validação dos marcadores moleculares e mapeamento de QTLs foram obtidas 3 populações $F_{2:3}$ conforme descrição abaixo.

- População 1: Frontana (resistência Tipo I) x Weebil (suscetível), população $F_{2:3}$ constituída por 113 famílias avaliadas para resistência Tipo I e 109 famílias avaliadas para resistência do Tipo II;
- População 2: Ning 7840 (resistência Tipo II) x Frontana (resistência Tipo I) , população $F_{2:3}$ constituída por 123 famílias avaliadas para resistência Tipo I e 125 famílias avaliadas para resistência do Tipo II;

– População 3: Ning 7840 (resistência Tipo II) x Kosoro (suscetível) , população $F_{2:3}$ constituída por 139 famílias avaliadas para resistência Tipo I e 140 famílias avaliadas para resistência do Tipo II;

Os cruzamentos foram realizados em casa de vegetação, as plantas F_1 foram autofecundadas e as plantas F_2 conduzidas em vasos em casa de vegetação. De cada planta F_2 individualmente realizou-se a colheita das sementes ($F_{2:3}$). As sementes de cada planta F_2 compõe uma família $F_{2:3}$. Estas foram identificadas com o número de origem da planta F_2 .

As sementes das famílias $F_{2:3}$ de cada população foram contadas e a quantidade de sementes de cada família foi dividida, para utilizar em duas avaliações fenotípicas de resistência a giberela.

4.2.2 Avaliação Fenotípica

Com o objetivo de avaliar separadamente a resistência à giberela, Tipo I e Tipo II, as três populações de mapeamento e os progenitores envolvidos em cada cruzamento foram fenotipadas em dois experimentos.

Avaliação de Resistência a Giberela – Tipo I

O experimento foi semeado na safra 2009, no centro de pesquisa da COODETEC, em Cascavel/PR (Latitude S 24° 52' 56,9"; Longitude W 53° 32' 00,4" e altitude 690m) e tipo de solo latossolo roxo distrófico.

Cada família $F_{2:3}$ foi semeada manualmente em uma linha de um metro de comprimento, compondo parcelas de 3 linhas, sendo que, em cada linha lateral foi semeada uma família $F_{2:3}$ em estudo e na linha central de cada parcela semeada uma testemunha suscetível para monitoramento da inoculação e desenvolvimento da doença no campo experimental. A cultivar suscetível utilizada foi a CD 116. O espaçamento entre linhas utilizado foi de 20 cm e entre parcelas de 40 cm. A adubação e o controle de pragas foram efetuados conforme as exigências técnicas para a cultura, sendo realizada apenas uma aplicação do fungicida Tebuconazole na dose de p.c. 0,5 L/ha no estágio de alongamento para controle das doenças foliares.

Grãos de trigo esterilizados, colonizados com *F. graminearum* (Figura 3) com formação de peritécios foram distribuídos entre as linhas externas de cada parcela, quando as primeiras plantas entraram no estágio de espigamento.

Figura 3 – (A) Grãos de trigo colonizados com *F. graminearum*. (B) Grãos de trigo com formação de peritécio de *G.zaeae* distribuídos no experimento de avaliação de resistência a giberela (Tipo I)

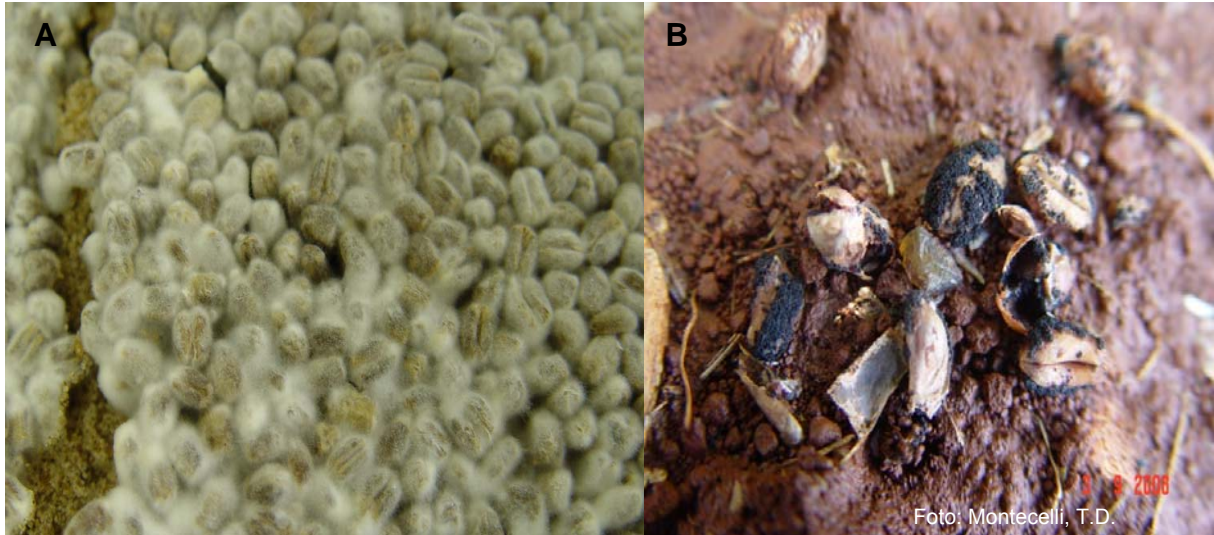


Foto: Montecelli, T.D.

No início do florescimento do trigo, a área experimental foi submetida ao molhamento de espigas com formação de neblina por 5 minutos consecutivos (Figuras 4 e 5), a intervalos de 25 a 30 minutos, em dias sem precipitação pluvial conforme metodologia proposta por LIMA; FERNANDES (2002). A presença de água livre nas espigas é condição essencial para o desenvolvimento da doença. Esta condição foi obtida através de sistema de irrigação constituído de: reservatório de água, motobomba com potência de 5 cv, canos de 25 ou 50 mm de diâmetro e mangueiras (tapes) flexíveis para irrigação instaladas entre cada parcela.

O sistema artificial de molhamento de espigas foi por aspersão, através de pressão provocada pela água dentro das mangueiras. As mangueiras possuem orifícios de cerca de 2 mm de diâmetro, dessa forma, a água é distribuída de maneira homogênea, mantendo elevado molhamento das espigas.

Figura 4 – Distribuição das mangueiras de irrigação entre as parcelas no experimento para avaliação de resistência a giberela (Tipo I) em populações de trigo, Cascavel/PR.



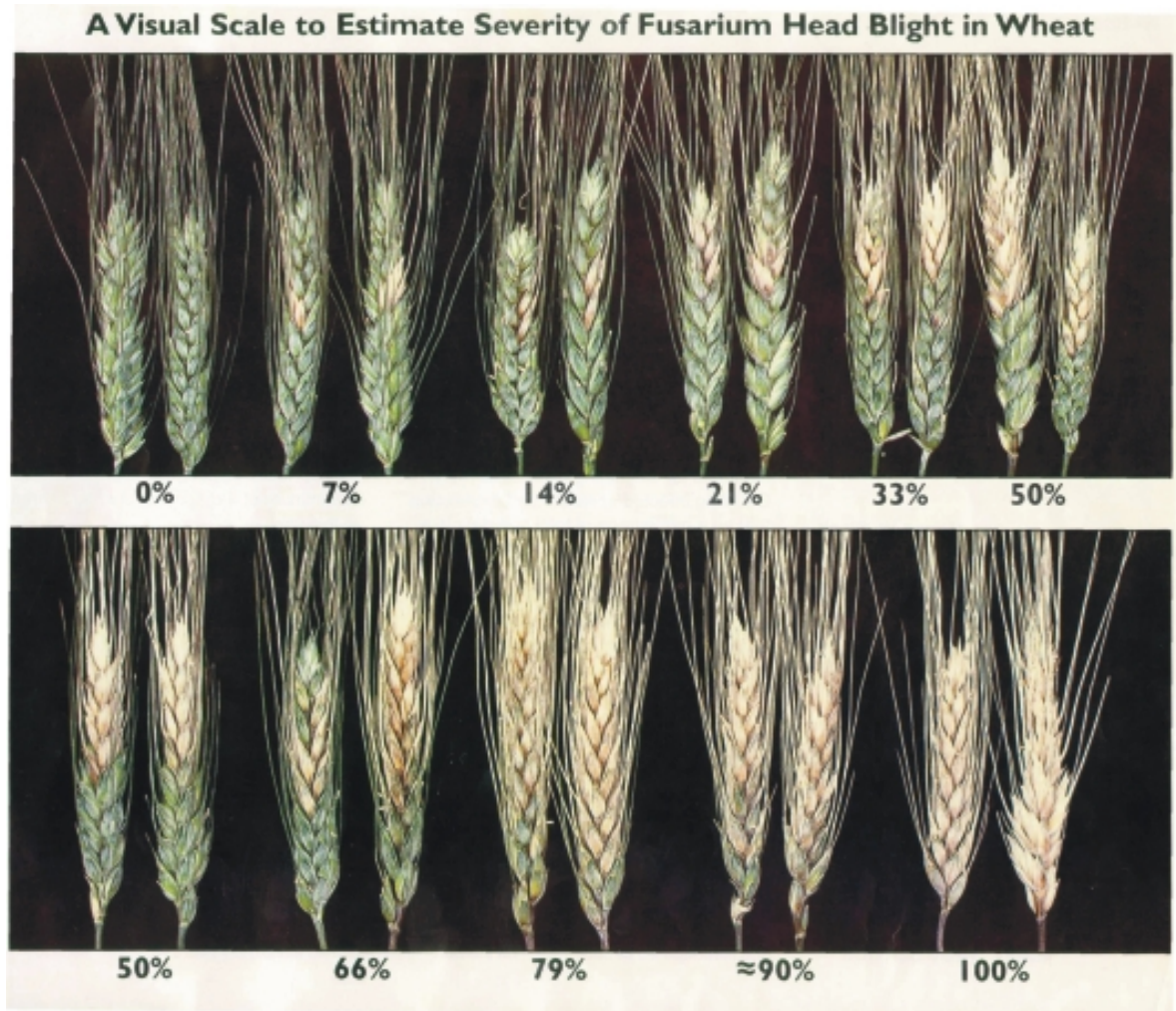
Figura 5 – Sistema de irrigação por aspersão no experimento para avaliação de resistência a giberela (Tipo I) em populações de trigo, Cascavel/PR.



A avaliação da severidade de foi realizada no estágio 11.2 da escala modificada de (FEEKS-LARGE, 1954), espiga verde com grãos em massa mole,

coletando-se 20 espigas principais de cada família $F_{2:3}$, avaliando-se a severidade conforme escala proposta por Stack e McMullen (1995) (Figura 6).

Figura 6 – Escala visual para avaliação de severidade (%) de giberela em trigo (STACK; McMULLEN, 1995).



Avaliação de Resistência a Giberela – Tipo II

As sementes das três populações foram semeadas em vasos de plástico (5 L) contendo mistura de solo, areia e matéria orgânica na proporção de (2:1:1). Foram inoculadas as espigas principais de cada planta, descartando-se as espigas menores.

À medida que as plantas atingiram a antese, as espigas selecionadas num total de 20 por família $F_{2:3}$ foram inoculadas. O inóculo inicial foi obtido a partir de espigas infectadas no campo. A obtenção de esporos em massa foi realizada através da raspagem de placas com meio ágar batata dextrose (BDA)

colonizadas por *F. graminearum*. O micélio com os macroconídios foram lavados com água destilada e esterelizada e com auxílio de um pincel (Figura 7A).

A concentração foi ajustada para 5×10^4 macroconídios por mL. A contagem foi realizada em microscópio óptico composto com o auxílio da Câmara de Neubauer (hematocitômetro). Foi realizado o monitoramento do estágio das plantas de trigo para realizar a inoculação quando cada planta estivesse iniciando o florescimento. As espigas principais de cada planta foram inoculadas com aproximadamente 10 μL da suspensão de esporos (macroconídios) na concentração de $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$. A suspensão de esporos foi injetada entre a lemma e a palea no par de espiguetas central (Figura 7B), inoculando-se uma espiguetas de cada lado da espiga, utilizando uma seringa hipodérmica.

Após a inoculação, foi aspergida água com auxílio de um borrifador manual. As espigas inoculadas foram cobertas utilizando-se um pequeno saco plástico para proporcionar umidade elevada ao redor da espiga. O saco plástico foi removido 48 horas após a inoculação (CUTHBERT, 2006; VERGES, 2004).

Figura 7 – (A) Raspagem de placas com meio BDA colonizadas por *F. graminearum*, para obtenção suspensão de esporos; (B) Inoculação do par de espiguetas central na espiga de trigo com auxílio de seringa hipodérmica.



Foram realizadas avaliações aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. A avaliação foi realizada contando-se as espiguetas com sintomas da doença,

excluindo as duas espiguetas que foram inoculadas. O número total de espiguetas de cada espiga também foi contado no 21º dia, para transformar o número de incidência de espiguetas doentes em porcentagem. Os valores de severidade das avaliações de 7, 14 e 21 dias após a inoculação foram integralizados em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (CAMPBELL; MADDEN 2006).

4.2.3 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sementes das plantas F_{2:3}, com base no protocolo descrito por McDONALD et al. (1994), com algumas modificações. Cerca de 50mg de sementes moídas foram colocados em tubos de microcentrifugas com 400µL de tampão de extração constituído de 50µM Tris-HCl (pH 8,0), 50mM EDTA (pH 8,0), 0,7M NaCl e 1% CTAB. Os tubos foram levados a um grinder e agitados, por um minuto. Em seguida, adicionaram-se mais 600µL de tampão de extração, homogeneizado em vortex por 30 segundos e centrifugado por 5 minutos à 1636 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga novamente por 4 minutos, e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrifuga.

As proteínas foram eliminadas pelo tratamento com 10µL de proteinase K (10mg/mL), deixando em banho-Maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 800µL de isopropanol gelado e deixado precipitar por 2 minutos e novamente centrifugado por 7 minutos à 1636 g. O sobrenadante foi descartado.

Para eliminação do RNA, acrescentaram-se 300µL de TE contendo 40µg/µL de RNase A, deixando-se por 30 minutos em banho-Maria a 37°C. Em seguida adicionados 800µL de isopropanol gelado e deixado precipitar por 2 minutos e novamente centrifugado por 7 minutos à 1636 g. O sobrenadante foi descartado e depois de seco o DNA foi ressuspendido em 300µL de TE.

A concentração do DNA foi estimada espectrofotometricamente por leitura de absorbância a 260nm, sendo que cada unidade de absorbância corresponde à concentração de 50µg/ml de DNA fita dupla (SAMBROOK et al., 1989). A integridade do DNA foi determinada em gel de agarose 0,8%, fotografado sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação Viber Loumart (Marne-la-Vallée, Cedex 1- France).

4.2.4 Seleção e Amplificação dos Locos de Microsatélites

A seleção dos marcadores microsatélites utilizados neste trabalho foi realizada a partir de referências em dados já publicados (Tabela 1).

Tabela 1 – Marcadores moleculares microsatélites selecionados para validação

Marcador	Referência	Marcador	Referência
Xbarc24	Cuthbert et al., (2007)	Wmc505	Yang et al., (2005)
Xbarc40	Lofler et al., (2009)	Xbarc117	Xue et al.,(2011)
Xbarc56	Lofler et al., (2009)	Xbarc133	Burlakoti et al., (2010)
Xbarc68	Cuthbert et al., (2007)	Xbarc147	Burlakoti et al., (2010)
Xbarc75	Liu; Anderson (2003)	Xbarc180	Buerstmayr et al., (2002)
Xbarc76	Loffler et al.,(2009)	Xbarc186	Buerstmayr et al., (2002)
Xbarc87	Liu; Anderson (2003)	Xbarc197	Burlakoti et al., (2010)
Xbarc101	Anderson et al., (2001)	Wmc527	Yang et al., (2005)
Xgwm088	Shen et al., (2003)	Wmc612	Yang et al., (2005)
Xgwm126	Yang et al., (2005)	Wmc705	Somers et al., (2005)
Xgwm219	Cuthbert et al., (2007)	Wmc808	Somers et al., (2003)
Xgwm247	Buerstmayr et al., (2009)	Xgwm389	Xue et al.,(2011)
Xgwm291	Yang et al., (2003)	Xgwm415	Xue et al.,(2011)
Xgwm293	Cuthbert et al., (2007)	Xgwm493	Burlakoti et al., (2010)
Xgwm369	Röder et al., (1998)	Xgwm497	Röder et al., (1998)
Xgwm376	Lofler et al., (2009)	Xgwm508	Cuthbert et al., (2007)
Wmc96	Buerstmayr et al., (2009)	Xgwm518	Somers et al., (2006)
Wmc104	Somers et al., (2005)	Xgwm533	Burlakoti et al., (2010)
Wmc264	Buerstmayr et al., (2009)	Xgwm639	Gervais et al., (2003)
Wmc397	Burlakoti et al., (2010)	Wmc428	Yang et al., (2005)
Wmc398	Burlakoti et al., (2010)	Wmc494	Cuthbert et al., (2007)

Primeiramente foi realizado um *screening* dos *primers* microsatélites para verificar se apresentavam polimorfismo entre os parentais

envolvidos nas três populações em estudo. Apenas os *primers* polimórficos foram utilizados nas populações.

A amplificação dos locos de microssatélites foi realizada com as amostras de DNA em 20 μ L de solução contendo 12,5mM de Tris-HCL (pH 8,3), 62,5mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 125 μ M de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ M de cada *primer*, uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 75ng de DNA. As condições de amplificação tiveram uma etapa inicial de 7 minutos a 72°C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C. Por fim, uma etapa de 7 minutos a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 7%. Depois de terminada a corrida, os géis foram submetidos à revelação com nitrato de prata e escaneados para armazenamento dos resultados.

4.2.5 Análise de Dados

Para identificar marcadores ligados a QTLs de resistência a giberela, foram analisados os marcadores amplificados e os dados fenotípicos em cada população pelo método de regressão linear simples e múltipla. A escolha do modelo para análise de regressão múltipla foi feita utilizando o método *stepwise* (DRAPER e SMITH, 1966), com nível de significância de 10% para entrada e saída das variáveis independentes.

A localização e caracterização dos efeitos do(s) possível(is) QTL(s) foram realizadas pelo mapeamento por intervalo. As estimativas de valores aditivos, o coeficiente de determinação do QTL correspondente ao pico de maior significância estatística do QTL e a posição do possível QTL foram declarados quando os valores da razão de máxima verossimilhança (*Likelihood Ratio* – LR) excederam os valores críticos de corte ($\alpha=0,05$). Os valores de LR críticos foram determinados pelo teste de permutação pela realização de 1000 permutações (DEORGE; CHURCHILL, 1994). Todas as análises foram realizadas com o programa GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2007), utilizando as funções de mapeamento de KOSAMBI (1944).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Fenotipagem

As metodologias utilizadas para avaliar as populações de trigo para a resistência do Tipo I e II em condições controladas foram eficientes em discriminar a reação das plantas. As avaliações fenotípicas são fundamentais para estudos de caracteres quantitativos. Estes caracteres são controlados por vários locos de pequeno efeito, são altamente influenciados pela ação do ambiente, e não se distinguem em classes como os caracteres qualitativos, o que torna difícil sua análise. A confiabilidade do método de avaliação para acessar a variabilidade das populações de trigo para a resistência a giberela é um dos pontos mais importantes num trabalho de caracterização da resistência (KOSOVÁ et al., 2009).

Houve intensa ocorrência de giberela no experimento de avaliação da resistência do Tipo I em condições de campo. As médias de severidade de giberela na população Frontana x Weebil variaram de 40,45% a 100% (Figura 8). Os genótipos parentais Frontana (resistência Tipo I) e Weebil (suscetível) apresentaram severidade média de 67,21% e 95,82% respectivamente, tendo sido observadas famílias $F_{2:3}$ com severidade de giberela menor do que Frontana.

Na população 2 (Ning 7840 x Frontana) as médias de severidade variaram de 30,53% a 85,21% (Figura 9). Os genótipos parentais apresentaram severidade semelhante, sendo que, Ning 7840 (resistência Tipo II) apresentou 34,95% e Frontana (resistência Tipo I) teve 34,75% de severidade de giberela. Nesta população, nenhuma família $F_{2:3}$ teve severidade de giberela menor do que os dois parentais. Ning 7840 apresentou baixa severidade a campo, embora esta cultivar não tenha resistência do Tipo I. A presença de resistência do Tipo II ajuda a manter a severidade de giberela em níveis baixos em condições de campo, pois a severidade fica limitada apenas pelas espiguetas inicialmente infectadas (BAI; SHANER, 2004).

Figura 8 – Distribuição e frequência fenotípica da severidade de giberela (%) dos parentais e da população 1 contendo 113 famílias $F_{2:3}$, oriundas do cruzamento Frontana x Weebil (Avaliação de resistência Tipo I).

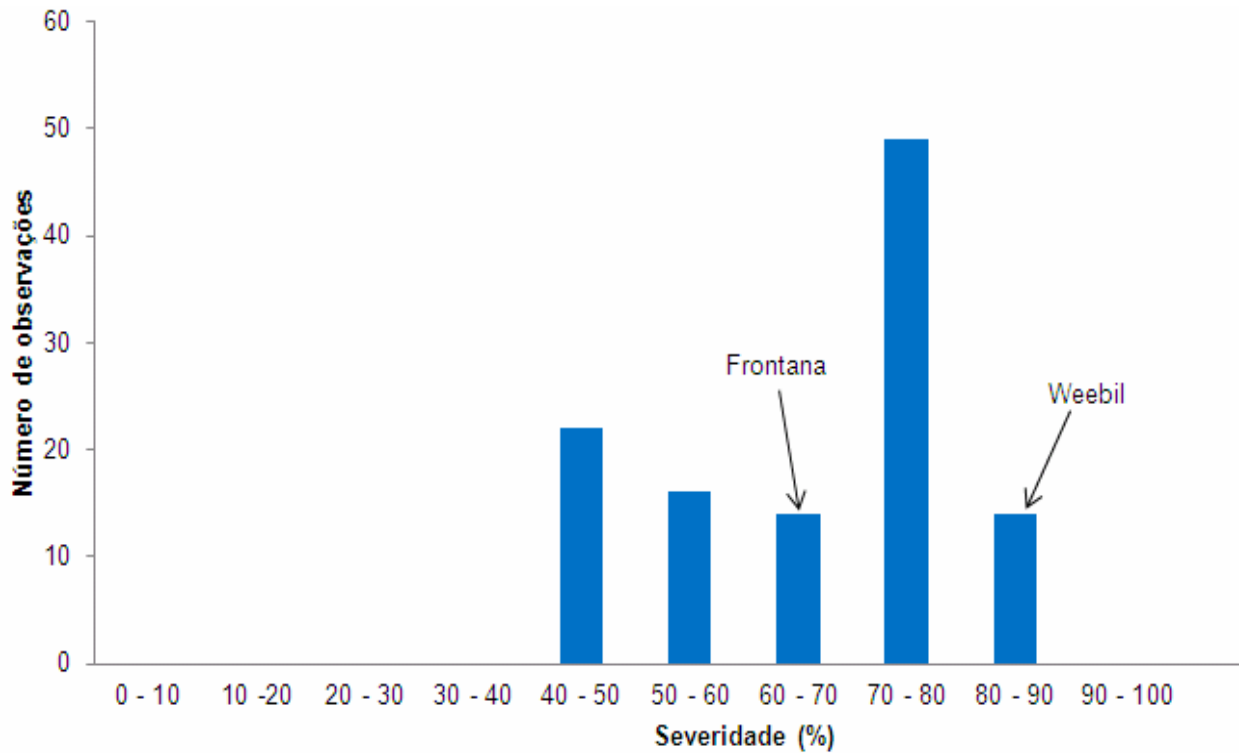
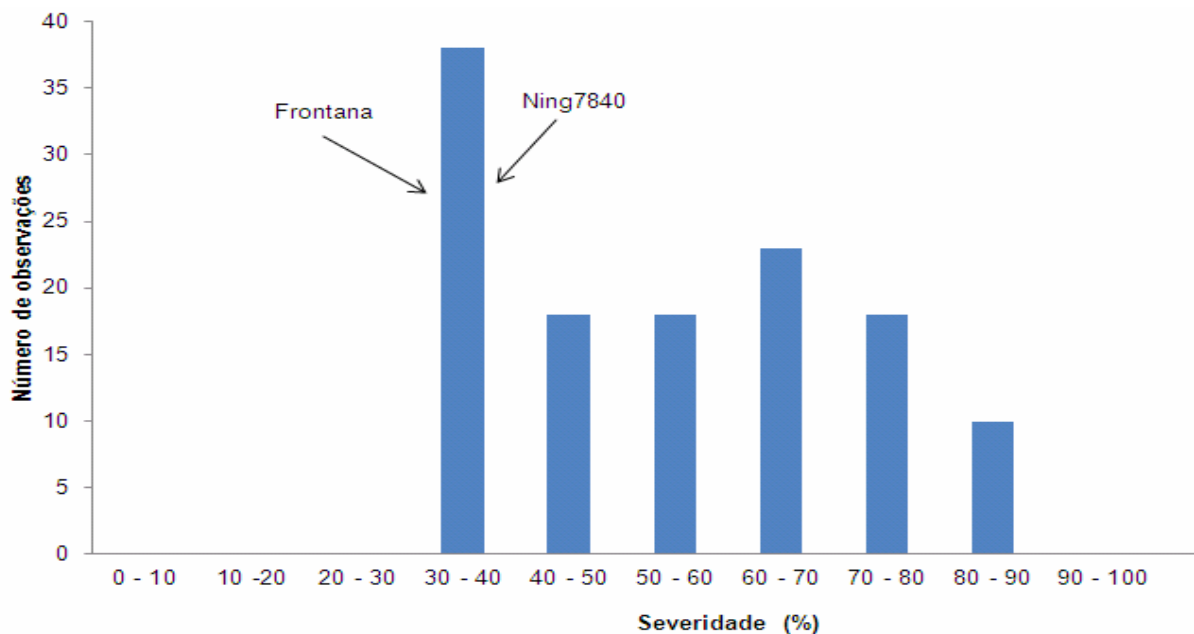


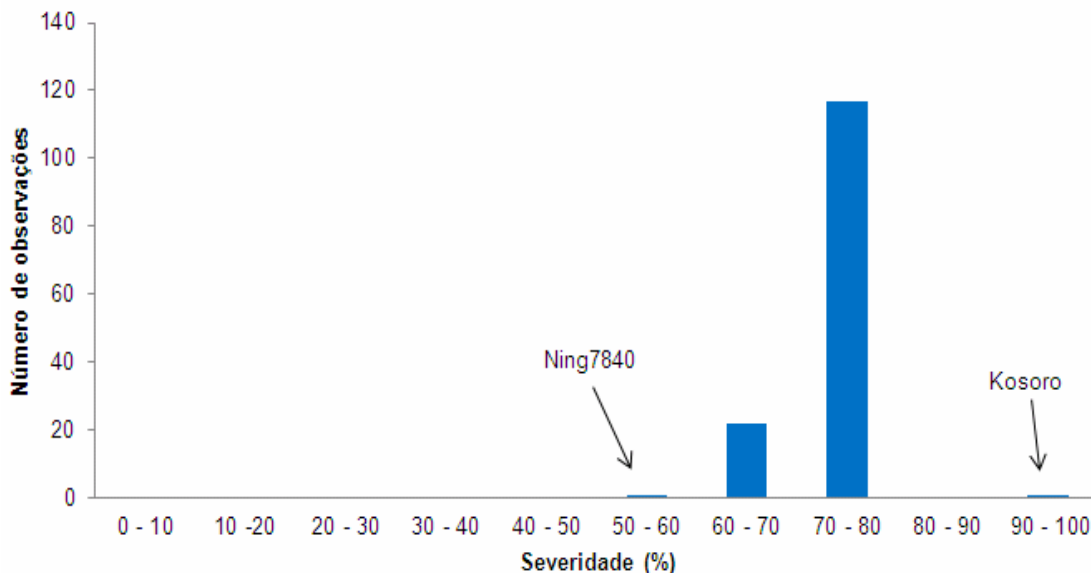
Figura 9 – Distribuição e frequência fenotípica da severidade de giberela (%) dos parentais e da população 2 contendo 123 famílias $F_{2:3}$, oriundas do cruzamento Ning 7840 x Frontana (Avaliação de resistência Tipo I).



Houve variações na severidade obtida na cultivar Frontana nas duas populações em que foi avaliada, estas variações possivelmente são devidas a efeitos do ambiente. Qualquer variação no período de florescimento, deposição e variação de inóculo, podem influenciar na expressão dos sintomas (BAI; SHANER, 2004). A resistência do Tipo I só é detectada em condições de baixa pressão de inóculo. Quando uma grande quantidade de esporos é deposita sobre as espigas florescidas por um longo período de incubação em condições ótimas de umidade, diferenças no grau de resistência podem não ser distinguíveis entre os genótipos avaliados (BAI; SHANER, 2004).

Não houve grande variação em severidade de giberela na população 3 (Ning 7840 x Kosoro), sendo que as 139 plantas tiveram notas que variaram de 60% a 80% e maior e menor severidade foram observadas nos genitores, que contrastaram amplamente (Figura 10). Ning 7840 que possui resistência do Tipo II apresentou 54,89% de severidade de giberela, e Kosoro (suscetível) 96,82%.

Figura 10 – Distribuição e frequência fenotípica da severidade de giberela (%) dos parentais e da população 3 contendo 139 famílias $F_{2:3}$, oriundas do cruzamento Ning 7840 x Kosoro (Avaliação de resistência Tipo I).



A avaliação para resistência a giberela consome tempo e é laboriosa e custosa devido a natureza quantitativa da resistência e porque a expressão do fenótipo é altamente influenciada por fatores ambientais (STEINER et al., 2004). No estudo de resistência do Tipo II conduzido em casa de vegetação, as inoculações

artificiais foram realizadas individualmente para cada planta de cada família $F_{2:3}$ no período da antese, sendo proporcionadas as condições ideais de umidade e temperatura para a infecção e disseminação. Avaliando-se a porcentagem de espigas infectadas 7, 14 e 21 após a inoculação foi possível integralizar as médias de severidade em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), indicando que em unidades menores de área tem-se menor severidade de giberela no período avaliado, possibilitando acessar com confiabilidade a capacidade de progressão da doença (resistência do Tipo II) em cada população estudada.

Em casa de vegetação a maioria das famílias da população 1 apresentou AACPD de giberela superior ao parental com melhor nível de resistência, Frontana (Figura 11). Setenta e sete famílias apresentaram AACPD igual e superior ao parental suscetível Weebil

Maior variabilidade na distribuição foi observada nas populações 2 e 3. Na população 2 (Figura 12), 94 famílias apresentaram AACPD inferior a cultivar Ning 7840 e 13 famílias apresentaram AACPD inferior a Frontana com unidades de área inferiores a 500. Já na população 3, Ning 7840 e Kossoro apresentaram AACPD semelhantes, 889 e 796, respectivamente, sendo que 93 famílias apresentaram AACPD inferior a Ning 7840.

Figura 11 – Distribuição e frequência fenotípica da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de giberela dos parentais e da população 1 contendo 109 famílias $F_{2:3}$, oriundas do cruzamento Frontana x Weebil (Avaliação de resistência Tipo II).

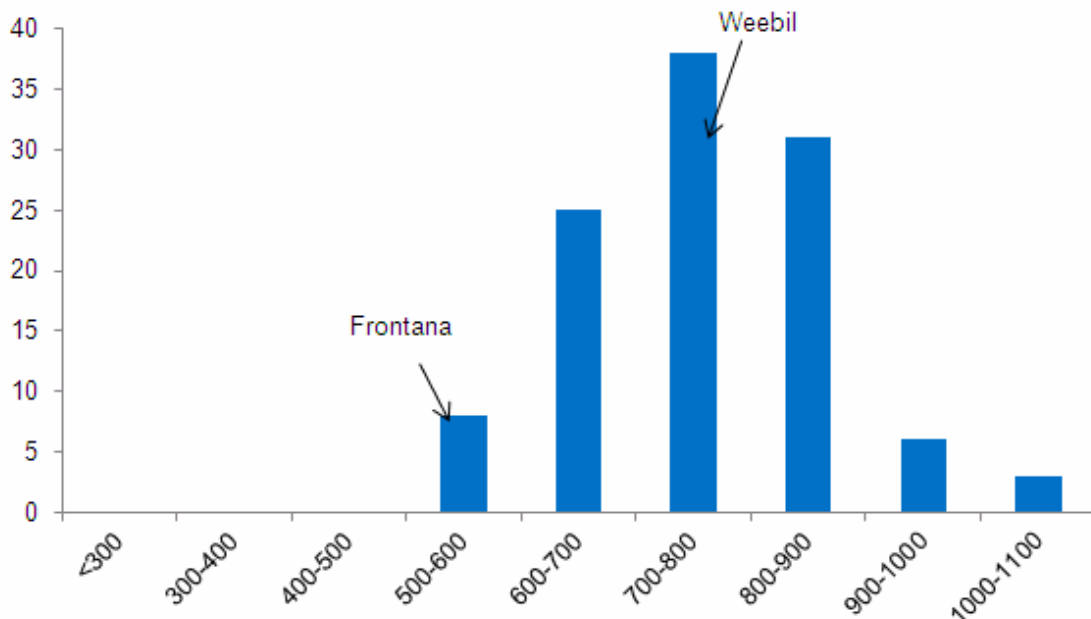


Figura 12 – Distribuição e frequência fenotípica da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de giberela dos parentais e da população 2 contendo 118 famílias $F_{2:3}$, oriundas do cruzamento Ning 7840 x Frontana (Avaliação de resistência Tipo II).

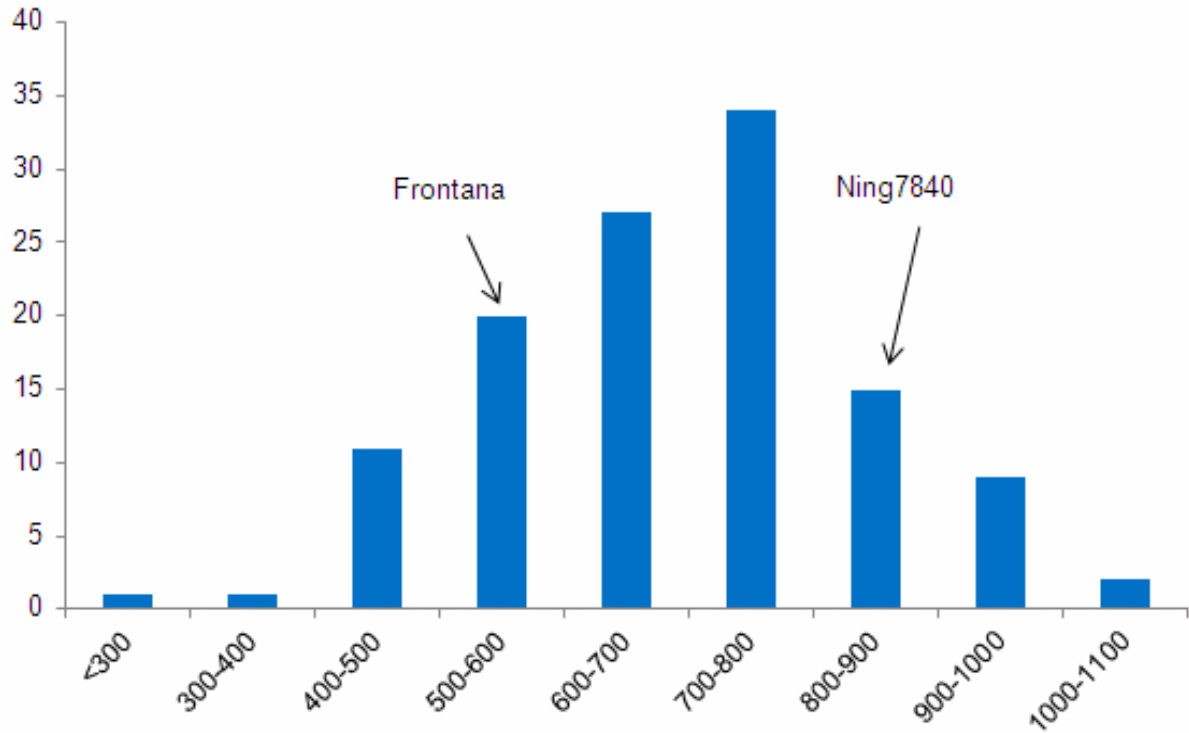
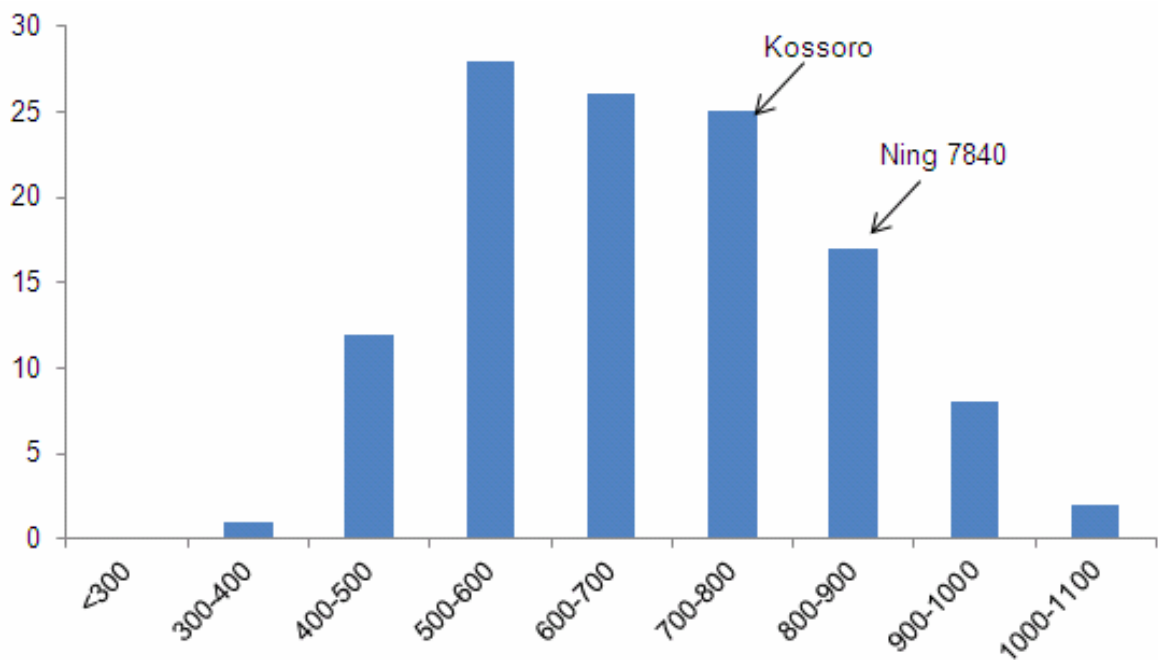


Figura 13 – Distribuição e frequência fenotípica da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de giberela dos parentais e da população 3 contendo 117 famílias $F_{2:3}$, oriundas do cruzamento Ning 7840 x Kosoro (Avaliação resistência Tipo II).



Neste estudo os resultados de progressão de giberela na cultivar Ning 7840 foram superiores ao esperado. Diversos trabalhos reportam bom nível de resistência do Tipo II nesta cultivar (BAI et al., 1999; ZHOU et al., 2002; BAI; SHANER, 2004). Uma possível causa para progressão da doença ser superior ao esperado, pode ser atribuída ao fato de Ning 7840 não possuir resistência inicial a infecção (Tipo I), a avaliação de severidade aos 7 dias após a inoculação corroboram para esta hipótese, enquanto foi observado apenas 7,22% de severidade de giberela na cultivar Kosoro, em Ning 7840 foi observado 23,42%. Neste caso a infecção pode ter sido favorecida pela proporção de espiguetas inicialmente infectadas.

De acordo com BAI; SHANER (2004), se uma grande quantidade de espiguetas é infectada inicialmente, devido a pressão de inóculo e ambiente favorável, resultará em maior nível de doença independentemente de possuir resistência do Tipo II. Este fato também é relatado pelos autores para o cultivar Sumai 3, progenitor de NING 7840, quando reportam que adicionar mais genes que conferem resistência do Tipo II pode não melhorar a resistência de campo de Sumai 3, entretanto, adicionar genes que conferem resistência do Tipo I, pode prover incremento de resistência e performance em condições de campo.

4.3.2 Validação de Marcadores Moleculares

Nas populações avaliadas para a resistência a giberela, apenas os *primers* polimórficos nos genitores foram amplificados nas populações. Dos 42 *primers* previamente selecionados para validação houve polimorfismo em apenas 6, 11 e 11 *primers* nas populações 1, 2 e 3 respectivamente. No total 19 primers diferentes foram utilizados, considerando as três populações.

Não foi possível associar marcadores moleculares com resistência a giberela do Tipo I (campo) na população oriunda de Ning 7849 x Frontana (Tabela 2). Entretanto, na população oriunda de Frontana x Weebil houve associação significativa ($p < 0,05$) do marcador Xgwm376 explicando 8,83% (R^2) da variação fenotípica.

Na análise de regressão simples entre marcadores moleculares e a resistência a giberela Tipo I na população de Ning 7840 x Kossoro houve associação do marcador Xbarc76 explicando 10,81% da variação fenotípica (Tabela 2). Na

análise de regressão múltipla pelo método *stepwise* foi possível detectar associação dos marcadores Xbarc76 e Xbarc87, que juntos explicam 18,07% da variação fenotípica observada. LOFFLER et al. (2009), realizando meta análise de QTLs de diversos estudos com parentais comuns, verificaram elevada consistência do QTL encontrado entre os marcadores Xbarc76 e Xbarc279, este explicando 4,8% da variação fenotípica, enquanto SHEN et al., (2003) identificaram um QTL entre os marcadores Xbarc76 e Xgwm674 explicando 13,4% da variação observada em população derivada do cultivar F201R.

Em estudo de seleção assistida por marcadores Liu; Anderson (2003) detectaram que o marcador Xbarc87 está associado ao QTL *Qfhs.ndsu-3BS*, localizado no fragmento do cromossomo 3BS.

Na análise de regressão simples, o marcador Xbarc87 não foi significativo. Mas na análise de regressão múltipla com procedimento *stepwise* para escolha de variáveis, este marcador foi significativamente associado à resistência Tipo I na população de plantas derivadas do cruzamento Ning 7840 x Kosoro. A proporção da variação na resistência explicada pelo marcador Xbarc76 isoladamente foi de 10,81% e quando os dois marcadores entraram no modelo, a variação na resistência explicada pelos marcadores foi de 18,07%. Isso significa que o QTL ligado ao marcador Xbarc87 apenas está associado à resistência na presença do QTL ligado ao marcador Xbarc76, indicando presença de epistasia entre estes dois QTLs para a resistência a giberela.

Tabela 2 – Análise regressão simples da associação entre marcadores moleculares e dados fenotípicos da avaliação de resistência a giberela (Tipo I) em populações de trigo.

Marcador	Frontana x Weebil			Ning 7840 x Frontana			Ning 7840 x Kosoro		
	R ²	F	P	R ²	F	P	R ²	F	P
Xbarc68	-	-	-	-	-	-	0,16	0,05	1,000
Xbarc76	1,42	0,97	1,000	-	-	-	10,81	4,12	0,050*
Xbarc87	-	-	-	-	-	-	0,65	0,22	1,000
Xbarc101	-	-	-	-	-	-	2,94	1,03	0,316
Xbarc133	-	-	-	0,18	0,10	1,000	-	-	-
Xbar147	-	-	-	0,11	0,06	1,000	-	-	-
Xbarc180	-	-	-	0,71	0,41	1,000	5,67	2,04	0,161
Xbarc197	-	-	-	0,82	0,48	1,000	1,02	0,35	1,000
Xgwm247	-	-	-	-	-	-	3,00	1,05	0,311
Xgwm369	0,32	0,21	1,000	-	-	-	0,72	0,24	1,000
Xgwm376	8,83	6,48	0,013*	-	-	-	-	-	-
Xgwm389	-	-	-	0,36	0,21	1,000	-	-	-
Xgwm493	-	-	-	0,48	0,28	1,000	-	-	-
Xgwm639	-	-	-	2,16	1,28	0,261	-	-	-
Wmc397	0,54	0,36	1,000	-	-	-	-	-	-
Wmc398	-	-	-	0,44	0,25	1,000	0,00	0,00	1,000
Wmc494	2,52	1,73	0,192	1,80	1,06	0,305	0,16	0,05	1,000
Wmc612	0,00	0,00	1,000	0,09	0,05	1,000	0,82	0,28	1,000
Wmc808	-	-	-	2,62	1,56	0,216	-	-	-

*Significativo a 5%; (-) não utilizado na população por ser monomórfico nos parentais.

Na análise de regressão simples para a resistência do Tipo II, houve associação significativa ($p < 0,05$) apenas do marcador Wmc398 explicando 7,49% da variação fenotípica da população oriunda de Ning 7840 x Frontana (Tabela 3). O marcador Wmc398, localizado no cromossomo 6BS, foi amplamente relatado estando ligado a resistência do Tipo II presente na cultivar Sumai 3 (ANDERSON et al. 2001; CUTHBERT et al.. 2006; BURLAKOTI et al., 2010).

Tabela 3 – Análise regressão simples da associação entre marcadores moleculares e dados fenotípicos da avaliação de resistência a giberela (Tipo II) em populações de trigo.

Marcador	Frontana x Weebil			Ning 7840 x Frontana			Ning 7840 x Kosoro		
	R ²	F	P	R ²	F	P	R ²	F	P
Xbarc68	-	-	-	-	-	-	0,02	0,00	1,000
Xbarc76	1,00	0,68	1,000	-	-	-	0,46	0,15	1,000
Xbarc87	-	-	-	-	-	-	0,69	0,23	1,000
Xbarc101	-	-	-	-	-	-	0,96	0,33	1,000
Xbarc133	-	-	-	3,62	2,14	0,148	-	-	-
Xbarc147	-	-	-	0,82	0,48	1,000	-	-	-
Xbarc180	-	-	-	6,38	3,95	0,051	0,75	0,26	1,000
Xbarc197	-	-	-	-	-	-	2,18	0,76	1,000
Xgwm247	-	-	-	-	-	-	3,04	1,06	0,308
Xgwm369	0,29	0,20	1,000	-	-	-	0,13	0,04	1,000
Xgwm376	2,91	2,03	0,158	-	-	-	-	-	-
Xgwm389	-	-	-	0,77	0,45	1,000	-	-	-
Xgwm493	-	-	-	0,44	0,25	1,000	-	-	-
Xgwm639	-	-	-	0,95	0,55	1,000	-	-	-
Wmc397	1,51	1,04	0,310	-	-	-	-	-	-
Wmc398	-	-	-	7,49	4,69	0,034*	2,36	0,82	1,000
Wmc494	0,00	0,00	1,000	0,14	0,08	1,000	0,89	0,30	1,000
Wmc612	0,01	0,00	1,000	0,90	0,52	1,000	2,82	0,98	1,000
Wmc808	-	-	-	3,45	2,07	0,155	-	-	-

*Significativo a 5%; (-) não utilizado na população por ser monomórfico nos parentais.

Na análise de regressão múltipla, foi possível verificar associação dos marcadores Wmc398, Xbarc180 e Xgwm639 que juntos explicam 16,53% da variação fenotípica da população derivada de Ning 7840 x Frontana. Os marcadores Xbarc180 e Xgwm639 não foram significativamente associados com a resistência Tipo II nesta população, mas na presença do marcador Wmc398 foram significativos. Também neste caso, verifica-se a existência de epistasia entre os QTLs associados a estes marcadores, especialmente com o marcador Xgwm639, uma vez que para o marcador Xbarc180, na análise de regressão simples, o valor da probabilidade foi de 5,1%.

BUERSTMAYR et al. (2002) mapearam a posição de um QTL (*Qfhs.ifa.5A*) no cromossomo 5A no intervalo entre os marcadores Xgwm293 – Xgwm156, a 64 cM do marcador Xbarc180 em cultivar de trigo derivada de Sumai 3.

GERVAIS et al. (2003) detectaram um QTL (*QHt.inra-5A*) associado a altura de planta em população derivada do cultivar de trigo europeu Renan x Recital no cromossomo 5A sendo que o marcador mais próximo deste QTL foi o marcador Xgwm639. Neste estudo, os autores verificaram associação de altura de planta e florescimento com resistência a giberela.

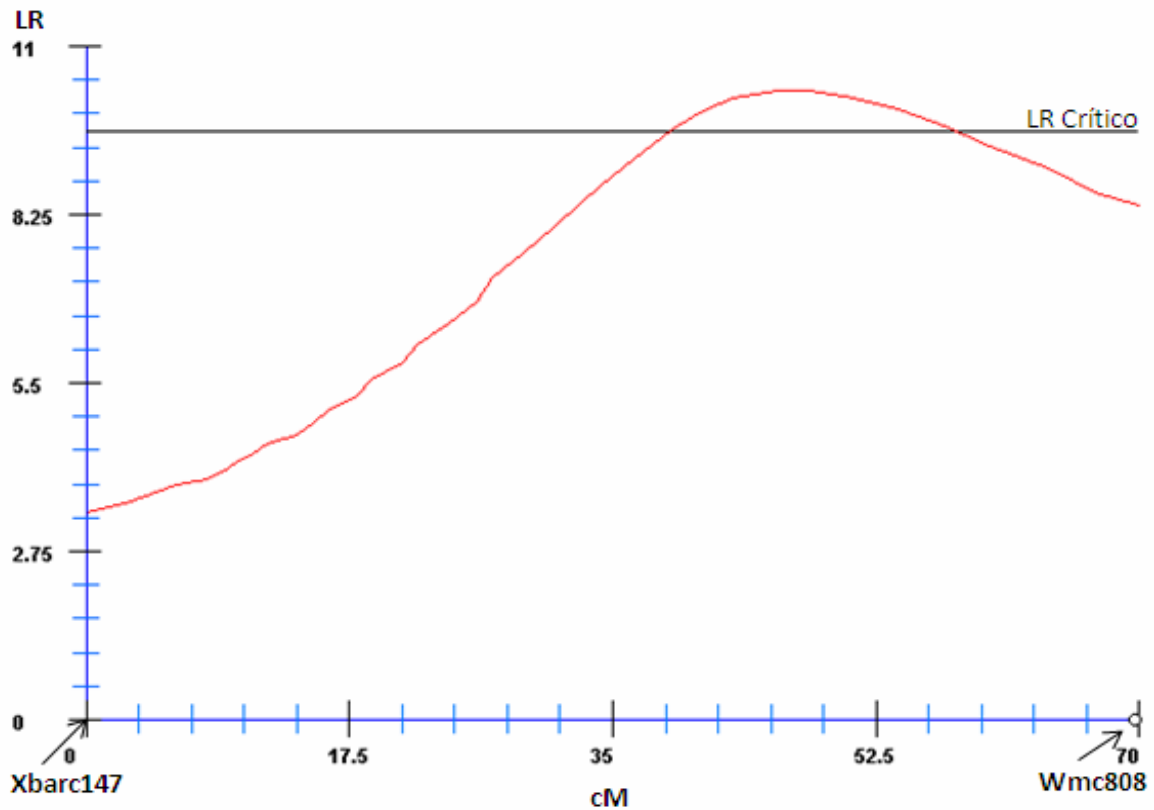
4.3.3 Mapeamento de QTLs Associados à Resistência a Giberela

Nas análises de mapeamento de QTL pelo método de intervalo, foi considerado um QTL quando os valores de LR obtidos foram superiores aos calculados pelo teste de permutação. Neste estudo foi identificado um pico que ultrapassou o valor do LR crítico (9,1) indicando a existência de um QTL entre os marcadores Xbarc147 e Xgwm808 proveniente do cultivar Ning 7840 (Figura 14).

Estes marcadores não foram associados significativamente com a resistência a giberela na análise de regressão. Isso pode ser devido ao fato de ser um QTL com baixa expressão no fenótipo, e os marcadores estarem distantes do QTL. Por este motivo, a análise de QTLs, que considera todas as posições do intervalo entre dois marcadores, detectou a presença do QTL, mas a análise de regressão, que avalia apenas os marcadores, não detectou a associação.

O marcador Xbarc147, localizado no cromossomo 3BS foi reportado como ligado a resistência do Tipo II presente em Sumai 3 (ANDERSON et al., 2001; CUTHBERG et al., 2006). XUE et al. (2009) identificaram o QTL *Qfhs.nau.3B* no intervalo entre os marcadores Xgwm389 - Xgwm533 - Xbarc147 - Xgwm493, indicando que esta é uma região importante para a resistência a giberela proveniente de Sumai 3 e derivados. ANDERSON et al. (2001) consideraram a descoberta de QTLs para a resistência a giberela nos cromossomos 3BS e 6B utilizando marcadores moleculares em duas populações segregantes. Uma forte evidência que representam uma importante região genômica responsável pela resistência observada na cultivar Sumai 3.

Figura 14 – Análise de QTL para resistência Tipo II a giberela em trigo, na população $F_{2:3}$ derivada do cruzamento entre Ning 7840 x Frontana.. LR crítico = 9,1, obtido pelo teste de permutação, com 1000 permutações.



Na tabela 4 estão apresentados os valores de LR, os efeitos aditivos estimados e o intervalo onde foi detectado um QTL que explica 11% da resistência a giberela na população oriunda do cruzamento de Ning 7840 x Frontana.

Tabela 4 – Proporção da variância fenotípica da resistência explicada (R^2 %), componentes aditivos e de dominância e grau médio da dominância (d/a), da resistência a giberela na população oriunda de Ning 7840 x Frontana.

Intervalo	Posição ¹	Cromossomo	LR	R^2	a	d	d/a
Xbarc147–Wmc808	30	3BS*	10,26	11%	93,31	-168,22	-1,80

¹Distância (em % de recombinação) do marcador à esquerda e o QTL.

*Localização definida nos estudos de Somers et al. (2005) e Burlakoti et al. (2010).

SOMERS et al. (2003) também identificaram um QTL no cromossomo 3BS, sendo que o marcador Xgwm808 está localizado em sua posição proximal.

No Brasil os estudos voltados para o mapeamento de QTLs associados à resistência a giberela são escassos, o que torna os resultados obtidos neste trabalho promissores. No entanto, uma maior saturação do mapa genético é necessária, incrementando as informações sobre mapeamento de genes e marcadores moleculares úteis visto que a região onde foi identificado o QTL é uma região genômica importante para a resistência a giberela, o que torna possível a identificação de outros QTLs associados.

4.4 CONCLUSÕES

Neste trabalho, 42 marcadores moleculares previamente relatados como associados à resistência a giberela foram utilizados em três populações segregantes de trigo para validação de QTLs de resistência, destes, apenas 19 foram polimórficos em pelo menos uma população. Sete regiões genômicas foram identificadas como associadas à resistência a giberela, sendo que seis marcadores foram associados à resistência a giberela através de regressão linear simples ou múltipla, e uma região genômica foi identificada pela análise de QTLs.

Os marcadores moleculares validados neste trabalho Xgwm376, Xbarc76, Xbarc87, Wmc398, Xbarc180 e Xgwm639 podem ser utilizados nos programas de seleção assistida dos QTLs de resistência a giberela em trigo. Esta metodologia representa uma alternativa aos procedimentos convencionais de seleção de genótipos.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. A.; STACK, R. W.; LIU, S.; WALDRON B. L.; FJELD A.D.; COYNE C.; MORENO-SEVILLA B.; FETCH J. M.; SONG Q. J.; CREGAN P. B.; FROHBERG R. C. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations. **Theoretical Applied Genetics**. Vol:102, p.1164-1168. 2001.

BAI, G.H; SHANER, G. Scab of wheat: Prospects for control. **Plant Disease**, 78:760-766, 1994.

BAI, G.H; SHANER, G. Management and resistance in wheat and barley to Fusarium head blight. **Annual Review Phytopathology**, 42:135-161, 2004.

BUERSTMAYR, H.; LEMMENS, M.; HARTL, L.; DOLDI, L.; STEINER, B.; STIERSCHNEIDER, M.; RUCKENBAUER, P. Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). **Theoretical Applied Genetics**. Vol:104, p.84–91, 2002.

BUERSTMAYR, H.; BAN, T.; ANDERSON, J.A. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. **Plant Breeding**, 128, p. 1-26. 2009.

BURLAKOTI, R., MERGOUM, M.; SHAHRYAR, F.K.; ADHIKARI, T. Combining different resistance components enhances resistance to Fusarium head blight in spring wheat. **Euphytica** v,172:197–205, 2010.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York NY. Wiley. 1990.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 2.1. Viçosa, MG: UFV, 2004. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: fevereiro, 2012.

COLLARD, B.C.Y; JAHFER, 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.

CUTHBERT P.A.; SOMERS, D.J.; THOMAS, J.; CLOUTIER, S. ; BRULÉ-BABEL, A. Fine mapping FHB1, a major gene controlling fusarium head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical Applied Genetics**, Vol:112, p.1465-1472, 2006.

CONAB. Indicadores agropecuários: Disponível em: www.conab.gov.com. Acessado em janeiro de 2012.

DEORGE, R.W. CHURCHILL, G.A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v. 142.p. 285-294, 1996.

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

DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. John Wiley and Sons, New York, London, Sydney. 407p. 1966.

GERVAIS L.; DEDRYVER, F.; MORLAIS, J.Y.; BODUSSEAU, V.; NEGRE, S.; BILOUS, M.; GROOS, C.; TROTTEY, M. Mapping of quantitative trait loci field resistance to Fusarium head blight in a European winter wheat. **Theoretical Applied Genetics**, 106:961-970, 2003.

HANDA, H.; NAMIKI, N.; XU, D.; BAN, T. Dissecting of the FHB resistance QTL on the short arm of wheat chromosome 2D using a comparative genomic approach: from QTL to candidate gene. **Molecular Breeding**, vol. 22, p. 71-84. 2008.

GUO, P. G.; BAI, G.H.; SHANER, G.E. AFLP and STS tagging of a major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. **Theoretical Applied Genetics**. Vol: 106, p.1011-1017. 2003.

KOLB, F.L.; BAI, G.H.; MUEHLBAUER, G.J.; ANDERSON, J.A.; SMITH, K.P.; FEDAK, G. Host plant resistance for Fusarium head blight: Mapping and manipulation with molecular markers. **Crop Science**, 41:611-619, 2001.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Ann. Eugen.** v.12: p.173-175, 1944.

KOSOVÁ, K.; CHRPOVÁ, J.; ŠÍPCEREAL, V. Resistance to Fusarium Head Blight and Possibilities of its Improvement through Breeding. **Czech J. Genet. Plant Breed.** V.45, (3): p.87–105. 2009.

LARGE, E. C. Growth stage in cereals: illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, v. 3, p. 128-129, 1954.

LIMA, M.I.P.M; FERNANDES, J.M.C. Avaliação da resistência à giberela de genótipos de cereais de inverno. Embrapa – Trigo, Passo Fundo/RS. **Fitopatologia Brasileira**, 27 (1), p. 104, jan-fev. 2002.

LIU, S.; ANDERSON, J. A. Marker assisted evaluation of Fusarium head blight resistant wheat germplasm. **Crop Science**. Vol.43: p. 760-766, 2003.

LIU, S.; HALL, M.D.; GRIFFEY, C. A.; MCKENDRY, A.L. Meta-Analysis of QTL Associated with Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. **Crop Science**. Vol. 49: p. 1955–1968, 2009.

LÖFFLER, M.; SCHON, C.C.; MIEDANER, T. Revealing the genetic architecture of FHB resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) by QTL meta-analysis. **Molecular Breeding**, vol. 23: p.473–488. 2009.

McDONALD, M.D.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.A. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 1, p.171-176, 1994.

McMULLEN, M., JONES, R. ; GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. **Plant disease**, v.81, n.12, p. 1340-1348, 1997.

MESTERHAZY, A. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. **Plant Breeding**. 114:377–386, 1995.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; McLEOD, L. Fusarium head blight (scab) in small grain cereals – a review. **Plant Pathology**, v. 44, p. 07- 238, 1995.

- PUMPHREY, M.O.; BERNARDO, R.; ANDERSON, J.A. Validating the Fhb1 QTL for fusarium head blight resistance in nearisogenic wheat lines developed from breeding populations. **Crop Science** 47:200–206. 2007.
- REIS, E.M., CASA, R.T. & MEDEIROS, C.A. **Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno**. Londrina, PR. ES Comunicação S/C Ltda. 2001.
- REIS, E.M.; CASA R. T. **Doenças dos cereais de inverno: diagnose, epidemiologia e controle**. 2. Ed. Lages: Graphel, 176p. 2007.
- SAMBROOCK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**, 2nd Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, V. 3, 1989.
- SHEN, X.R.; ZHOU, M.; LU, W.; OHM, H. Detection of *Fusarium* head blight resistance QTL in a wheat population using bulked segregant analysis. **Theoretical Applied Genetics** Vol:106, p.1041–1047, 2003.
- SOMERS, D.J.; FEDAK, G.; SAVARD, M. Molecular mapping of novel genes controlling *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat. **Genome**, 46:555-564, 2003.
- SOMERS, D. J.; THOMAS, J.; DEPAUW, R.; FOX, S.; HUMPHREYS, G.; FEDAK, G. Assembling complex genotypes to resist *Fusarium* in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical Applied Genetics**. Vol:111, p.1623-1631, 2005
- SOMERS, D. J., FEDAK, G.; CLARKE, J.; CAO, W. G. Mapping of FHB resistance QTLs in tetraploid wheat. **Genome**. Vol: 49, p.1586—1593. 2006.
- STACK, R.W.; MCMULLEN, M. **A visual scale to estimate severity of Fusarium head blight in wheat**. Extension Publication PP-1095. North Dakota State University Extension Service. 1995.
- STEINER, B.; LEMMENS, M.; GRISSER, M.; SCHOLZ, U.; SCHONDELMAIE, J.; BUERSTMAYR, H. Molecular mapping of resistance to *Fusarium* head blight in the spring wheat cultivar Frontana. **Theoretical Applied Genetics**. Vol:109:p. 215-224, 2004.
- STRANGE, R.N.; MAJER, J.R.; SMITH, H. The isolation and identification of coline and betaine as two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. **Physiol. Plant Pathology**, v.4, p.277-290, 1974.
- SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal Plant Pathology**. v.4, n.2. p. 195-209. 1982.
- VAN GINKEL, M.; VAN DER SHAAR, W.; ZHUPING, Y.; RAJARAM, S. Inheritance of resistance to scab in two wheat cultivars from Brazil and China. **Plant Disease** 80:863-867, 1996.
- WIESE, M. V. **Compendium of wheat diseases**. American Phytopathological Society. St. Paul. 2ed. 1987.

- WINDELS, C.E. Economic and social impacts of Fusarium Head Blight: Changing farms and rural communities in northern great plains. **Phytopathology**, v. 90: p. 17-21. 2000.
- XU, X.Y.; BAI, G.H.; CARVER, B.F.; SHANER, G.E.; HUNGER, R.M. Mapping of QTLs prolonging the latent period of *Puccinia triticina* infection in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.110, n.2, p. 244-251, 2005.
- XUE, S.; XU, F.; TANG, M.; ZHOU, Y.; LI, G.; AN, X.; LIN, F.; XU, H.; JIA, H.; ZHANG, L.; KONG, Z.; MA, Z. Precise mapping *Fhb5*, a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics** Vol:123, p.1055-1063. 2011.
- XUE, S.; LI, G.; JIA, H.; LIN, F.; CAO, Y.; XU, F.; TANG, M.; WANG, Y.; WU, X.; ZHANG, Z.; KONG, Z.; MA, Z. Marker-assisted development and evaluation of near-isogenic lines for scab resistance QTLs of wheat. **Molecular Breeding**, v. 25: p. 397-405. 2010.
- YANG, Z.P.; GILBERT, J.; SOMERS, D.J.; FEDAK, G.; PROCUNIER, J.D.; MCKENZIE, I.H. Marker assisted selection of Fusarium head blight resistance genes in two double haploid population of wheat. **Molecular Breeding**, 12:309-317, 2003.
- YANG, Z. P., GILBERT, J.; FEDAK, G.; SOMERS, D. J. Genetic characterization of QTL associated with resistance to Fusarium head blight in a doubled-haploid spring wheat population. **Genome**. Vol:48, 187—196. 2005.
- YUYAMA, M.M.; HENNING, A.A. **Ocorrência de *Fusarium* do grupo *Roseum* em sementes de soja: levantamento e identificação da espécie**. Congresso Brasileiro de Soja, 1999. Anais... Londrina: Embrapa Soja, p. 454. 1999.
- ZADOCKS, J.C.; SCHEIN, R.D. **Epidemiology and plant disease management**. New York, Oxford University Press, 1979.
- ZHANG, X.J.; JIN, Y.; RUDD, J., BOCKELMAN, H.E. New fusarium head blight resistance spring wheat germplasm identified in the USDA National Small Grain Collection. **Crop Science**. 48:223-235. 2008.
- ZHOU, W-C.; KOLB, F.L.; BAI, G-H.; DOMIER, L.L.; BOZE, L.K.; SMITH, N.J. Validation of major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker assisted selection in wheat. **Plant Breeding**, 122:40-46, 2003.