

DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A *Septoria tritici*
Rob. EM TRIGO [*Triticum aestivum* (L.)]

JORGE OMAR GIECO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Junho - 2002

p. Item linha
17 3.3 primeira

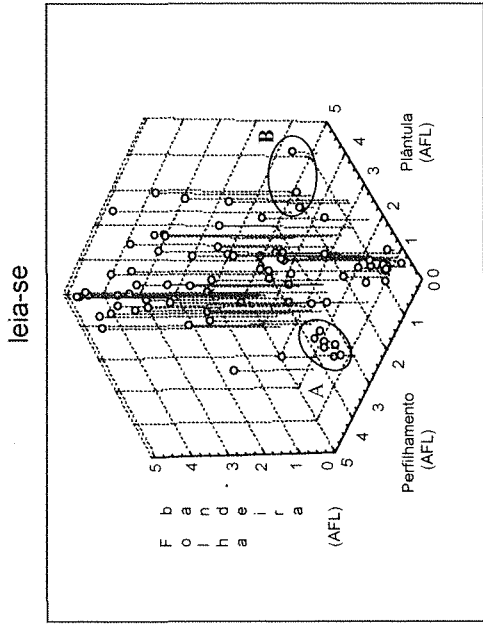
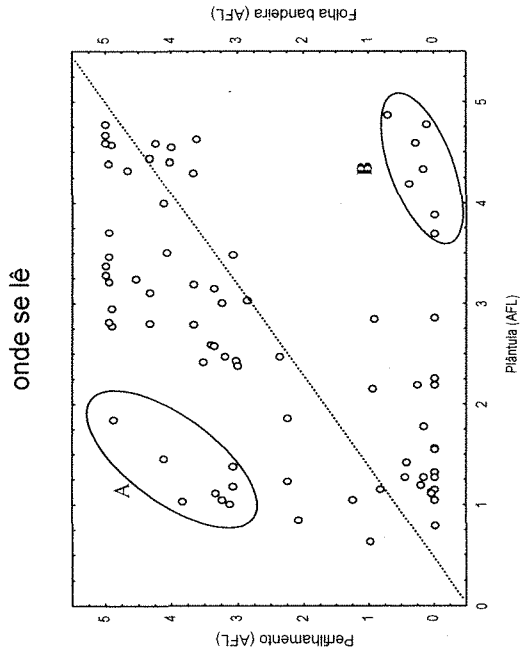


Figura 2 - Área foliar lesionada (AFL) de progêneses F₁₁ de trigo inoculadas com *Septoria tritici* nos estádios fenológicos de plântula, perfilhamento e folha bandeira. Os círculos ressaltam progêneses resistentes quando inoculadas no estágio de plântula, mas suscetíveis em folha bandeira (A), e progêneses suscetíveis no estágio de plântula, mas resistentes nos estádios de perfilhamento e folha bandeira (B).

Figura 2 - Área foliar lesionada (AFL) de progêneses F₁₁ de trigo inoculadas com *Septoria tritici* nos estádios fenológicos de plântula, perfilhamento e folha bandeira. Os círculos ressaltam progêneses resistentes quando inoculadas no estágio de plântula e folha bandeira, mas suscetíveis em perfilhamento (A), e progêneses suscetíveis no estágio de plântula, mas resistentes nos estádios de perfilhamento e folha bandeira (B).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Gioco, Jorge Omar
Detecção de genes de resistência a *Septoria tritici* Rob. Em trigo [*Triticum aestivum*
(L.)] / Jorge Omar Gioco. - - Piracicaba, 2002.
109 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Genética molecular vegetal 2. Genomas 3. Mancha foliar 4. Resistência genética .
vegetal 5. Trigo I. Título

CDD 633.11

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Data de depósito junto a CPG/ESALQ

05 / 06 / 2002

A minha esposa,
María del Valle Basanta

OFEREÇO

Aos meus pais,
Osvaldo Juan Gieco
Etelvina Margarita D. Boretto

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela paciência e fortaleza concedidas para poder concretizar este trabalho.
- Ao Brasil por possibilitar minha formação em nível superior.
- À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” -USP por haver-me outorgado o privilegio de ser um aluno seu.
- A minha esposa María Del Valle Basanta pela sua permanente companhia, amor, estímulo e colaboração.
- Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela orientação, amizade, e pela permanente colaboração e apoio na realização deste trabalho.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos fornecida no período de Maio de 1999 a Agosto de 2002.
- Ao Prof. Dr. Jorge Dubcovsky, diretor do *Wheat Molecular Genetics Laboratory*, Davis, CA-EUA e as autoridades do *Department of Agronomy and Range Science* da Universidade da Califórnia-Davis por possibilitar-me o estágio nessa prestigiosa instituição de ensino.

- Às autoridades do *Instituto de Recursos Biológicos-INTA* Castelar (Buenos Aires-Argentina) por facilitar as instalações para a realização dos experimentos de casa de vegetação.
- A Dra. Susana Marcucci Poltri do *Instituto de Recursos Biológicos-INTA* Castelar (Buenos Aires-Argentina) pelo treinamento em AFLPs e pela sua amizade e colaboração.
- À Eng^o. Agr^o. (MS) Ana Rosa Schlatter do *Instituto de Recursos Biológicos-INTA* Castelar (Buenos Aires-Argentina) pelo treinamento em microssatélites e pela sua colaboração no *screening* dos parentais.
- À Licenciada Silvana Lewis do *Instituto de Recursos Biológicos-INTA* Castelar (Buenos Aires-Argentina) pela colaboração nos experimentos de campo.
- Aos professores dos Departamentos de Genética, Fitopatologia, Entomologia e Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ-USP, pelos ensinamentos oferecidos.
- À Eng^o. Agr^o. Cristina Cordo da *Facultad de Agronomía y Veterinaria-Universidad Nacional de La Plata* (Buenos Aires-Argentina) pelos isolados de *Septoria tritici* cedidos para este trabalho.
- Ao Eng^o Agr^o Clyde Clark do *Department of Agronomy and Range Science* da Universidade da Califórnia-Davis, pelo apoio permanente na realização dos experimentos de campo e casa de vegetação.
- A todos os companheiros do *Wheat Molecular Genetics Laboratory*, Davis, CA-EUA e do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Fitopatologia da ESALQ-USP pelos gratos momentos compartilhados.
- A meus pais, Etelvina e Osvaldo pelo seu permanente apoio e compreensão.

- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, Pedro Artuzo, Fernanda e Rodolfo, pelo apoio permanente na realização dos trabalhos relativos à tese.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Resistência genética.....	4
2.2 Genoma de trigo.....	6
2.3 Análise genômica através de marcadores moleculares.....	8
2.4 Microssatélites.....	11
2.5 AFLPs.....	12
3 INTERAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA A <i>Septoria tritici</i> E ESTÁDIOS FENOLÓGICOS EM TRIGO.....	14
Resumo.....	14
Summary.....	15
3.1 Introdução.....	16
3.2 Material e Métodos.....	18
3.2.1 Material Vegetal.....	18
3.2.2 Avaliação da resistência.....	18
3.2.3 Análise Estatística.....	19
3.3 Resultados e Discussão.....	19
3.4 Conclusões.....	24
4 VARIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E ESPECIALIZAÇÃO FISIOLÓGICA EM ISOLADOS DE <i>Septoria tritici</i> Rob.....	26

Resumo.....	26
Summary.....	27
4.1 Introdução.....	28
4.2 Material e Métodos.....	31
4.2.1 Isolados.....	31
4.2.1.1 Experimento 1: Castelar-Argentina.....	31
4.2.1.2 Experimento 2: Davis-EUA.....	31
4.2.2 Material vegetal.....	32
4.2.2.1 Experimento 1: Castelar-Argentina.....	32
4.2.2.2 Experimento 2: Davis-EUA.....	33
4.2.3 Avaliação da resistência.....	33
4.2.3.1 Experimento 1: Castelar-Argentina.....	33
4.2.3.2 Experimento 2: Davis-EUA.....	34
4.2.4 Análise estatística.....	35
4.3 Resultados e Discussão.....	36
4.3.1 Experimento 1: Castelar-Argentina.....	36
4.3.2 Experimento 2: Davis-EUA.....	40
4.4 Conclusões.....	44
5 FORMAÇÃO DE <i>BULKS</i> COM BASE NA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PROGÊNIES F ₁₁ DE TRIGO A <i>Septoria tritici</i> Rob.....	46
Resumo.....	46
Summary.....	47
5.1 Introdução.....	48
5.2 Material e Métodos.....	49
5.2.1 Avaliação da resistência.....	49
5.2.1.1 Ambiente 1A: Inoculação em casa de vegetação. Ano 1999.....	49
5.2.1.2 Ambiente 1B: Inoculação a campo. Ano 2000.....	50
5.2.1.2.1 Estádio fenológico de plântula.....	50
5.2.1.2.2 Estádio fenológico de folha bandeira.....	51
5.2.2 Formação de <i>Bulks</i>	52

5.3 Resultados e Discussão.....	52
5.4 Conclusões.....	57
6 ANÁLISE MOLECULAR DE PROGÊNIES DE TRIGO VISANDO DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A <i>Septoria tritici</i> Rob.....	58
Resumo.....	58
Summary.....	59
6.1 Introdução.....	59
6.2 Material e Métodos.....	61
6.2.1 Material vegetal.....	61
6.2.2 Extração de DNA.....	61
6.2.3 Análise molecular com marcadores microssatélites.....	62
6.2.4 Análise molecular com marcadores AFLPs.....	63
6.2.5 Análise estatística.....	66
6.2.5.1 Detecção e mapeamento de genes de resistência.....	66
6.3 Resultados e Discussão.....	66
6.3.1 Análise molecular com marcadores microssatélites.....	66
6.3.2 Análise molecular com marcadores AFLPs.....	68
6.4 Conclusões.....	71
7 CONCLUSÕES GERAIS.....	72
ANEXOS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A *Septoria tritici* Rob.

EM TRIGO [*Triticum aestivum* (L.)]

Autor: JORGE OMAR GIECO

Orientador: Prof. Dr. LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

RESUMO

A mancha foliar provocada por *Septoria tritici* Rob. é uma das principais doenças do trigo em mais de 50 países, sendo responsável por significativas reduções na produtividade desta cultura. Os objetivos do presente trabalho foram: (i) Estudar a interação resistência x estágio fenológico no patossistema trigo - *Septoria tritici* em 77 progênies F₁₁ de trigo derivadas do cruzamento triplo Tadinia x (Yecora rojo x UC554); (ii) Determinar se existe especialização fisiológica em isolados de *Septoria tritici* originários de Argentina e EUA através da análise de sua patogenicidade em cultivares e linhagens de trigo (*Triticum aestivum* L.); (iii) Avaliar a resistência a *Septoria tritici* em progênies F₁₁ de trigo derivadas do cruzamento Tadinia x (Yecora rojo x UC554) em diferentes estádios fenológicos visando posterior análise com marcadores moleculares e (iv) Detectar genes de resistência a *Septoria tritici* através de marcadores microssatélites e AFLPs nestas progênies. A técnica de mapeamento empregada foi a do *Bulked Segregant Analysis*, ou análise da mistura de DNA de indivíduos segregantes. Os agrupamentos (extremos) foram constituídos

com base em avaliações da resistência realizadas em casa de vegetação e campo, envolvendo três estádios fenológicos: plântula, perfilhamento e folha bandeira e dois anos agrícolas (1999 - 2000). Os extremos foram analisados com marcadores microssatélites e AFLPs. Foram feitos testes com 307 *primers* de microssatélites pertencentes às séries wms e wmc, selecionando 262 *primers* polimórficos. Na análise com marcadores AFLPs, foram utilizadas combinações de dois *primers* seletivos *Pst* I com dez *primers Msel*. Foram detectadas diferenças altamente significativas ($p \leq 0,0001$) entre progênies para área foliar lesionada (AFL) em todos os estádios fenológicos estudados. Análises de variância conjuntas para AFL indicaram uma interação significativa entre progênies e estádios fenológicos ($p \leq 0,0001$), indicando a necessidade de se avaliar a resistência em mais de um estágio fenológico para garantir a correta seleção de genótipos resistentes. Foram detectadas variações na agressividade entre isolados de *Septoria tritici* e especialização fisiológica dos mesmos, sugerindo a necessidade de testes de patogenicidade como uma prioridade na seleção de materiais de trigo resistentes a este patógeno, já que a agressividade de cada isolado pode variar significativamente de acordo com o genótipo do hospedeiro, acarretando problemas na avaliação e seleção de genótipos resistentes. Não foi possível detectar genes de resistência na população Tadinia x (Yecora rojo x UC554). Três fatores podem ser apontados como responsáveis por este insucesso: 1) população de mapeamento derivada de cruzamento triplo; 2) presença de progênies não pertencentes ao cruzamento (fora do tipo) e 3) comportamento não esperado do parental UC554 em relação à resistência a *Septoria tritici*.

**DETECTION OF RESISTANCE GENES TO *Septoria tritici* Rob.
IN WHEAT [*Triticum aestivum* (L.)]**

Author: JORGE OMAR GIECO

Adviser: Prof. Dr. LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

SUMMARY

Leaf blotch caused by *Septoria tritici* Rob. is one of the most important diseases of wheat in more than 50 countries, being responsible for significant yield losses. The objectives of the present work were: (i) To study the interaction between resistance x phenological stage in the pathosystem wheat - *Septoria tritici* in 77 F₁₁ progenies of wheat derived from the three-way cross Tadinia x (Yecora rojo x UC554); (ii) To Determine the degree of physiologic specialization among Argentinean and USA isolates of *Septoria tritici* through inoculation on cultivars and lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L.); (iii) To evaluate the resistance to *Septoria tritici* in F₁₁ wheat progenies derived from the three-way cross Tadinia x (Yecora rojo x UC554) in different phenological stages seeking the subsequent analysis with molecular markers, and (iv) To detect resistance genes to *Septoria tritici* through microsatellites and AFLP markers. The mapping technique used was Bulk Segregant Analysis, or analysis of mixtures of DNA of segregant individuals. Bulk extremes were composed based on greenhouse and field disease assessments made in three phenological stages: seedling, tillering and flag leaf, and two years (1999-2000).

Resistant and susceptible extremes were analyzed with microsatellites and AFLP markers. 307 microsatellite primers belonging to the series wms and wmc were used, from which 262 polymorphic ones were chosen for further analysis. In the analysis with AFLP markers, combinations of two *Pst*I with ten *Mse*I selective primers were used. Highly significant differences for damaged leaf area were found ($p \leq 0.0001$) among progenies in all phenological stages studied. Joint analyses of variance for DLA indicated a highly significant interaction between progenies and phenological stages ($p \leq 0.0001$), indicating the need to evaluate resistance in more than one phenological stage to guarantee the correct selection of resistant genotypes. Variations in aggressiveness among strains of *Septoria tritici* were detected, indicating the need of pathogenicity tests as a priority in the selection of resistant wheat materials, since the aggressiveness of each isolate can vary significantly depending on the host genotype. It was not possible to detect resistance genes in the population Tadinia x (Yecora rojo x UC554). Three factors can be pointed as responsible for this failure 1) Employment of a three way cross mapping population; 2) Presence of out-of- type progenies, and 3) Unexpected behavior of UC554 when inoculated with *Septoria tritici*.

1 INTRODUÇÃO

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de maiores rendimentos de trigo estão as ferrugens e manchas foliares. No grupo das manchas foliares destacam-se, por sua importância econômica, as septorioses das folhas e das glumas e nós (*Septoria tritici* e *Stagonospora nodorum* ex. *Septoria nodorum*, respectivamente). A mancha foliar, provocada por *Septoria tritici* Rob., é uma das principais doenças do trigo em mais de 50 países, destacando-se EUA, Canadá, Egito, Argentina, Uruguai, Brasil e diversos países da Europa (Eyal et al., 1985). As primeiras tentativas de obtenção de cultivares resistentes a esta doença foram através de métodos clássicos de estudo da herança e cruzamentos com materiais resistentes (Somasco et al., 1996).

Septoria tritici é essencialmente um patógeno de folha e raramente causa manchas nas glumas. Nos estádios iniciais, as manchas foliares são amarelo-claras, pequenas, globosas ou oblongas, às vezes lineares e mais estreitas que as manchas de *Stagonospora nodorum*. Nos estádios mais avançados de infecção, as manchas se tornam quase paralelas às nervuras e freqüentemente não se observam lesões distintas nos estádios mais avançados. Folhas intensamente infectadas ficam com cor pálida e apresentam numerosos picnídios. Os picnídios são espalhados, negros e proeminentes. A infecção pode cobrir toda a folha e bainha. As lesões tornam-se salpicadas devido aos numerosos picnídios. Em virtude disso, a doença é também conhecida como “mancha foliar salpicada” (*speckled leaf blotch*) (Wiese, 1977; Mehta, 1978; Gair et al., 1987). Sob condições favoráveis, a forma perfeita

Mycosphaerella graminicola (Fuckel) Schoeter também provoca severas epifitias que resultam em reduções na produtividade que podem superar 60% (Ziv & Eyal, 1978; Eyal et al., 1985). No Brasil, a doença ocorre principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, nas regiões de Ponta Grossa, Guarapuava e Cascavel (Mehta, 1978).

O aumento da incidência da mancha foliar nos últimos 20 anos foi devido à substituição das variedades locais adaptadas de trigo por cultivares exóticos de alto rendimento, baixa estatura e maturação precoce (King et al., 1983). De modo geral, os dois últimos caracteres apresentam uma correlação positiva com suscetibilidade a manchas foliares (Eyal, 1981; Ziv et al., 1981). Além disso, a modificação das práticas de cultivo tais como o plantio direto, aplicação de fertilizantes nitrogenados e irrigação, contribuíram para o incremento da severidade da doença (Eyal et al., 1987).

Dada a relevância do problema, é de grande interesse o desenvolvimento de estratégias para controlá-lo. Entre as estratégias disponíveis de combate a doenças destaca-se o controle genético, por ser o meio mais adequado no que se refere à estabilidade, economia, especificidade e impacto ambiental. Por sua vez, no campo do melhoramento genético para resistência a doenças, as técnicas de seleção assistida por marcadores moleculares têm demonstrado grande utilidade tanto na cultura do trigo quanto em várias culturas como milho, arroz, soja, aveia, cevada, centeio, algodão e numerosas espécies de hortaliças tais como alface, tomate, repolho, berinjela, feijão e batata (Diers et al., 1992; Mahalingam & Skorupta, 1995; Rao-Arelli et al., 1994; Agrama & Mousa, 1996; Ferreira et al., 1995a, 1995b; Saghai-Marroof et al., 1996; Assigbetse et al., 1994; Miklas et al., 1996; Boscarriol et al., 1998).

As primeiras tentativas de obter resistência genética a esta doença foram através de métodos clássicos de estudo da herança e cruzamentos com materiais resistentes (Gilchrist & Scharen, 1988; Jlibene et al., 1994; Somasco et al., 1996). Atualmente, com o auge dos métodos moleculares, surge a possibilidade de detectar e mapear genes que conferem resistência e

implementar esquemas de seleção assistida, visando piramidar genes com maior efeito na resistência a *Septoria tritici*. Porém, trabalhos objetivando detectar genes de resistência a este patógeno em trigo através de técnicas moleculares são escassos na literatura.

Os objetivos específicos desta tese foram:

- (i) Analisar o comportamento da resistência a *Septoria tritici* Rob em 77 progênies F₁₁ de trigo derivadas do cruzamento Tadinia x (Yecora rojo x UC554) nos estádios fenológicos de plântula, perfilhamento e folha bandeira.
- (ii) Determinar se existe especialização fisiológica entre isolados de *Septoria tritici* através da análise de sua agressividade em cultivares e linhagens de trigo (*Triticum aestivum* L.).
- (iii) Avaliar a resistência a *Septoria tritici* Rob. em progênies F₁₁ de trigo derivadas do cruzamento Tadinia x (Yecora rojo x UC554) visando a formação de extremos (resistente e suscetível) para posterior análise com marcadores moleculares.
- (iv) Detectar genes responsáveis pela resistência a *Septoria tritici* Rob. em progênies F₁₀ de trigo derivadas do cruzamento Tadinia x (Yecora rojo x UC554), através de marcadores microssatélites e AFLPs, empregando a técnica de *Bulked Segregant Analysis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resistência Genética

A resistência genética a *Mycosphaerella graminicola* (anamorfo *Septoria tritici*) é geralmente expressa através da redução da área foliar coberta com picnídios, redução da área foliar necrosada ou ambas. Escalas de notas para registrar a severidade da doença foram elaboradas por Ziv & Eyal (1978) e Eyal & Brown (1976) (Tabela 1).

Tabela 1. Escalas de Ziv & Eyal (1978) e Eyal & Brown (1976) utilizadas na avaliação da severidade da doença a *Septoria tritici*.

Escala de Ziv & Eyal (1978)		Escala de Eyal & Brown (1976)	
Severidade	% AFL ^a	Severidade	% AFL ^b
0	0	0	0
1	5	1	12
2	20	2	25
3	50	3	50
4	70	4	75
5	100	5	87

^a: Percentagem da área foliar coberta de lesões necróticas e cloróticas;

^b: Percentagem da área foliar coberta de picnídios.

Quanto à herança da resistência, vários autores sugeriram a herança simples ou monogênica do caráter (Rillo & Caldwell, 1966; Rosielle & Brown, 1979; Lee & Gough, 1984; Potts & Hughes, 1987). Eyal (1981), por sua vez, relatou a presença de diversos genes com efeitos aditivos, dominantes e parcialmente dominantes, assim como genes recessivos e modificadores condicionando a resistência.

Existe uma aparente discrepância entre o número e tipo de gene(s) que governam a resistência a septoriose em trigo. Narvaez & Caldwell (1954) empregando a cultivar 'Nabob' encontraram uma resistência do tipo qualitativa envolvendo dois genes parcialmente dominantes de efeitos aditivos. Porém no mesmo estudo, estes autores determinaram que a resistência a septoriose nas cultivares 'Lerma 52' e 'P14' é condicionada por um único gene dominante. Rosielle & Brown (1979) indicaram que a resistência na cultivar 'Seabreeze' é controlada por três genes recessivos. Wilson (1979), por sua vez, relatou a presença de um único par de genes dominantes nas cultivares 'Veranopolis' e 'Israel 493'. Semelhante aos resultados de Wilson (1979), Lee & Gough (1984) encontraram que a resistência presente na cultivar 'Carifen 12' é conferida por um único par gênico no estado dominante. Às mesmas conclusões chegaram Rillo & Caldwell (1966) estudando a herança da resistência da septoriose em 'Bulgaria 88'. Somasco et al. (1996), efetuando um estudo de herança da resistência, determinaram que 'Tadinia' carrega um gene de resistência de efeito principal denominado *Stb4* (*Septoria tritici blotch 4*). Jlibene et al. (1994) indicaram a presença de uma resistência poligênica ou quantitativa em três linhagens de trigo de primavera, enfatizando que os efeitos gênicos aditivos foram mais importantes que os não-aditivos. Simon & Cordo (1998) estudaram quatro componentes da resistência a *Septoria tritici*: período de incubação, período latente, período de maturação e área foliar coberta com picnídios em quatro cultivares de trigo, empregando um esquema de cruzamentos dialélicos ('Don Ernesto INTA', 'Buck Naposta', 'Klein Toledo' e 'Marcos Juarez INTA'). Os autores detectaram diferenças significativas entre cruzamentos para período de incubação, período latente e área foliar coberta com picnídios. A capacidade de combinação geral (CCG) foi significativa e predominante para período de incubação, período latente e área foliar coberta com picnídios. A capacidade de combinação específica (CCE) foi significativa para período de incubação e período latente. Confirmaram também uma predominância da variância genética aditiva para todos os caracteres analisados.

2.2 Genoma de trigo

O trigo é um alohexaplóide ($2n=6x=42$, sendo $x=7$) composto por três genomas (A, B e D), integrando um genoma extremamente grande com 16×10^9 pb por complemento haplóide (Bennet & Smith, 1976). Cerca de 80% desse DNA é repetitivo. Os cromossomos formam grupos homeólogos, isto é, cada cromossomo integrante de cada genoma mantém uma homologia com seus respectivos cromossomos nos outros dois genomas, embora pertencendo a diferentes espécies parentais. Exemplificando, o cromossomo 1A é homeólogo do 1B e do 1D. A complexidade genômica do trigo deriva de sua origem, envolvendo o cruzamento de espécies silvestres do gênero *Triticum*, seguido de duplicação espontânea dos cromossomos dos híbridos estéreis gerados (Figura 1).

Toda esta complexidade genômica acaba dificultando a análise do genoma com marcadores moleculares, resultando em padrões de bandas complexos derivados da amplificação de mais de um loco tanto nos cromossomos homeólogos (marcador wms33*, por exemplo) como fora dos mesmos (wms497*; wms666*; wms264*; wms274* e wms131*) (Figura 2). O completo entendimento da complexa estrutura genômica do trigo é quesito prioritário nos estudos com marcadores moleculares objetivando detecção e mapeamento de genes.

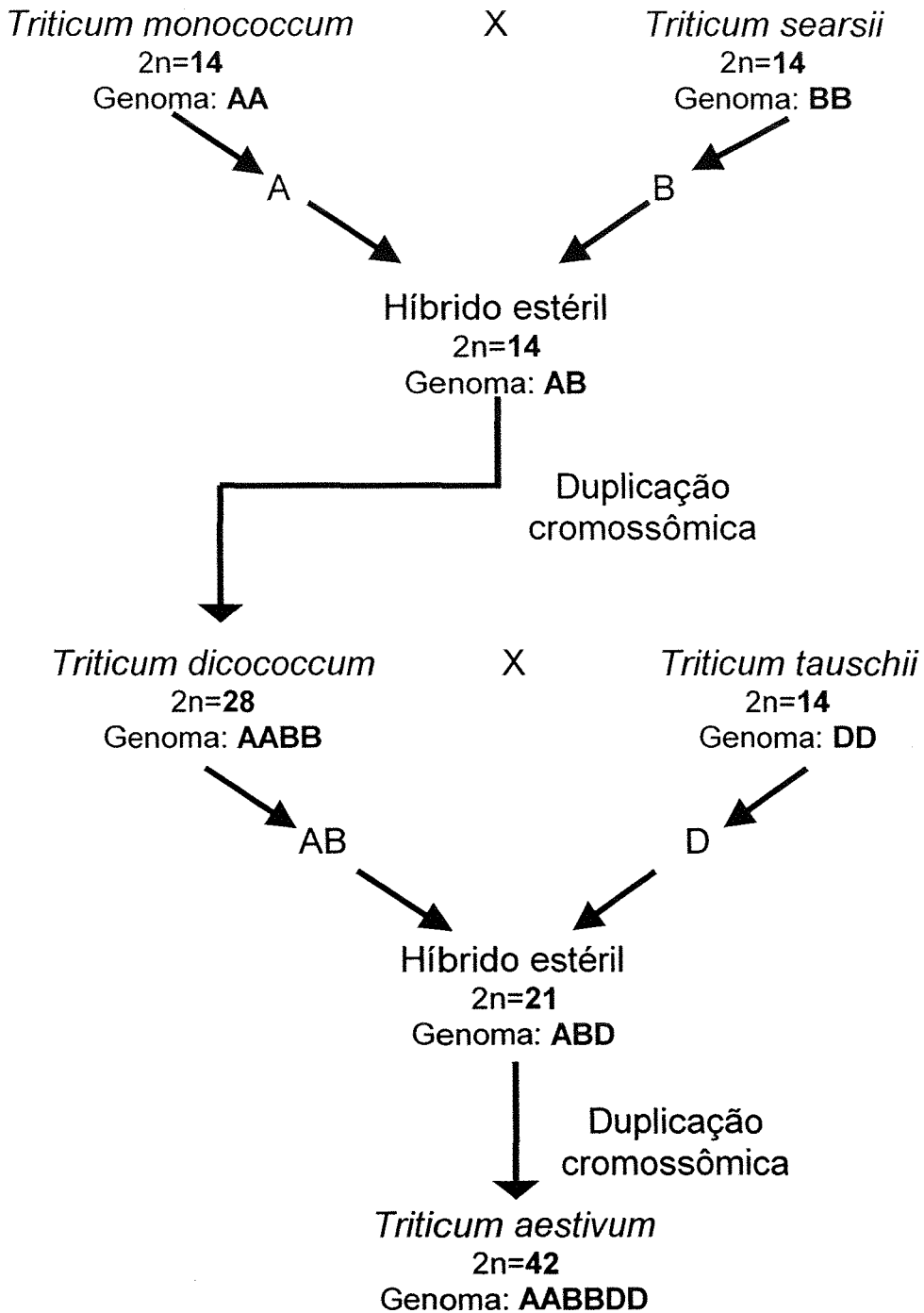


Figura 1 - Origem do trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L.) segundo Kihara¹ (1919) citado por Peterson (1965).

¹ KIHARA, H. Über cytologische Studien bei einigen Getreidearten. I. Spezies-Bastard des Weizens und Weizenroggen-Bastard. Bot. Mag., Tokio, v.33, p.17-38, 1919.

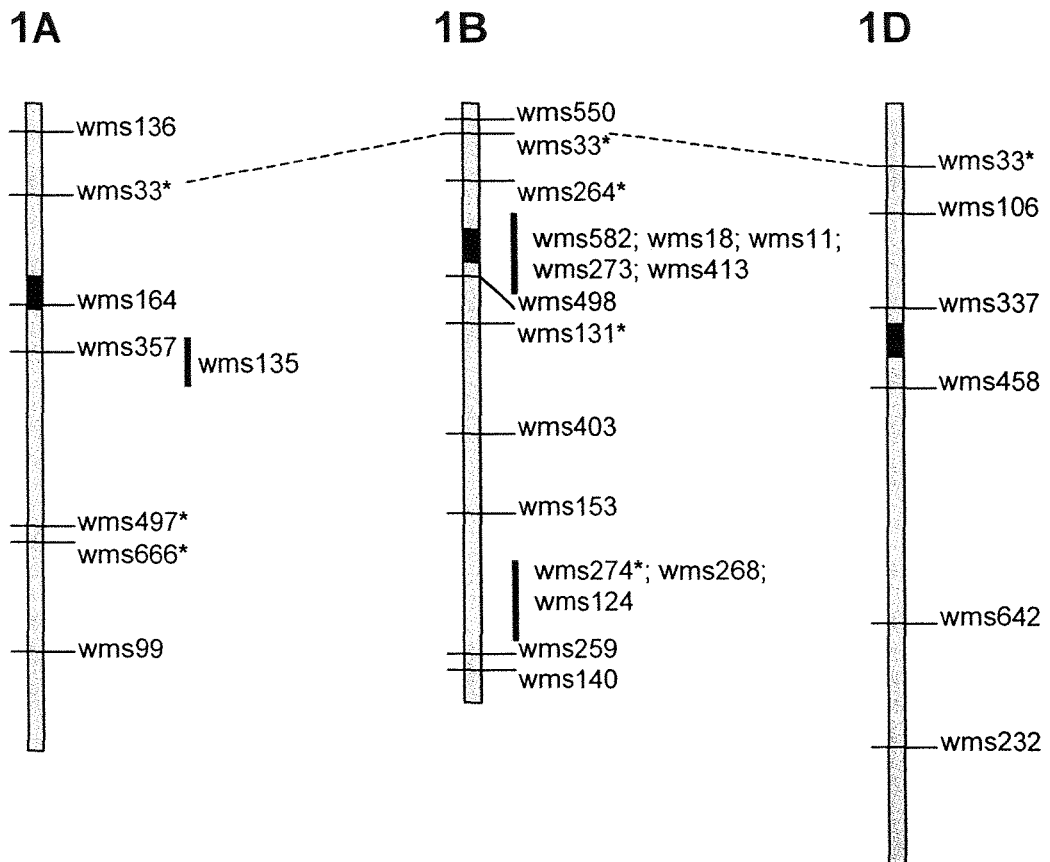


Figura 2 - Homeologia dos cromossomos de trigo 1A, 1B e 1D e microsatélites mapeados nos mesmos (Röder et al., 1998). Microsatélites que amplificam mais de um loco estão marcados com asterisco.

2.3 Análise genômica através de marcadores moleculares

No que se refere a estratégias de mapeamento, as mais utilizadas são a do mapeamento tradicional, onde todos os indivíduos da população são genotipados com marcadores moleculares e a técnica de *Bulk Segregant Analysis* (BSA), proposta por Michelmore et. al. (1991). A primeira estratégia exige mais trabalho e tempo; em compensação, a chance de se detectar genes de resistência ligados a um determinado marcador molecular é maior. Outra vantagem é a possibilidade de detecção de genes de efeito menor. Em contraposição, a técnica de BSA permite uma rápida detecção dos genes de

resistência através da simplificação do trabalho de mapeamento determinado pela formação e posterior análise dos bulks com marcadores moleculares. A análise dos bulks agiliza grandemente o processo, diminuindo o tempo necessário para detectar genes de resistência. Em compensação, pela natureza intrínseca da técnica (formação de extremos) há uma maior chance de se detectar genes de efeito maior em detrimento de genes de efeito menor.

O objetivo da técnica de BSA consiste em detectar diferenças entre duas amostras agrupadas de DNA obtidas de uma população segregante. Estas amostras agrupadas são compostas misturando-se quantidades iguais de DNA de indivíduos selecionados com base na expressão fenotípica de um caráter (neste caso resistência à doença), para se ter um genótipo idêntico em uma região genômica de interesse ("região alvo") e genótipos ao acaso em regiões não ligadas à região alvo. Assim, as duas amostras de DNA tendem a diferir somente na região selecionada (apresentam polimorfismo) e serão monomórficas para todas as outras regiões (Figura 3). A seleção de indivíduos para constituir as amostras agrupadas (*Bulks*) é feita identificando os fenótipos extremos de uma população segregante para a característica de interesse. O DNA das linhagens progenitoras e as duas amostras agrupadas (*bulk* resistente e *bulk* suscetível) é então testado com um certo número de marcadores, buscando-se aqueles que apresentem bandas presentes em uma amostra e ausentes na outra e verificando-se a origem parental do marcador. Esta evidência preliminar de ligação gênica entre o marcador polimórfico e o loco alvo é confirmada através de uma análise de segregação, utilizando-se todos os indivíduos da população segregante em um teste tradicional de co-segregação genética entre marcador e fenótipo. A ligação gênica é confirmada ou não e, em caso positivo, a frequência de recombinação entre o marcador e o loco genético que controla o caráter pode ser calculada.

2.4 Microssatélites

O genoma de eucariotos contém uma classe especial de seqüência de DNA repetida denominada microssatélite (Litt & Luty, 1989) ou seqüências simples repetidas (Tautz et al., 1986). Microssatélites são compostos por motivos menores que seis pares de bases repetidos em tandem. Atualmente, são considerados como um dos mais importantes marcadores moleculares em numerosos genomas de espécies superiores (Wang et al., 1994).

A análise de microssatélites baseia-se na reação em cadeia por polimerase (PCR), a qual é muito mais fácil de ser realizada comparado à técnica de RFLPs. Em plantas, microssatélites são, de modo geral, altamente informativos, loco-específicos e codominantes (Lagercrantz et al., 1993; Wu & Tanksley, 1995; Liu et al., 1996; Provan et al., 1996). Devido ao fato de serem multialélicos, microssatélites têm um grande potencial em estudos de evolução e parentesco genético (Buchanan et al., 1994).

Uma desvantagem dos microssatélites é a distribuição desigual dos mesmos ao longo dos cromossomos, tendendo a se concentrar em áreas pericentroméricas e teloméricas, existindo consideráveis espaços nos braços cromossômicos não preenchidos pelos mesmos (Röder et al., 1995). Nos estudos de detecção e mapeamento de genes surge assim a necessidade de combinar estes marcadores com outros, como por exemplo AFLPs, de distribuição aleatória no genoma, com a finalidade de atingir regiões cromossômicas não cobertas por microssatélites.

Os microssatélites exibem um maior nível de polimorfismo em trigo hexaplóide quando comparados com outros marcadores moleculares (Röder et al., 1995; Bryan et al., 1997). Em contraposição, o desenvolvimento de microssatélites em trigo é extremamente demorado e caro devido basicamente ao grande tamanho do seu genoma. Somente 30% de todos os primers desenvolvidos para amplificar seqüências microssatélites são funcionais e apropriados para estudos genéticos (Röder et al., 1995; Bryan et al., 1997).

Na literatura existem trabalhos exemplificando a utilização bem sucedida de marcadores microssatélites na detecção de genes de resistência. Ogliari (1999) identificou um monogene que confere resistência a *Exserohilum turcicum* em milho. Locos de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em milho foram identificados por Brunelli (2000). Chantret et al. (2000) identificaram e mapearam um QTL que confere resistência *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* em trigo.

2.5 AFLPs

AFLPs (*Amplified fragment length polymorphism*) ou polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição amplificados são marcadores dominantes de distribuição aleatória no genoma. A técnica de AFLP está baseada na amplificação seletiva via PCR dos fragmentos de restrição obtidos da digestão total do DNA genômico. A técnica envolve basicamente três etapas: 1) Restrição do DNA e ligação de oligonucleotídeos denominados adaptadores; 2) Amplificação seletiva dos conjuntos de fragmentos de restrição e 3) Separação dos fragmentos amplificados em um gel para sua posterior análise. A amplificação via PCR dos fragmentos de restrição é conseguida usando o adaptador e a seqüência do sítio de restrição como sítios alvo para o anelamento dos primers. A amplificação seletiva é possibilitada através do uso de *primers* que realizam a extensão dos fragmentos de restrição, amplificando somente aqueles fragmentos nos quais o comprimento da parte variável dos *primers* complementa-se com os nucleotídeos que flanqueiam os sítios de restrição. O número de fragmentos que podem ser analisados simultaneamente depende da resolução do sistema de detecção empregado, mas em média 50-100 fragmentos de restrição são amplificados e detectados utilizando géis desnaturantes de poliacrilamida. A técnica de AFLPs constitui-se assim numa poderosa ferramenta de *fingerprinting* para DNAs de qualquer origem e complexidade (Vos et al., 1995). Em trigo hexaplóide, é possível obter em

média 80-100 fragmentos por amplificação seletiva, dos quais entre 20 e 30 deverão ser polimórficos.

Marcadores AFLPs têm sido empregados com sucesso na detecção de genes de resistência a doenças e pragas em numerosas espécies de interesse agrícola. Em batata, foi detectado o gene *Gpa2* que confere resistência ao nematóide do cisto (*Globodera rostochiensis*) (Roupe et al., 1997). Em tomate, foi detectado o gene *Cf-9* que confere resistência ao fungo *Cladosporium fulvum*.(Colwyn et al., 1995).

3 INTERAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA A *Septoria tritici* E ESTÁDIOS FENOLÓGICOS EM TRIGO

Resumo

Estudos destinados a entender o comportamento deste patógeno em relação a seu hospedeiro são o ponto de partida para qualquer programa de melhoramento cujo objetivo é obter cultivares resistentes. O presente trabalho analisou a resistência a *Septoria tritici* Rob em 77 progênies F₁₁ de trigo derivadas do cruzamento Tadinia x (Yecora rojo x UC554) nos estádios fenológicos de plântula, perfilhamento e folha bandeira. Para tal, foram conduzidos três experimentos de campo, onde as plantas foram inoculadas em um dos estádios fenológicos acima mencionados através da pulverização com uma suspensão de conídios. Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, onde as parcelas experimentais foram constituídas por uma fileira de um metro de comprimento contendo oito plantas, com um espaçamento de 0,17 m entre linhas e 0,13 m entre plantas. As avaliações da severidade da doença foram feitas registrando-se a área foliar coberta por lesões necróticas e cloróticas, nos estádios de plântula e perfilhamento e área foliar coberta por picnídios no estádio de folha bandeira-floração com auxílio de escalas de notas. Foram detectadas diferenças altamente significativas ($p \leq 0,0001$) entre progênies para área foliar lesionada (AFL) nos estádios fenológicos estudados. Análises de variância conjuntas para AFL indicaram uma interação significativa entre progênies e estádios fenológicos ($p \leq 0,0001$) para todas as combinações binárias analisadas (plântula-perfilhamento, plântula-folha bandeira e perfilhamento-folha bandeira)

assim como também para a combinação tripla envolvendo os três estádios fenológicos. Estes resultados indicam a necessidade de se avaliar resistência em mais de um estágio fenológico para garantir a correta seleção de genótipos resistentes.

INTERACTION BETWEEN RESISTANCE TO *Septoria tritici* AND PHENOLOGICAL STAGES IN WHEAT

Summary

Leaf blotch caused by *Septoria tritici* Rob. is one of the most important diseases of wheat in more than fifty countries. Studies dedicated to understanding the behavior of this pathogen in relation to its host are the starting point for any breeding program aimed to develop resistant cultivars. The objective of this study was to analyze the resistance to *Septoria tritici* Rob in 77 F₁₁ progenies of wheat derived from the three-way cross Tadinia x (Yecora rojo x UC554) in the phenological stages of seedling, tillering, and flag leaf. Three field experiments were conducted where plants were artificially inoculated at one of the above-mentioned phenological stages by spraying with a suspension of conidia. A randomized block design with four replications was used in each experiment, where the experimental units consisted of 1-m rows, each containing eight plants, with a spacing of 0.17 m between rows and 0.13 m between plants. Disease evaluations were made by measuring the foliar area covered with chlorotic and necrotic lesions in the seedling and tillering stages and the leaf area covered with pycnidia in the flag leaf stage using disease-rating scales. Highly significant differences ($p \leq 0.0001$) were detected among progenies for Damaged Leaf Area (DLA) in all phenological stages. Joint analysis of variance for DLA indicated significant interactions between progeny and phenological stage ($p \leq 0.0001$) for all binary combinations analyzed

(seedling-tillering, seedling-flag leaf and tillering-flag leaf) as it also did for the triple combination involving the three phenological stages. These results indicate the necessity to evaluate resistance in more than one phenological stage in order to guarantee the correct selection of resistant genotypes.

3.1 Introdução

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de maiores rendimentos na cultura do trigo estão as ferrugens e septorioses das folhas e das glumas e nós. A mancha foliar provocada por *Septoria tritici* Rob. é uma das principais doenças do trigo em mais de 50 países, destacando-se EUA, Canadá, Egito, Argentina, Uruguai, Brasil e diversos países da Europa (Eyal et al., 1985).

Este fungo é essencialmente um patógeno de folha e raramente causa manchas nas glumas. Nos estádios iniciais da doença, as manchas são amarelo-claras, pequenas, globosas ou oblongas, às vezes lineares. Nos estádios mais avançados de infecção, as manchas se tornam quase paralelas às nervuras e podem cobrir toda a folha e bainha. Folhas intensamente infectadas ficam com coloração pálida e apresentam numerosos picnídios. Estes são dispersos, negros e proeminentes e conferem um aspecto salpicado à lesão. Em virtude disso, a doença é também conhecida como “mancha foliar salpicada” (*speckled leaf blotch*) (Wiese, 1977; Mehta, 1978; Gair et al., 1987). Sob condições favoráveis, *Septoria tritici* provoca severas epifitias que resultam em reduções na produtividade que podem superar 60% (Ziv & Eyal, 1978; Eyal et al., 1985). No Brasil, a doença ocorre principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, podendo causar perdas da ordem de 40-62% (Mehta, 1978).

O aumento da incidência da mancha foliar nos últimos 20 anos foi devido à substituição das variedades locais adaptadas de trigo por cultivares exóticas de alto rendimento, baixa estatura e maturação precoce (King et al., 1983). De

modo geral, os dois últimos caracteres apresentam uma correlação positiva com suscetibilidade a manchas foliares (Eyal, 1981; Ziv et al., 1981). Além disso, a modificação das práticas de cultivo, tais como plantio direto, aplicação de fertilizantes nitrogenados e irrigação, contribuíram para o incremento da severidade da doença (Eyal et al., 1987).

A resistência a *Septoria tritici* é geralmente expressa através da redução da área foliar coberta com picnídios, redução da área foliar necrosada ou ambas. Existe uma aparente discrepância entre o número e tipo de gene(s) que governam a resistência a septoriose em trigo. Narvaez & Caldwell (1954), Rillo & Caldwell (1966), Wilson (1979), Lee & Gough (1984), Somasco et al. (1996), analisando diferentes cultivares de trigo, encontraram resistência do tipo qualitativa, controlada por um a três genes de efeito principal. Rosielle & Brown (1979) indicaram a presença de três genes recessivos de resistência na cultivar 'Seabreeze'. Jlibene et al. (1994) e Simon & Cordo (1998), indicaram a presença de uma resistência quantitativa ou poligênica em variedades de primavera, enfatizando que os efeitos gênicos aditivos foram mais importantes que os não-aditivos.

Dada a relevância econômica da doença, é de grande interesse o desenvolvimento de estratégias para controlá-la. Entre as estratégias disponíveis, a resistência genética destaca-se como sendo a mais adequada no que se refere à estabilidade, economia, especificidade e impacto ambiental. O ponto de partida para qualquer programa de melhoramento que objetive obter materiais resistentes é a correta avaliação dos genótipos. Neste ponto, não somente é importante a escolha da metodologia de inoculação adequada para cada doença, mas também é fundamental a escolha da época ou estágio fenológico no qual a inoculação será feita. Porém, trabalhos objetivando verificar a variação da resistência a *Septoria tritici* Rob. em função dos diferentes estádios fenológicos do hospedeiro são escassos na literatura.

O objetivo do presente trabalho foi analisar o comportamento da resistência a *Septoria tritici* Rob. em progênies F_{11} de trigo derivadas do

cruzamento Tadinia x (Yecora rojo x UC554) nos estádios fenológicos de plântula, perfilhamento e folha bandeira/floração.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal

Foi utilizada uma população segregante composta por 77 famílias F_{11} , derivadas do cruzamento triplo Tadinia x (Yecora rojo x UC554) desenvolvida empregando o método de *bulk*, onde o avanço das gerações segregantes envolveu autofecundações sucessivas em ausência de seleção. 'Tadinia' é considerado resistente e 'Yecora rojo' susceptível e 'UC 554' moderadamente resistente a *Septoria tritici*.

3.2.2 Avaliação da resistência

Três experimentos foram conduzidos no campo experimental da Seção de Fitopatologia (ESALQ/USP) em Piracicaba, utilizando um delineamento experimental do tipo blocos completos aleatorizados com quatro repetições. Em cada experimento as plantas foram inoculadas em um determinado estágio fenológico (plântula, perfilhamento ou folha bandeira). As unidades experimentais consistiram em fileiras de 1 m de comprimento separadas por 0,17 m, cada uma delas contendo oito plantas. Cada bloco foi composto por 77 progênies e os três progenitores. Na periferia de cada bloco foi plantada a testemunha susceptível 'Cooperación Calquin' como linha disseminadora da doença.

No caso específico dos ensaios de plântula e perfilhamento, as progênies foram semeadas em Julho de 2000 e inoculadas 7 e 25 dias após o plantio, respectivamente, enquanto que no experimento de folha bandeira, as progênies foram semeadas em Junho e inoculadas 70 dias após o plantio.

As plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios empregando a técnica de inoculação por aspersão foliar (Dhingra & Sinclair, 1986) e utilizando uma concentração de inóculo de 10^6 - 10^8 esporos/ml. O isolado empregado nas inoculações (IPBR1) foi obtido a partir de folhas de trigo infectadas naturalmente pelo fungo. Após a inoculação, foi feita uma câmara úmida (36 h) cobrindo os blocos com um filme plástico. Trinta dias após a inoculação, a avaliação das plantas foi realizada registrando a área foliar afetada pelo fungo (AFL). Para os estádios fenológicos de plântula esta variável foi registrada como a porcentagem da área foliar coberta por lesões cloróticas e necróticas, enquanto que para o estágio de folha bandeira AFL foi registrada como a porcentagem da área foliar coberta de picnídios. Em ambos casos foram utilizadas escalas de notas, onde 0 representa ausência de sintomas e 5 indica 87-100% da área foliar coberta por lesões cloróticas e necróticas (Eyal & Brown, 1976; Ziv & Eyal, 1978).

3.2.3 Análise Estatística

Foram feitas análises da variância individuais e conjuntas. As análises conjuntas tiveram como finalidade identificar interações entre resistência de genótipos (progênies) e estádios fenológicos. Foram realizadas também análises de regressão entre severidades da doença das progênies F₁₁ inoculadas nos diferentes estádios fenológicos. Na análise dos dados foi empregado o programa estatístico SAS para windows versão 8.0 (SAS, 1999). Os gráficos das análises de regressão entre severidade da doença e estádios fenológicos foram feitos com o auxílio do programa STATISTICA para windows versão 5.0 (StatSoft, 2001).

3.3 Resultados e Discussão

Foram detectadas diferenças altamente significativas ($p \leq 0,0001$) entre progênies em todos os estádios fenológicos estudados nas análises individuais.

Observou-se uma homogeneidade dos quadrados médios dos resíduos de cada estágio fenológico, o que possibilitou a realização das anovas conjuntas (dados não mostrados).

Análises conjuntas indicaram interações altamente significativas entre progênies x estágio fenológicos ($p \leq 0,0001$) para todas as combinações binárias estabelecidas (plântula-perfilhamento; plântula-folha bandeira e perfilhamento-folha bandeira), assim como também para a combinação tripla envolvendo os três estágios fenológicos (Tabelas A1, A2, A3, A4 - Anexo 1). As análises de regressão entre AFL média das progênies F_{11} inoculadas nos diferentes estágios fenológicos indicaram também uma baixa associação entre as variáveis estudadas (Figura 1). A melhor associação foi entre resistência no estágio de plântula e perfilhamento ($R^2 = 0,34$, $p \leq 0,0001$), seguida por plântula - folha bandeira ($R^2 = 0,19$, $p \leq 0,0001$) e perfilhamento - folha bandeira ($R^2 = 0,10$, $p \leq 0,0108$).

A significância da interação genótipo x estágio fenológico, no caso particular das interações envolvendo o estágio de folha bandeira, foi determinada em grande parte por um grupo de progênies que se manifestaram como susceptíveis quando inoculadas em plântula, porém como resistentes quando inoculadas em perfilhamento e folha bandeira, não apresentando picnídios ou apresentando um baixo número destes (lesões não esporulantes). Também foram encontradas progênies que exibiram um comportamento contrário ao descrito anteriormente (Figura 2).

Estes resultados sugerem a presença de genes de resistência estágio - específicos tal como descrito em outros patosistemas envolvendo trigo. Kolmer (1997), por exemplo, estudando o patosistema trigo *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* descreveu genes distintos controlando resistência nos estágios de plântula e planta adulta, embora alguns genes que atuavam em planta adulta também foram responsáveis por parte da resistência de plântula em algumas cultivares. Resultados semelhantes foram obtidos por Torabi & Nazari (1998) analisando o comportamento de cultivares de trigo iranianos perante *Puccinia striiformis* f. sp.

tritici. Estes autores encontraram cultivares possuindo resistência de plântula, de planta adulta ou ambos tipos de resistência.

A presença de lesões não esporulantes corresponde a um fenômeno conhecido como resistência parcial e tem sido relatado no patossistema trigo-*Septoria tritici* (Simon & Cordo 1998; Zuckerman et al., 1996) assim como também nos patossistemas trigo-*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* (Pearce et al., 1996); trigo-*Xanthomonas campestris* pv. *cerealis* (Attari et al., 1996), trigo-*Stagonospora nodorum* (Du et al., 1999) e trigo-*Puccinia recondita* (Singh et al., 2001). A preservação de genótipos possuindo este tipo de resistência é altamente desejável, pois evita uma alta pressão de seleção sob o patógeno que pode levar ao aparecimento de novas raças fisiológicas.

De modo geral, não foi observada uma variação significativa do grau de resistência e/ou suscetibilidade nos progenitores em função dos diferentes estádios fenológicos analisados (Tabela 1). A aparente contradição entre a ausência de interações significativas nos progenitores e a presença nas progênies F_{11} pode ser o resultado de epistase causada por determinadas combinações de alelos presentes em certas progênies.

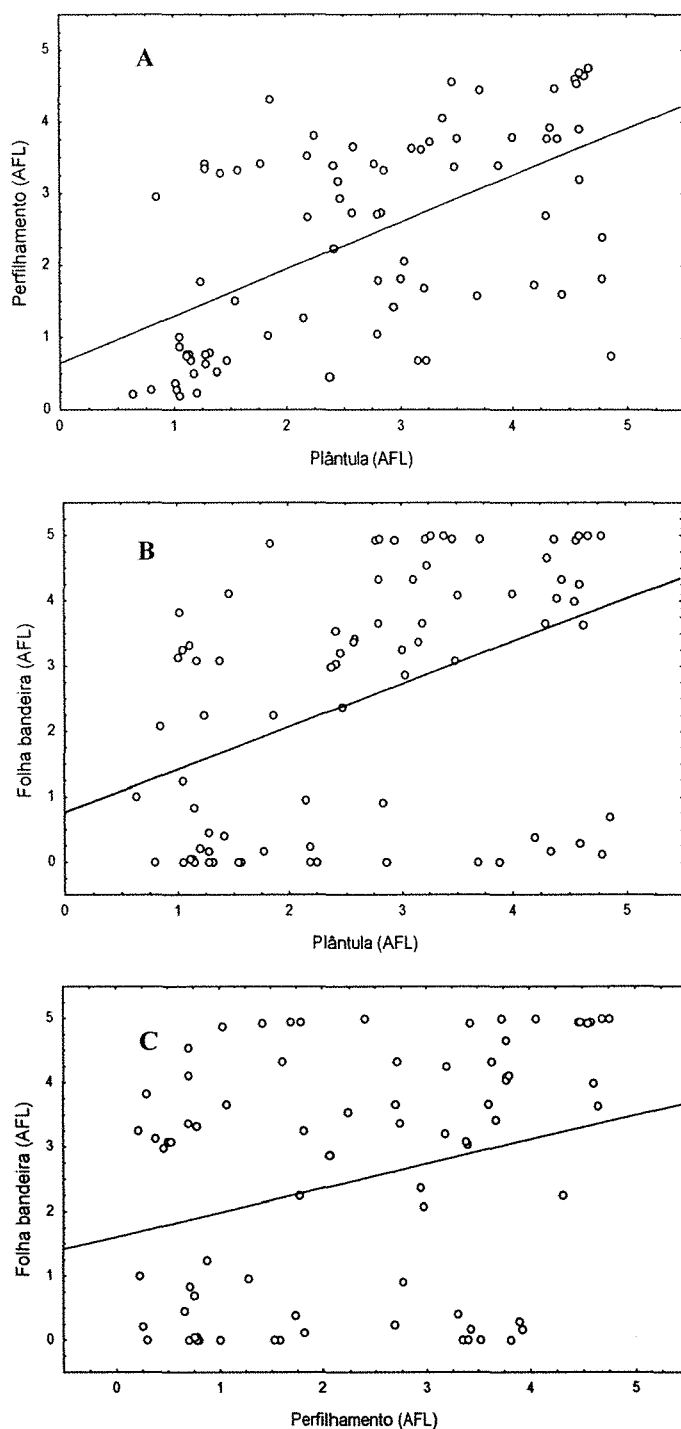


Figura 1 - Gráficos de regressão da área foliar lesionada de progênes F₁₁ de trigo inoculadas com *Septoria tritici* nos estádios fenológicos de plântula e perfilhamento (A), plântula e folha bandeira (B) e perfilhamento e folha bandeira (C).

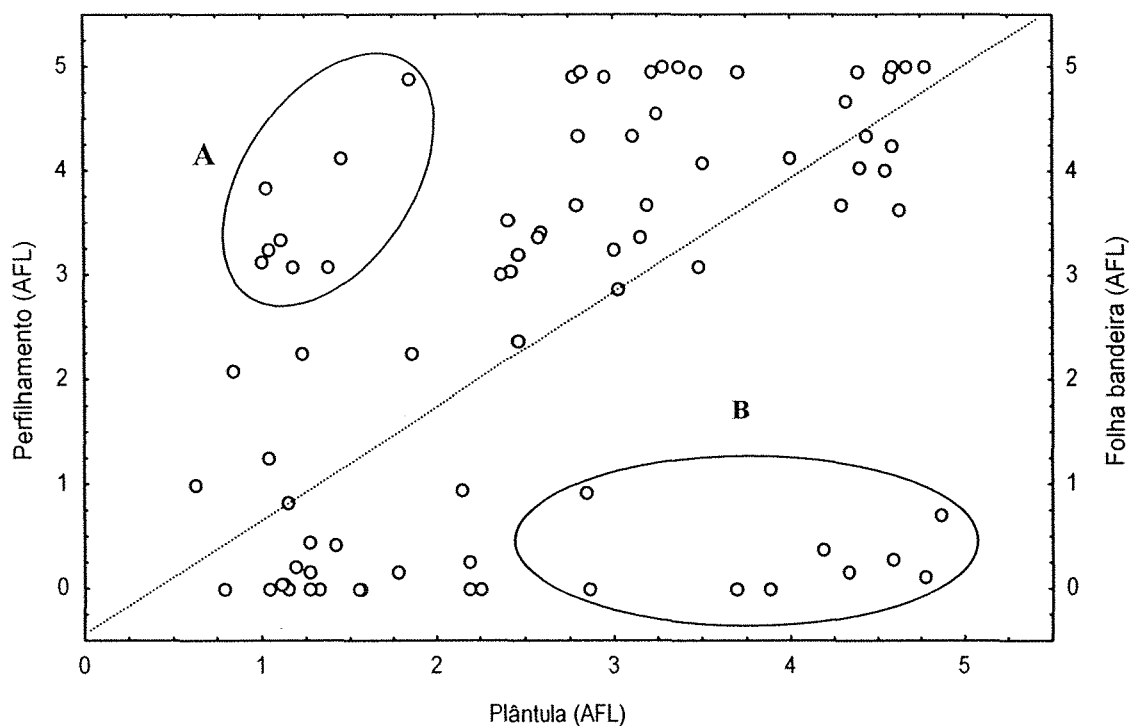


Figura 2 - Área foliar lesionada (AFL) de progênies F_{11} de trigo inoculadas com *Septoria tritici* nos estádios fenológicos de plântula, perfilhamento e folha bandeira. Os círculos ressaltam progênies resistentes quando inoculadas no estágio de plântula, mas suscetíveis em folha bandeira (A), e progênies suscetíveis no estágio de plântula, mas resistentes nos estádios de perfilhamento e folha bandeira (B).

Tabela 1. Avaliação da performance dos progenitores das progênies F11 Tadinia x (Yecora rojo x UC554) de trigo em relação ao isolado IPBR1 de *Septoria tritici*, nos estádios fenológicos de plântula e folha bandeira.

Cultivar	Plântula	Perfilhamento	Folha bandeira
	AFL	AFL	AFL
Tadinia	0,89 a*	0,86 a	1,00 a
Yecora rojo	4,44 b	4,61 b	4,92 b
UC 554	2,00 c	2,14 c	2,50 c

* Médias seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes.

Estes resultados concordam com os obtidos por Kema et al. (1997), que relataram resultados de experimentos de avaliação da resistência a 14 isolados de *Septoria tritici* de 22 cultivares de trigo nos estádios fenológicos de plântula e planta adulta. Estes autores concluíram que a reprodutibilidade dos dados em planta adulta foi alta e que uma avaliação apurada da resistência e virulência requiere tanto testes de plântula como de planta adulta.

Por outro lado, estes resultados diferem em parte dos encontrados por Somasco et al. (1996), que, obtiveram uma correlação altamente positiva entre severidade nos estádios de plântula e planta adulta ao trabalharem com progênies F₃ derivadas dos cruzamentos Tadinia x Yecora rojo e Tadinia x Inia 66R, inoculadas com *Septoria tritici* em condições de casa de vegetação e campo. Isto indica, por sua vez o fato de que as interações entre resistência a *Septoria tritici* e estádios fenológicos são função dos genótipos envolvidos.

3.4 Conclusões

Detectou-se uma interação entre resistência e estado fenológico nas progênies estudadas, indicando que há genes de resistência que atuam especificamente em determinados estádios de desenvolvimento da cultura (estádio-específicos). Diante de uma forte interação genótipo x estágio fenológico, a aplicação de uma intensidade de seleção muito alta num

determinado estágio fenológico, pode acarretar a perda de genótipos que em outros estádios, poderiam apresentar um bom desempenho. Sob estas circunstâncias é recomendável a aplicação de baixas intensidades de seleção e a avaliação das progênies em pelo menos dois estádios fenológicos diferentes.

4 VARIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E ESPECIALIZAÇÃO FISIOLÓGICA EM ISOLADOS DE *Septoria tritici* Rob.

Resumo

Testes de patogenicidade destinados a verificar o comportamento de isolados de *Septoria tritici* frente a genótipos de trigo devem ser considerados como uma prioridade na seleção de materiais resistentes, já que a agressividade de cada isolado pode variar significativamente em função do hospedeiro. O objetivo do presente trabalho foi determinar se existe variação da agressividade ou especialização fisiológica em isolados de *Septoria tritici* Rob. originários de Argentina e EUA em cultivares e linhagens de trigo (*Triticum aestivum* L.). Os experimentos foram estabelecidos em duas localidades, Castelar-Argentina e Davis-EUA. Na primeira localidade utilizou-se um delineamento experimental em parcelas divididas com quatro repetições, onde as cultivares foram aleatorizadas nas parcelas e os isolados nas subparcelas. Cada subparcela foi composta por três plantas pertencentes a uma determinada cultivar. Na segunda localidade (Davis), foi adotado um delineamento em blocos casualizados e arranjo em faixas, com seis repetições, onde as parcelas experimentais foram constituídas por um vaso contendo três plantas de cada cultivar. A inoculação foi feita no estágio fenológico de folha bandeira em ambas localidades com uma suspensão de conídios ajustada a uma concentração de 10^6 - 10^8 esporos/ml, empregando a técnica de inoculação por aspersão foliar. As avaliações foram feitas registrando-se a área foliar coberta por picnídios (AFL) no estágio de folha bandeira com auxílio de escalas de notas. Em ambas localidades foram detectadas diferenças altamente

significativas ($p \leq 0,0001$) em AFL entre cultivares. Foram também detectados efeitos significativos de isolados e da interação cultivares x isolados. Foram detectadas variações na agressividade e virulência dos isolados sugerindo a presença de resistência horizontal e vertical no material vegetal testado. Com base nestes resultados, testes de patogenicidade destinados a verificar o comportamento de isolados de *Septoria tritici* devem ser considerados como uma prioridade na seleção de materiais de trigo resistentes a este patógeno.

VARIATION IN AGGRESSIVENESS AND PHYSIOLOGICAL SPECIALIZATION AMONG ISOLATES OF *Septoria tritici* Rob.

Summary

Pathogenicity tests destined to verify the behavior of *Septoria tritici* isolates should be considered as a priority in the selection of resistant wheat materials to this pathogen, since the aggressiveness of each isolate can vary significantly, carrying problems in the evaluation and selection of resistant genotypes. The objective of this work was to determine whether physiologic specialization exists among Argentinean and USA *Septoria tritici* isolates through the analysis of their pathogenicity on cultivars and lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). The experiments were carry out in two locations, Castelar-Argentina and Davis-USA. In Castelar, a split plot design with four replications was used, where the cultivars or lines were randomized in the plots and the isolates in the subplots. Each subplot was composed of three plants belonging of a cultivar or line. In Davis, a strip split plot design with six replications was employed, where a pot containing three plants of each cultivar or line constituted the experimental plots. In both sites, the inoculation was made at the phenological stage of flag leaf through foliar aspersion of a conidial suspension adjusted to 10^6 - 10^8 conidia/ml. Evaluations were made registering the leaf area covered with pycnidia (AFL) in the flag leaf stage with the aid of

rating scales. Highly significant differences ($p \leq 0.0001$) in AFL were detected among cultivars or lines. Isolate effects and the interaction cultivar x isolate were highly significant ($p \leq 0.0001$). Variations in aggressiveness and virulence were found among the isolates, indicating the presence of horizontal and vertical resistance in the host cultivars. Based on these results, pathogenicity tests destined to verify the behavior of *Septoria tritici* isolates should be considered as a priority when selecting resistant wheat materials.

4.1 Introdução

As plantas apresentam dois tipos básicos de resistência a patógenos: resistência vertical e horizontal. Ambos tipos de resistência são definidos em termos de duas variáveis: hospedeiro e patógeno. Neste sistema, a resistência do hospedeiro à doença pode existir unicamente em duas formas alternativas. A variação registrada no hospedeiro determina a presença de resistência horizontal. A interação diferencial entre ambos, patógeno e hospedeiro, determina a existência de resistência vertical. Agressividade e virulência são termos utilizados para descrever o comportamento do patógeno na presença de resistência horizontal e vertical, respectivamente. Ambos os tipos podem coexistir, ou seja, a resistência em um hospedeiro pode ser o resultado da mescla de resistência vertical e horizontal (Vanderplank, 1984).

A resistência vertical é também conhecida no melhoramento vegetal como “específica”, sendo determinada por um ou poucos genes que conferem resistência completa a um determinado patógeno. Este tipo de resistência é geralmente de curta durabilidade, especialmente no caso de patógenos que produzem muitos esporos e se espalham rapidamente provocando epifitias, tais como ferrugens e oídios. Isto acontece pois estes patógenos possuem alta variabilidade genética. Assim, a presença de novas cultivares carregando novos arranjos de genes de resistência determina, por sua vez, a seleção de novos fatores de virulência no patógeno. Como conseqüência disto, ocorre o

aparecimento de novas raças do patógeno que possuem a capacidade de quebrar a resistência da nova cultivar. Estas novas raças se disseminam rapidamente ao ritmo em que as novas cultivares são plantadas extensivamente, de modo que num curto período de tempo (dois ou três anos de plantio comercial), estas acabam se tornando suscetíveis. Quando isto acontece, as cultivares devem ser substituídas por outras carregando novos genes de resistência. Devido a isto, este tipo de resistência é também conhecida como resistência de “curta duração”. Outras denominações deste tipo de resistência são: resistência qualitativa, monogênica ou raça-específica (Gair et al., 1987).

A resistência horizontal, por sua vez, esta usualmente associada a vários genes e confere uma resistência do tipo incompleta onde o hospedeiro é atacado pelo patógeno em maior ou menor grau, dependendo do número e tipo de genes envolvidos na mesma. Este tipo de resistência é também conhecido como resistência geral, resistência de campo, não específica, quantitativa ou poligênica. Embora a resistência horizontal seja reconhecida como uma resistência de tipo poligênico, a base genética da mesma não está claramente definida devido à existência de casos onde a resistência “geral” esteve associada a um ou poucos genes. Exemplos deste fenômeno são as resistências a *Puccinia recondita* e *Puccinia striiformis* em trigo, onde um gene maior é responsável pela resistência a várias raças do patógeno (Jacobs & Broers, 1989; Helguera et al., 2000; McIntosh, 1998; Robert et al., 2000).

Vanderplank (1984) define ambos termos em função de uma análise de variância onde o efeito principal de variedades ou cultivares determina a resistência horizontal, o efeito de isolados do patógeno determina a agressividade e a interação cultivar x isolados determina a resistência vertical e virulência.

Em trigo, ambos tipos de resistência têm sido encontrados. Narvaez & Caldwell (1954), Rillo & Caldwell (1966), Wilson (1979), Lee & Gough (1984), Rosielle & Brown (1979), Potts & Hughes (1987), Somasco et al. (1996),

analisando diferentes cultivares de trigo encontraram uma resistência do tipo qualitativa, onde um a três genes maiores seriam os responsáveis da resistência nos cultivares estudados. Por outra parte, Jlibene et al. (1994), Simon & Cordo (1998) e Eyal (1981), indicaram a presença de uma resistência poligênica ou quantitativa com predominância dos efeitos gênicos aditivos.

A presença da forma perfeita do fungo *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter tem sido relatada em diversas partes do mundo tais como Nova Zelândia (Sanderson, 1972), Austrália (Brown et al., 1978), Chile (Madariaga, 1986), Inglaterra (Scott et al., 1988), Brasil (Mehta, 1989), Holanda (Shaw & Royle, 1989), EUA - Califórnia e Oregon (Madariaga et al., 1989; Ahmed et al., 1995), Alemanha (Vereet et al., 1990) e França (Halama, 1996). A presença da forma sexuada do patógeno propicia um mecanismo adicional para incrementar sua variabilidade genética (Ahmed et al., 1995).

Evidência de interações diferenciais entre isolados de *Septoria tritici* e cultivares de trigo foram descritas em Israel, Marrocos e EUA, sugerindo a especialização fisiológica do patógeno (Eyal et al., 1973; King et al., 1983; Saadaoui et al., 1987).

O objetivo do presente trabalho foi determinar se existem variações na agressividade ou especialização fisiológica em isolados de *Septoria tritici* Rob. originários de Argentina e EUA através de inoculações em cultivares e linhagens de trigo (*Triticum aestivum* L.).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolados

4.2.1.1 Experimento 1: Castelar-Argentina

Trinta isolados de *Septoria tritici* foram testados para analisar sua patogenicidade em 11 cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) Os isolados foram cedidos pela Dra. Cristina Cordo (*Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de La Plata-Universidad Nacional de La Plata*, Buenos Aires-Argentina) e foram obtidos a partir de localidades pertencentes a regiões trigueiras da província de Buenos Aires (Tabela 1).

4.2.1.2 Experimento 2: Davis-EUA

Os isolados incluídos neste experimento foram o USA 00005 e o CA 30. O primeiro deles foi isolado da linhagem UC 1036 na localidade de Colusa (Califórnia) e cedido por Stephen B. Woodwin (*Department of Botany and Plant Pathology*, Purdue University-Indiana). O segundo isolado (CA 30) foi obtido a partir de cultivares de trigo da área experimental do *Department of Agronomy and Range Science* Davis-Califórnia e cedido para este trabalho pelo Dr. Barney Ward do *Department of Phytopathology* da Universidade da Califórnia-Davis. O isolado USA 00005 foi escolhido pois possui uma elevada agressividade, infectando Tadinia (80% de área foliar necrosada e coberta de picnídios) além de outras cultivares resistentes como Veranopolis, Frontana, IAS 20 e Bulgaria 88 (Woodwin, comunicação pessoal). O objetivo deste experimento foi verificar a agressividade do isolado USA 00005 em relação ao isolado CA 30 ao qual Tadinia, Veranopolis, Frontana, IAS 20 e Bulgaria 88 são resistentes e determinar se este isolado pode ser considerado como uma variante fisiológica de *Septoria tritici*.

Tabela 1. Cultivares e localidades de coleta dos isolados utilizados nos testes de patogenicidade (Castelar-Argentina).

Isolados de <i>Septoria tritici</i>			
Isolado	Origem-cultivar	Origem geográfica*	Ano
1: I7	Buck ñanque	Balcarce	1998
2: I6	Buck ñanque	Balcarce	1998
3: I122	Klein cacique	Barrow	1998
4: I76G	Prointa Federal	Balcarce	1998
5: I77G	Prointa Federal	Balcarce	1998
6: I27	Buck arrayán	Balcarce	1998
7: I42E	Prointa oasis	Balcarce	1998
8: I89	Klein cacique	Barrow	1998
9: I31	Prointa oasis	Balcarce	1998
10: I78G	Prointa federal	Balcarce	1998
11: I16	Buck ñanque	Balcarce	1998
12: IA1	Klein cacique	Los Hornos	1999
13: I109	Klein cacique	Barrow	1998
14: I7ñv	Buck ñanque	Balcarce	1998
15: IR7	Klein cacique	Los Hornos	1999
16: IR2	Klein cacique	Los Hornos	1999
17: I74	Prointa federal	Balcarce	1998
18: I88	Klein cacique	Alberti	1998
19: I44	Buck ñanque	Balcarce	1998
20: I1.4	Klein cacique	Los Hornos	1999
21: I108	Klein cacique	Barrow	1998
22: I2P	Prointa isla verde	Pergamino	1998
23: I13	Buck ñanque	Balcarce	1998
24: I26	Buck arrayán	Balcarce	1998
25: I12	Buck ñanque	Balcarce	1998
26: IA3	Klein cacique	Los Hornos	1999
27: I30	Buck arrayán	Balcarce	1998
28: I65G	Prointa federal	Balcarce	1998
29: I100	Klein cacique	Balcarce	1998
30: I14	Buck ñanque	Balcarce	1998

* Localidades pertencentes à província de Buenos Aires (Argentina).

4.2.2 Material vegetal

4.2.2.1 Experimento 1: Castelar-Argentina

As 11 cultivares diferenciais utilizadas neste estudo foram escolhidas pela sua reação a *Septoria tritici* em ensaios anteriores, sendo três resistentes, quatro susceptíveis, três moderadamente resistentes e uma moderadamente susceptível (Somasco et al., 1996; Simon & Cordo, 1998). A caracterização

destas cultivares incluindo origem e reação a *Septoria tritici* encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Principais características das cultivares diferenciais utilizados nos testes de patogenicidade (Castelar-Argentina).

Cultivar	Origem	Reação a <i>Septoria tritici</i>
Tadinia	UCD	R
Yecora rojo	UCD	S
UC 554	UCD	MR
INIA 66R	INIA	MR
UC 1041	UCD	R
Cooperación Maipun	Queaca	R
Cooperación Calquin	Queaca	S
Marcos Juarez INTA	INTA	S
HLP*	INTA	MR
Leones INTA	INTA	S
Baguette 12	Nidera	MS

R: resistente; S: susceptível; MR: Moderadamente resistente; MS: Moderadamente susceptível. UCD: *University of California-Davis*, EUA. Queaca: *Química Estrella-Asociación de Cooperativas Argentinas*, Argentina. INTA: *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, Argentina. Nidera: *Empresa privada*, Argentina. INIA: *Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria*, Chile.

4.2.2.2 Experimento 2: Davis-EUA

Neste estudo foram utilizadas 20 cultivares diferenciais e 10 linhas do CIMMYT resistentes a *Septoria tritici*. As cultivares foram escolhidas pela sua reação a *Septoria tritici* em ensaios anteriores, estando integrado o grupo por cultivares e/ou linhagens resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente susceptíveis e susceptíveis (Somasco et al., 1996; Simon & Cordo, 1998) (Tabela 3).

4.2.3 Avaliação da resistência

4.2.3.1 Experimento 1: Castelar-Argentina

Utilizou-se um delineamento experimental em parcelas divididas com quatro repetições, onde as cultivares foram aleatorizadas nas parcelas e os isolados nas subparcelas. Cada subparcela esteve integrada por três plantas pertencentes a uma determinada cultivar. O experimento foi conduzido na área

experimental do *Instituto de Recursos Biológicos*, INTA Castelar-Argentina. As cultivares de trigo foram semeadas em maio de 2000. A inoculação foi feita aos 70 dias após emergência (DAE), correspondente ao estágio fenológico de folha bandeira. As subparcelas de cada cultivar foram inoculadas com uma suspensão de esporos do respectivo isolado de *Septoria tritici*, empregando a técnica de inoculação por aspersão foliar (Dhingra & Sinclair, 1986). A concentração de inóculo foi de 10^6 - 10^8 esporos/ml. Após a inoculação, foi feita uma câmara úmida (36 h) cobrindo os blocos com um filme plástico. Trinta dias após a inoculação, foi feita a avaliação das plântulas registrando a área foliar coberta por picnídios (AFL) utilizando a escala de Eyal & Brown (1976).

4.2.3.2 Experimento 2: Davis-EUA

O delineamento experimental utilizado foi em faixas com seis repetições, onde os isolados foram aleatoriamente alocados a cada faixa. Cada parcela esteve integrada por um vaso contendo três plantas pertencentes a uma determinada cultivar. As cultivares de trigo foram semeadas em dezembro de 2000. O experimento foi conduzido em área de ambiente controlado (*Orchard Park*) do *Department of Agronomy and Range Science* da Universidade de Califórnia. A inoculação foi feita aos 70 DAE (estádio fenológico de folha bandeira). A técnica de inoculação e a avaliação da severidade da doença seguiram o esquema detalhado no item 4.2.3.1.

Tabela 3. Principais características das cultivares diferenciais utilizadas nos testes de patogenicidade (Davis-EUA).

Cultivar/Linhagem	Origem	Reação a <i>Septoria tritici</i>
CIMMYT 1	CYMMYT	R
CIMMYT 2	CYMMYT	R
CIMMYT 3	CYMMYT	R
CIMMYT 4	CYMMYT	R
CIMMYT 5	CYMMYT	R
CIMMYT 6	CYMMYT	R
CIMMYT 7	CYMMYT	R
CIMMYT 8	CYMMYT	R
CIMMYT 9	CYMMYT	R
CIMMYT 10	CYMMYT	R
Israel 493	UCD	R
Bulgaria 88	UCD	R
Veranopolis	UCD	R
Tadinia	UCD	R
WR 33 TA 5056	UCD	R
Chinese Spring S. 7D	UCD	R
IAS 20	UCD	R
Marcos Juarez INTA	INTA	S
Leones INTA	INTA	S
Don Ernesto INTA	INTA	R
Prointa Isla verde	INTA	S
Klein Toledo	INTA	R
Klein Atlas	INTA	S
Coop. Maipun	Queaca	R
Coop. Calquin	Queaca	S
Synthetic 43	UCD	R
Opata 85	UCD	S
UC 554	UCD	MR
INIA 66R	UCD	MR-MS
Yecora rojo	UCD	S

R: resistente; S: susceptível; MR: Moderadamente resistente; MS: Moderadamente susceptível. CIMMYT: *Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo- México*; UCD: *University of California-Davis, EUA*; Queaca: *Química Estrella-Asociación de Cooperativas Argentinas, Argentina*; INTA: *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina*.

4.2.4 Análise estatística

Foram feitas análises da variância para o caráter AFL e testes de comparação de médias (Tukey). Na análise dos dados, foi empregado o programa estatístico SAS para windows versão 8.0 (SAS, 1999).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Experimento 1: Castelar-Argentina

Na Tabela 4 são apresentados o resultados da análise da variância para o caráter AFL, envolvendo 11 cultivares de trigo e 30 isolados de *Septoria tritici*. Foram detectadas diferenças altamente significativas ($p \leq 0,0001$) entre cultivares e entre isolados. A interação cultivares x isolados também foi altamente significativa ($p \leq 0,0001$).

Tabela 4. Anova para a variável AFL.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Cultivar (C)	10	990,7712	99,0771	815,69	0,0001**
Resíduo (a)	33	4,0083	0,1214		
Isolados (I)	29	628,2090	21,6623	336,45	0,0001**
C x I	290	494,0242	1,7035	26,46	0,0001**
Resíduo (b)	957	61,6166			
Total	1319	2178,6295			

CV: 12,02; R^2 : 0,97; Média geral AFL: 2,11. FV: Fontes de variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio. ^{ns}: não significativo, *: significativo ao 5%, **: significativo ao 1%.

Os testes de comparação de médias da variável AFL para cultivares são mostrados na Tabela 5. Na mesma, é possível apreciar a AFL média para cada cultivar inoculada com 30 isolados de *Septoria tritici*. As cultivares Yecora rojo, Leones INTA, Cooperación Calquin e Marcos Juarez INTA, comportaram-se como susceptíveis; Tadinia, Cooperación Maipun, UC 1041 e HLP como resistentes e Baguette 12, UC 554 e INIA 66R manifestaram um comportamento intermediário a todos os isolados testados.

Tabela 5. Teste de Tukey para AFL envolvendo as onze cultivares diferenciais.

Cultivar	AFL
Yecora rojo	3,29 a
Leones INTA	3,12 a b
Cooperación Calquin	3,05 b
Marcos Juarez INTA	2,97 b
Baguette 12	2,73 c
INIA 66R	1,74 d
UC 554	1,54 e
HLP	1,35 e f
UC 1041	1,27 f g
Cooperación Maipun	1,10 g h
Tadinia	1,06 h

Médias seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes.

Os isolados apresentaram diferenças significativas na sua agressividade nos 11 cultivares. Os isolados I89, I42E, I14, IR2, I6, I109, I122 e I31 foram os mais agressivos. Os isolados I 109, I122, I31, I26, I76G, I77G, I30, I44, I2P, I100, I108, I13, IA3, I7, I16, I88, I7ñv, manifestaram agressividade intermediária. Finalmente, os isolados I74, IR7, I65G, I27, I1.4, I12, I78G e IA1 foram os menos agressivos (Tabela 6).

Tabela 6. Teste de Tukey para AFL, envolvendo os trinta isolados de *S. tritici* inoculados nas onze cultivares diferenciais.

Isolado	AFL	
I89	4,43	a
I42E	4,39	a
I14	2,81	b
IR2	2,42	c
I6	2,41	c
I109	2,38	c
I122	2,38	c
I31	2,32	c
I26	2,22	c d
I76G	2,21	c d e
I77G	2,08	d e f
I30	2,01	d e f g
I44	1,98	e f g h
I2P	1,97	f g h
I100	1,97	f g h
I108	1,89	f g h i
I13	1,80	g h i j
IA3	1,78	g h i j
I7	1,78	g h i j
I16	1,75	h i j k
I88	1,73	i j k l
I7ñv	1,73	i j k l
IA1	1,71	i j k l m
I78G	1,71	i j k l m
I12	1,67	i j k l m
I1.4	1,67	i j k l m
I27	1,63	j k l m
I65G	1,53	k l m
IR7	1,51	l m
I74	1,48	m

Médias seguidas da mesma letra não são diferentes entre si, pelo teste de Tukey a 1%.

Na Figura 1 é possível verificar o componente complexo da interação, onde os diferentes genótipos dos isolados interagem diferencialmente com os genótipos das cultivares hospedeiras, indicando a presença de resistência vertical.

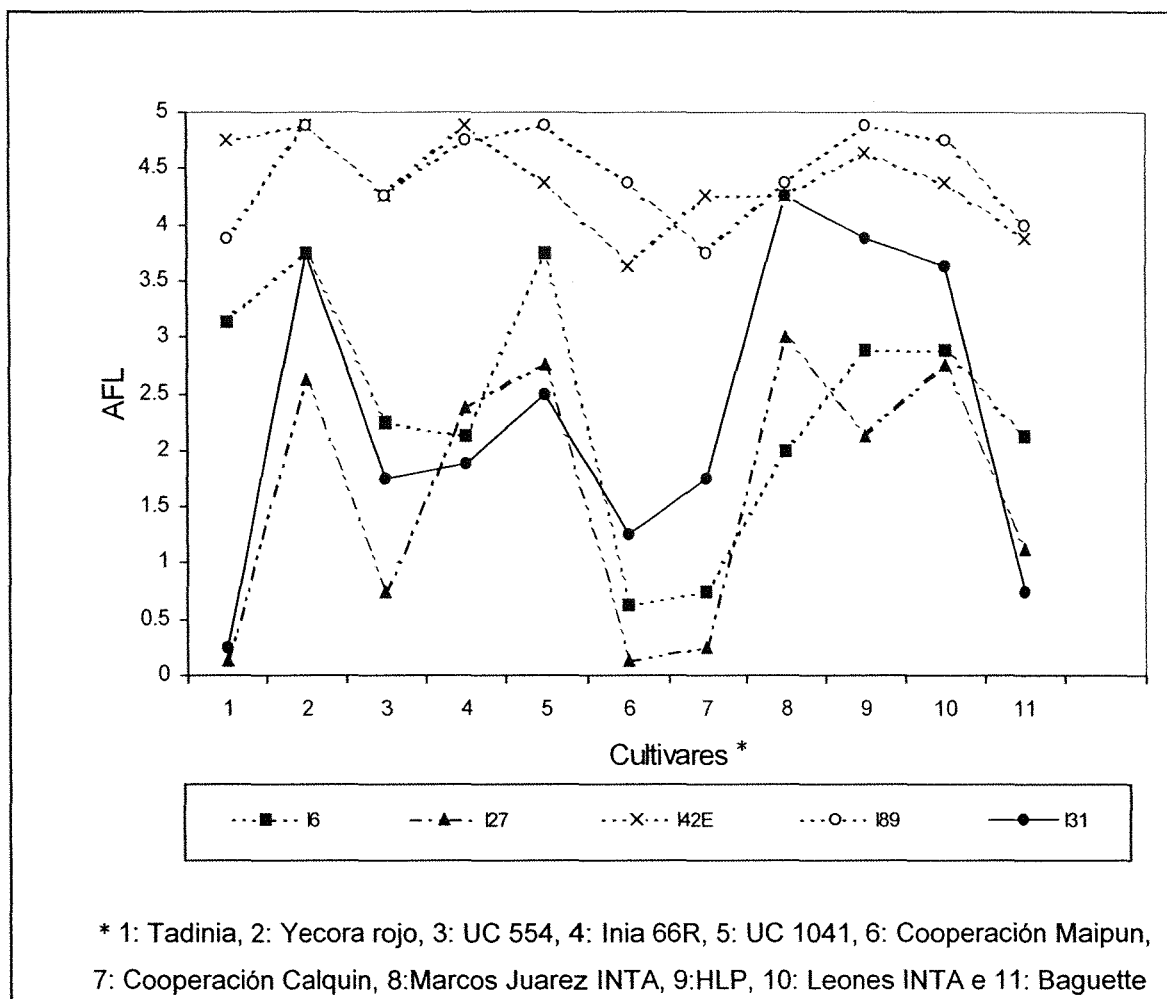


Figura 1 - AFL (área foliar lesionada) resultante da interação entre cinco isolados de *Septoria tritici* e onze cultivares diferenciais de trigo.

Isto pode ser interpretado desde dois pontos de vista. Do ponto de vista do patógeno (isolado), isto significa que a especialização fisiológica do mesmo, através do processo de seleção para patogenicidade, determinou a existência de genes de virulência específicos para cada hospedeiro. A presença da forma perfeita do fungo em diversas partes do mundo é um fator determinante no processo evolutivo do mesmo, através da geração de variantes adaptadas a determinadas cultivares hospedeiras.

Do ponto de vista do hospedeiro (cultivar), a interação com determinados isolados em uma área geográfica possibilitou a manifestação de genes de resistência específicos para estes isolados, os quais foram perpetuados através

do processo de seleção artificial destinado à formação de novas cultivares. Em concordância com estes resultados, evidências de interações diferenciais entre isolados de *Septoria tritici* e cultivares de trigo têm sido encontradas em Israel, Marrocos e Estados Unidos, sugerindo a especialização fisiológica do patógeno (Eyal et al., 1973; King et al., 1983; Saadaoui, 1987; Ahmed et al., 1995).

A resistência horizontal pode ser explicada em função da agressividade manifestada pelos isolados I 42E e I89. Estes dois isolados caracterizaram-se por serem altamente agressivos atacando as cultivares resistentes e induzindo uma maior severidade da doença nas cultivares susceptíveis. Isto pode ser verificado na Tabela 6, onde é apresentada uma comparação entre a AFL dos isolados I42E e I89 e a AFL média dos 28 isolados restantes (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre a severidade (AFL) dos isolados I42E e I89 e a severidade média dos 28 isolados restantes.

Cultivar	Isolado I42E	Isolado I89	28 isolados
	AFL	AFL	AFL
1: Tadinia	4,75	3,88	0,83
2: Yecora rojo	4,88	4,88	3,17
3: UC 554	4,25	4,25	1,34
4: INIA 66R	4,88	4,75	1,52
5: Coop. Calquin	4,38	4,88	2,94
6: Coop. Maipun	3,63	4,38	0,90
7: HLP*	4,25	3,75	1,17
8: Marcos Juarez INTA	4,25	4,38	2,87
9: Leones INTA	4,63	4,88	3,00
10: Baguette 12	4,36	4,75	2,60
11: UC 1041	3,86	4,00	1,08

4.3.2 Experimento 2: Davis-EUA

Na análise de variância para AFL, foram detectadas diferenças altamente significativas ($p \leq 0,0001$) entre isolados, cultivares. A interação isolado x cultivar também foi altamente significativa ($p \leq 0,0001$) (Tabela 8).

Tabela 8. Anova para a variável AFL.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Bloco	5	0,33500	0,0670	2,14	0,0001**
Isolado (I)	1	59,049	59,049	1883,99	0,0001**
Bloco x Isolado	5	0,09533	0,0190	0,61	0,6936 ^{ns}
Cultivar (C)	29	571,649	19,712	628,92	0,0001**
Bloco x Cultivar	145	6,5316	0,045	1,44	0,0148*
C x I	29	109,791	3,785	120,79	0,0001**
Resíduo	145	4,5446			
Total	359	751,996			

CV: 10,86; R²: 0,99; Média geral AFL: 1,63. FV: Fontes de variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio. ^{ns}: não significativo, *: significativo ao 5%, **: significativo ao 1%.

Os testes de comparação de médias da variável AFL para cultivares e isolados são mostrados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Na Tabela 9, é possível apreciar o comportamento da AFL para cada cultivar inoculada com os isolados USA 00005 e CA 30 de *Septoria tritici*. As cultivares Opata 85, Inia 66R, Yecora rojo, Cooperación Calquin, Prointa Isla Verde e Klein Atlas, comportaram-se como susceptíveis; CYMMYT 2, WR 33 TA 5056, Synthetic 43, Israel 493, UC 554, Klein Toledo, CIMMYT 3, Don Ernesto INTA, Chinese Spring S. 7D, Don Ernesto INTA, Chinese Spring S. 7D, Tadinia, CIMMYT 6, Cooperación Maipun e CIMMYT 10 como resistentes e CIMMYT 7, CIMMYT 5, Bulgaria 88, CIMMYT 4, Leones INTA, CIMMYT 9, CIMMYT 8, Veranopolis, Tadinia, CIMMYT 1, Marcos Juarez INTA e IAS manifestaram um comportamento intermediário aos isolados USA 00005 e CA 30.

Na Tabela 10, é possível apreciar o comportamento da AFL média para os isolados USA 00005 e CA 30, inoculados nas trinta cultivares de trigo. O isolado USA 00005 foi em média mais virulento que o isolado CA30.

Tabela 9. Teste de Tukey para AFL, envolvendo as trinta cultivares diferenciais inoculadas com os isolados USA 00005 e CA 30.

Cultivar	AFL	
Opata 85	4,39	a
Inia 66R	4,28	a
Yecora rojo	4,05	b
Coop. Calquin	3,38	b
Prointa Isla verde	2,77	c
Klein Atlas	2,40	d
CIMMYT 7	2,36	ef
CIMMYT 5	2,31	ef
Bulgaria 88	2,23	ef
CIMMYT 4	2,10	efg
Leones INTA	2,06	fgh
CIMMYT 9	1,91	ghi
CIMMYT 8	1,88	ghi
Veranopolis	1,86	ghi
Tadinia	1,78	hij
CIMMYT 1	1,72	ij
Marcos Juarez INTA	1,62	ij
IAS 20	1,51	j
CIMMYT 10	0,83	k
Coop. Maipun	0,78	k
CIMMYT 6	0,65	kl
Chinese Spring S. 7D	0,37	lm
Don Ernesto INTA	0,36	lm
CIMMYT 3	0,32	lm
Klein Toledo	0,31	m
UC 554	0,31	m
Israel 493	0,12	m
Synthetic 43	0,12	m
WR 33 TA 5056	0,08	m
CIMMYT 2	0,08	m

Médias seguidas da mesma letra não são diferentes entre si, pelo teste de tukey a 1%.

Tabela 10. Teste de Tukey para AFL, envolvendo os isolados USA 00005 e CA 30, inoculados nas trinta cultivares de trigo.

Isolado	AFL
USA 00005	2,04 a
CA 30	1,23 b

Médias seguidas da mesma letra não são diferentes entre si, pelo teste de tukey a 1%.

A interação entre os genótipos dos isolados e os genótipos das cultivares pode ser apreciada na Figura 2. Na mesma, se pode verificar que o isolado USA 00005 provocou uma severidade da doença maior na grande maioria das cultivares avaliadas. Este tipo de interação supõe uma resistência do tipo horizontal nas cultivares analisadas. Mas, a presença de cultivares exibindo um comportamento contrário, isto é, apresentando uma maior susceptibilidade ao isolado CA 30 (cultivares 18, 19 e 30), permite constatar a presença de uma interação diferencial entre isolados e cultivares hospedeiras, fato este que evidencia também a presença de resistência vertical na população de cultivares analisada.

Somado a isso, na inoculação com o isolado USA 00005, foi possível observar que um grupo de cultivares resistentes ao isolado CA 30, integrado por Tadinia, Bulgaria 88, Veranopolis e IAS 20, comportou-se como suscetível a este isolado, manifestando uma severidade da doença alta, evidenciada pelos valores de AFL (Figura 2). Isso demonstra que o isolado USA 00005 é uma variante fisiológica de *Septoria tritici* que possui a capacidade de infectar cultivares resistentes a outros isolados do mesmo patógeno.

Ahmed et al. (1995) estudando isolados de *Septoria tritici* provenientes de Oregon, Califórnia e Texas demonstraram a existência de adaptação isolado-ambiente (localidade) específica. Essa adaptação específica e a alta variabilidade genética existente dentro de populações do patógeno (Mc Donald & Martinez, 1990), seriam os fatores determinantes da seleção de raças virulentas hospedeiro-específicas e localmente adaptadas.

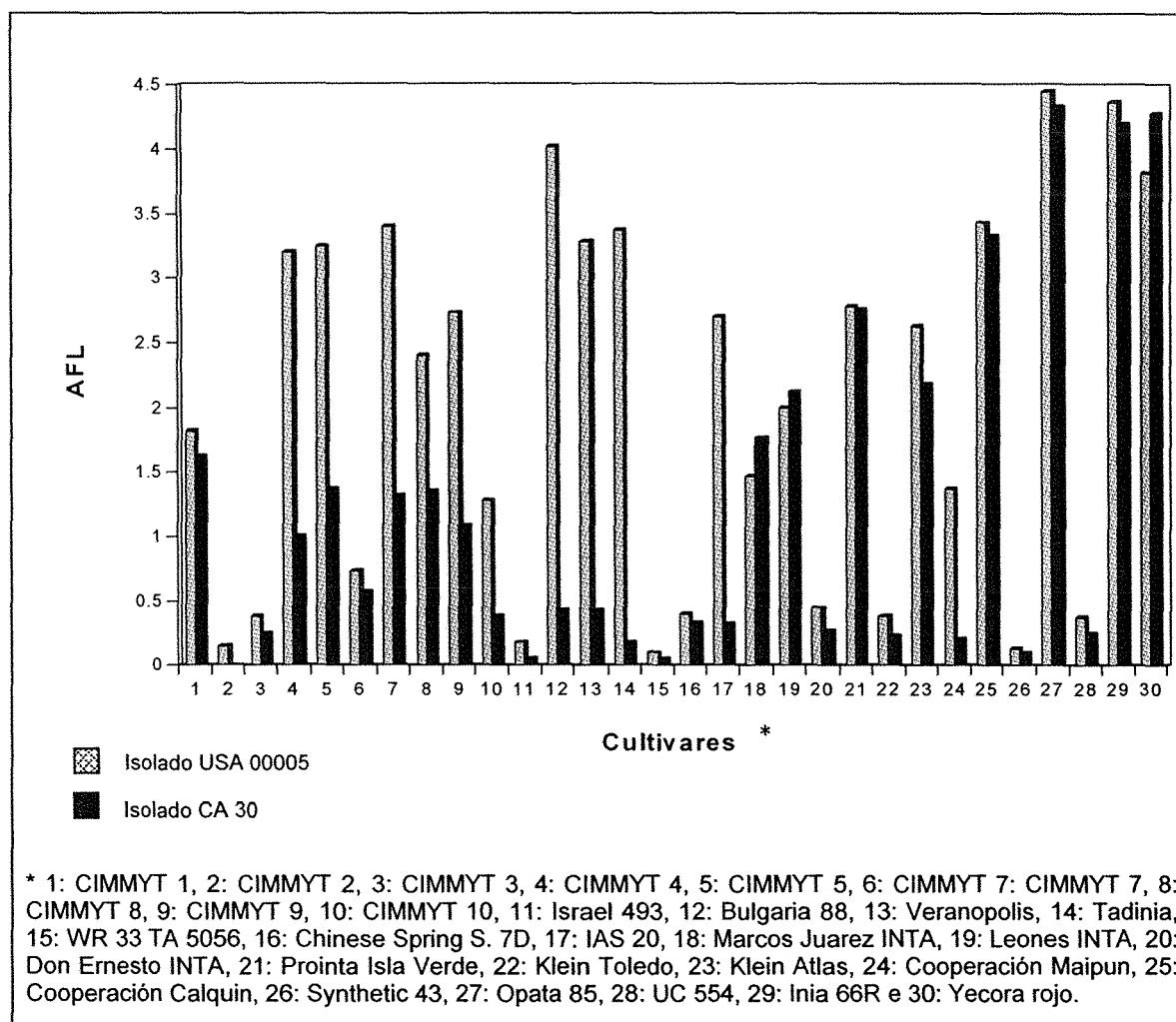


Figura 2 - AFL dos trinta cultivares diferenciais de trigo inoculados com os isolados USA 00005 e CA 30, respectivamente.

4.4 Conclusões

A complexidade das interações presentes no patossistema *Septoria tritici*-trigo exige dos melhoristas um conhecimento aprofundado das mesmas no momento de estabelecer um programa de melhoramento objetivando resistência à doença, qualquer que seja a abordagem utilizada.

Os testes de patogenicidade destinados a verificar o comportamento de isolados de *Septoria tritici* devem ser considerados como uma prioridade na seleção de materiais de trigo resistentes a este patógeno, já que a

agressividade de cada isolado pode variar significativamente, acarretando problemas na avaliação e seleção de genótipos resistentes.

Finalmente, a escolha de uma abordagem do tipo quantitativo no melhoramento visando resistência a *Septoria tritici* seria a mais conveniente pois ela, além de permitir superar as dificuldades impostas pelas interações isolado-cultivar específicas, também contribuiria na prevenção do aparecimento de novas raças condicionadas pela utilização de cultivares com resistência vertical.

5 FORMAÇÃO DE *BULKS* COM BASE NA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PROGÊNIES F₁₁ DE TRIGO A *Septoria tritici* Rob.

Resumo

A correta avaliação dos genótipos é um ponto crítico na detecção de genes de resistência através de marcadores moleculares. Os objetivos do presente trabalho foram: (i) avaliar a resistência a *Septoria tritici* Rob. de progênies F₁₁ de trigo, derivadas do cruzamento Tadinia x (Yecora rojo x UC554) e (ii) identificar progênies pertencentes os extremos de resistência e susceptibilidade, para a posterior análise com marcadores moleculares. Para avaliar a resistência das progênies, a variável área foliar lesionada (AFL) foi avaliada nos estádios fenológicos de plântula, perfilhamento e folha bandeira, nos anos 1999 e 2000. Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados com três repetições no primeiro ano e quatro no segundo. Com base nos resultados das avaliações da AFL foram escolhidas as progênies integrantes dos *bulks* resistente e suscetível. Nas análises de variância para cada ano de avaliação e estádios fenológicos avaliados, foram detectadas diferenças altamente significativas ($p \leq 0,0001$) entre progênies para a variável AFL. Foram também observadas variações da resistência das progênies nos anos e diferentes estádios fenológicos estudados. Para cada estágio fenológico, foram identificadas progênies resistentes, intermediárias e susceptíveis. Com base nos resultados das avaliações foram escolhidas as progênies integrantes dos *bulks* resistente e suscetível. Progênies com segregação transgressiva também foram detectadas na população estudada. Um modelo de herança oligo-

poligênica explicaria de forma satisfatória a resistência a *Septoria tritici* nesta população.

BULKS DEVELOPING BASED ON F₁₁ WHEAT PROGENIES DISEASE ASSESSMENT TO *Septoria tritici* Rob.

Summary

The correct evaluation of resistance of genotypes is a fundamental requirement in the detection of resistance genes through molecular markers. The objectives of the present work were: (i) To evaluate the resistance to *Septoria tritici* Rob. in F₁₁ wheat progenies derived from the crossing Tadinia x (Yecora rojo x UC554) in two years and different phenological stages, and (ii) To identify the progenies of *Bulks* (resistant and susceptible) for the subsequent analysis with molecular markers. The disease resistance of the progenies was evaluated in two years (1999 and 2000) and three phenological stages (seedling, tillering and flag leaf). A completely randomized blocks design, with three replications in the first year and four in the second was used. Analyses of variance for the character damaged leaf area for each year of evaluation and phenological stage showed highly significant differences ($p \leq 0.0001$) among progenies. Variations in the degree of resistance of progenies were observed at different years and phenological stages. In each phenological stage, resistant, intermediate and susceptible progenies were identified. Based on the results of the evaluations, resistant and susceptible progenies were chosen to compose the bulks. Progenies with transgressive segregation were also detected. An oligo-polygenic model of inheritance would explain satisfactory the resistance to *Septoria tritici* in this segregant population.

5.1 Introdução

A correta avaliação dos genótipos é o ponto de partida de toda pesquisa destinada a detectar e mapear genes de resistência a doenças. Esta avaliação é ainda mais crítica quando é utilizada a técnica de *bulk segregant analysis*, pois a presença de um ou mais indivíduos não pertencentes a um determinado *bulk* pode acarretar a ausência de polimorfismo entre ambos *bulks* (resistente e suscetível) resultando no insucesso da técnica (Michelmore et al., 1991).

A avaliação da resistência dos genótipos a *Septoria tritici* pode ser feita registrando a área foliar coberta de lesões cloróticas e necróticas ou área foliar coberta de picnídios através de escalas de notas desenvolvidas por Ziv & Eyal (1978) e Eyal & Brown (1976).

A obtenção de resistência genética a esta doença é uma prioridade dos programas de melhoramento, já que a maioria dos cultivares existentes no mercado é susceptível a mancha foliar ocasionada por *Septoria tritici*. De modo geral, existem mais fontes de resistência nos trigos de inverno que nos de primavera. Por sua vez, os trigos tetraplóides (*Triticum durum*) e os triticales apresentam uma maior resistência a *Septoria tritici* em relação aos trigos hexaplóides (*Triticum aestivum*). Fontes adicionais de resistência podem ser encontradas em ancestrais do trigo cultivado tais como *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum*, *Triticum longissimum*, *Triticum speltoides* e *Triticum tauschii* (Eyal et al., 1987). No Brasil, existem fontes de resistência a este patógeno, destacando-se entre elas as cultivares 'Veranópolis', 'Frontana' e 'Iassul 20' (Brown et al., 2001).

Estudos da herança da resistência a *Septoria tritici* possibilitaram determinar qual é o tipo de resistência presente nos cultivares ou linhagens em estudo (qualitativa ou quantitativa) e, em função disto, escolher a metodologia de melhoramento mais apropriada para cada situação.

Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar a resistência a *Septoria tritici* Rob. de progênies F₁₁ de trigo, derivadas do cruzamento Tadinia x

(Yecora rojo x UC554) e (ii) identificar as progênies que formam os extremos (*Bulks*) resistente e suscetível, para a posterior análise com marcadores moleculares.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Avaliação da resistência

As progênies F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC 554) foram avaliadas em três estádios fenológicos (plântula, perfilhamento e folha bandeira) durante dois anos agrícolas (1999 e 2000) em Piracicaba-SP. O isolado empregado foi o IPBR1. Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados com três repetições no primeiro ano e quatro repetições no segundo ano.

5.2.1.1 Ambiente 1A: Inoculação em casa de vegetação. Ano 1999

Foram cultivadas plântulas de trigo em Julho de 1999 utilizando bandejas de plástico contendo areia esterilizada e solo orgânico como substrato e dispostas em casa de vegetação da Seção de Fitopatologia da ESALQ-USP. O delineamento experimental utilizado foi do tipo blocos totalmente casualizados com três repetições, onde cada parcela foi composta por uma bandeja contendo 8 plântulas.

Foram feitas duas inoculações: (1) aos 25 dias após emergência (DAE) no estádio fenológico de perfilhamento; e (2) aos 70 DAE, no estádio fenológico de folha bandeira. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de esporos do patógeno, empregando a técnica de inoculação por aspersão foliar (Dhingra & Sinclair, 1986). A concentração de inóculo foi de 10⁶-10⁸ esporos/ml. Após a inoculação, foi feita uma câmara úmida (36 h) cobrindo as plantas de cada bloco com um filme plástico. Trinta dias após a inoculação, foi feita a avaliação das plântulas registrando a área foliar lesionada (AFL) pelo fungo (área foliar coberta por lesões necróticas e cloróticas na primeira inoculação e área foliar coberta por picnídios na segunda) utilizando a escala

de notas proposta por Ziv & Eyal (1978), onde 0 representa ausência de sintomas e 5 indica 90-100% da área foliar coberta por lesões cloróticas e necróticas. Na segunda inoculação, a severidade da doença foi registrada em função da escala de notas elaborada por Eyal & Brown (1976), onde 0 representa ausência de sintomas e 5 indica 87% da área foliar coberta por picnídios.

5.2.1.2 Ambiente 1B: Inoculação a Campo. Ano 2000

5.2.1.2.1 Estádio fenológico de plântula

Na área experimental do Departamento de Fitopatologia da ESALQ-USP foi montado um delineamento experimental do tipo blocos completos aleatorizados com três repetições, onde cada parcela foi composta de uma fileira contendo 8 plantas.

As progênies da população F_{11} de trigo foram semeadas em agosto de 2000, com um espaçamento de 0,13 m entre plantas e 0,17 m entre fileiras. Cada bloco esteve formado por 77 progênies, os três progenitores e 12 testemunhas. Em cada bloco foram distribuídas duas testemunhas cada 16 progênies com a finalidade de monitorar a distribuição espacial do patógeno e poder efetuar posteriores correções caso esta não fosse homogênea. Na periferia de cada bloco foi plantada a testemunha suscetível 'Cooperación Calquin' como linhagem propagadora da doença. As principais características das testemunhas são apresentadas na Tabela 1.

A inoculação foi feita aos 7 DAE (plântula), empregando a mesma técnica de inoculação descrita no item 5.2.1.1. Trinta dias após a inoculação, foi feita a avaliação das plântulas registrando a AFL segundo a escala de notas de Ziv & Eyal (1978), descrita no item 5.2.1.1.

Tabela 1. Principais características dos progenitores e testemunhas utilizados nos experimentos de campo (ano 2000).

Cultivar	Origem	Reação a <i>Septoria tritici</i>
Tadinia	UCD	R
Yecora rojo	UCD	S
UC 554	UCD	MS
INIA 66R	INIA	MS
UC 1041	UCD	R
Cooperación Maipun	Queaca	R
Cooperación Calquin	Queaca	S
Cooperación Nanihue	Queaca	MS
Cooperación Nahuel	Queaca	MS
Sinvalochó	MAG	S
HLP*	INTA	MR
Marcos Juárez INTA	INTA	S

R: resistente; S: suscetível; MR: Moderadamente resistente; MS: Moderadamente suscetível. UCD: *University of California-Davis*, EUA. Queaca: *Química Estrella-Asociación de Cooperativas Argentinas*, Argentina. INTA: *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, Argentina. MAG: *Ministerio de Agricultura de la Nación*, Argentina. INIA: *Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria*, Uruguay.

5.2.1.2.2 Estádio fenológico de folha bandeira

As progênes da população F₁₁ de trigo foram semeadas em julho de 2000, empregado o mesmo delineamento experimental e o mesmo esquema de plantio que no caso anterior, mas neste caso foram utilizadas quatro repetições. A inoculação foi feita aos 70 dias de idade (estádio fenológico de folha bandeira). As plântulas foram inoculadas com uma suspensão de esporos do patógeno, empregando a mesma técnica de inoculação descrita no item 5.2.1.1. Trinta dias após a inoculação, foi feita a avaliação das plântulas registrando a área foliar afetada pelo fungo (área foliar coberta por picnídios) com uma escala de notas onde 0 representa ausência de sintomas e 5 indica 87% da área foliar coberta por picnídios (Eyal & Brown, 1976).

5.2.2 Formação de *Bulks*

Com base nos resultados das inoculações de Piracicaba foram formados os extremos resistente e suscetível. Doze progênies pertencentes a cada extremo da população segregante conformaram os *bulks* que foram posteriormente analisados com marcadores microssatélites e AFLPs (Capítulo 4). Com base na informação obtida nos experimentos anteriores (Capítulo 1), onde foi verificado que a resistência a *Septoria tritici* é função do estágio fenológico, foi decidido formar *bulks* para cada estágio fenológico separadamente.

5.3 Resultados e Discussão

Nas Tabelas A1, A2, A3 e A4 (Anexo 3) são apresentados o resultados das análises de variância individuais para o caráter AFL nos anos 1999 e 2000, efetuadas na população F₁₁ [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo, envolvendo os estádios fenológicos de plântula, perfilhamento e folha bandeira. Foram detectadas diferenças altamente significativas ($p \leq 0,0001$) entre progênies em relação ao caráter avaliado (AFL). Por sua vez dentro de cada estágio fenológico foram identificadas progênies resistentes, intermediárias e susceptíveis. Foram também detectados efeitos significativos de blocos para os estádios fenológicos avaliados. Os resultados dos testes de comparação de médias (Tukey) podem ser apreciados nas Tabelas A5, A6, A7 e A8 (Anexo 3).

À semelhança do acontecido em avaliações anteriores (Capítulo 1), foi constatada também a variação da resistência de algumas progênies nos diferentes estádios fenológicos. Estas progênies manifestaram-se como susceptíveis em plântula e no perfilhamento mas como resistentes em folha bandeira, não apresentando picnídios ou mesmo apresentando uma baixa cobertura dos mesmos. Também foi verificado que progênies que foram resistentes em plântula não mantiveram este comportamento em folha bandeira.

O comportamento dos parentais das progênies F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC554) de trigo e testemunhas em relação ao isolado IPBR1 de *Septoria tritici*, nos estádios fenológicos de plântula, perfilhamento e folha bandeira (anos 1999-2000) é mostrado nas Tabelas 2 e 3. Os parentais e testemunhas se comportaram de acordo com o perfil de resistência determinado em ensaios anteriores.

Tabela 2. Avaliação da performance dos progenitores das progênies F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC554) de trigo e testemunhas em relação ao isolado IPBR1 de *Septoria tritici*, nos estádios fenológicos de perfilhamento e folha bandeira (ano 1999).

Cultivar	Perfilhamento		Cultivar	Folha bandeira	
	AFL			AFL	
Cooperación Calquin	4,50a		Yecora rojo	4,67a	
Yecora rojo	4,50a		Cooperación Calquin	4,44a	
Cooperación Nanihue	3,61ab		Cooperación Nanihue	2,89 b	
Cooperación Nahuel	3,61 b		Cooperación Nahuel	2,72 b	
Cooperación Maipun	1,17 c		UC 554	1,27 c	
UC 554	0,28 d		Cooperación Maipun	0,44 cd	
UC 1041	0,28 d		Tadinia	0,33 d	
Tadinia	0,17 d		UC 1041	0,28 d	

Médias seguidas da mesma letra não são diferentes entre si, pelo teste de Tukey a 1%.

Os extremos resistente e suscetível formados com base nas avaliações da resistência em cada ambiente de teste e estádios fenológicos envolvidos, assim como anos de avaliação se encontram nas Tabelas A9, A10, A11 e A12 (Anexo 3). Devido à presença de interação entre resistência e estágio fenológico os *bulks* foram confeccionados separadamente para cada estágio fenológico estudado. É possível verificar a oscilação da resistência de algumas progênies entre anos de avaliação e estádios fenológicos.

A análise da distribuição das progênies F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC554) de trigo em relação a AFL, nos diferentes estádios fenológicos e anos de avaliação, permite levantar a hipótese de uma herança oligogênica do caráter resistência (Figura 1).

Tabela 3. Avaliação da performance dos progenitores das progênies F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC554) de trigo e testemunhas em relação ao isolado IPBR1 de *Septoria tritici*, nos estádios fenológicos de plântula e folha bandeira (ano 2000).

Cultivar	Plântula		Cultivar	Folha bandeira	
	AFL			AFL	
Yecora rojo	4,58a		Yecora rojo	4,92a	
Sinalocho	4,21a		Marcos Juarez INTA	4,71a	
Cooperación Calquin	3,83ab		Cooperación Calquin	3,88 b	
Marcos Juarez INTA	3,25 bc		HLP*	3,75 b	
Cooperación Nanihue	2,53 cd		Sinalocho	3,25 c	
Cooperación Nahuel	2,43 d		UC 554	3,00 c	
INIA 66R	2,25 d		INIA 66R	3,00 c	
UC 554	1,87 d		Cooperación Nahuel	2,48 d	
HLP*	1,85 d		Cooperación Nanihue	2,42 d	
Tadinia	0,80 e		UC 1041	1,13 e	
UC 1041	0,71 e		Tadinia	1,00 e	
Cooperación Maipun	0,54 e		Cooperación Maipun	0,00 f	

* Mutante induzido de Leones Inta que exibe reação de hipersensibilidade constitutiva. ^a: Média de quatro repetições. Médias seguidas da mesma letra não são diferentes entre si, pelo teste de Tukey a 1%.

A presença de um grupo importante de progênies com um elevado grau de resistência sugere que as mesmas carregam um ou mais genes de efeito principal. Mas é possível também observar progênies intermediárias exibindo um grau moderado de resistência ou susceptibilidade. Este fato, somado a da presença de interação entre resistência e estágio fenológico verificada no Capítulo 1, podem ser explicados satisfatoriamente por um modelo de herança oligo-poligênica onde um ou mais genes maiores são acompanhados de genes menores condicionando a resistência a *Septoria tritici* na população de progênies estudada.

Estes resultados concordam com os obtidos por Jlibene et al. (1994) e Simon & Cordo (1998), estes autores indicaram a presença de uma resistência quantitativa ou poligênica em trigos de primavera, enfatizando que os efeitos

gênicos aditivos foram mais importantes que os não-aditivos. Por sua vez diferem em parte dos obtidos por Narvaez & Caldwell (1954), Rillo & Caldwell (1966), Wilson (1979), Lee & Gough (1984), Somasco et al. (1996). Estes autores encontraram uma resistência do tipo qualitativa, controlada por um a três genes de efeito maior nas cultivares de trigo estudadas.

Esta aparente discrepância pode ser explicada em função dos cultivares utilizados nas diferentes pesquisas, demonstrando que a herança a *Septoria tritici* e uma característica que depende de cada material genético podendo ser qualitativa ou quantitativa.

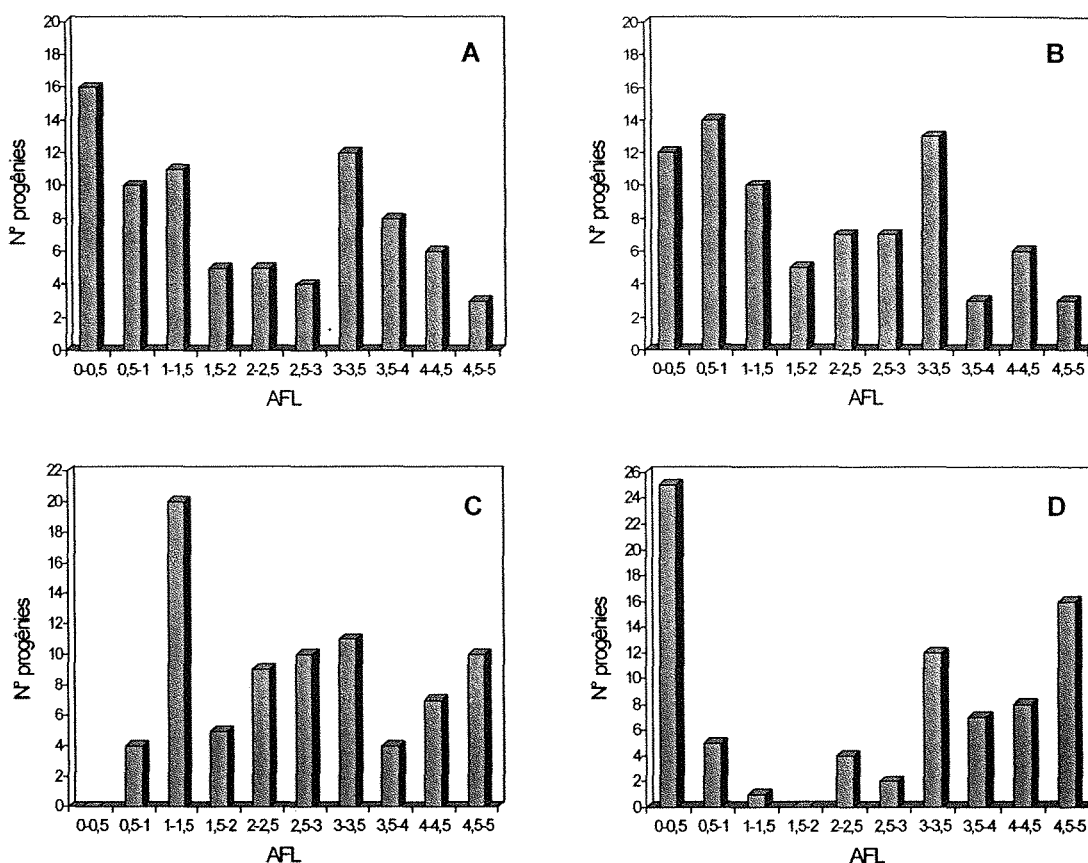


Figura 1 - Gráficos de distribuição da área foliar lesionada (AFL) de progênies F₁₁ de trigo inoculadas com *Septoria tritici* em casa de vegetação (perfilhamento (A) e folha bandeira (B)) e campo (plântula (C) e folha bandeira (D)).

Nas avaliações de resistência foi detectada segregação transgressiva, isto é, progênies que manifestaram um grau de resistência ou susceptibilidade superior ao exibido pelas linhagens parentais. As progênies que manifestaram uma susceptibilidade maior à linhagem parental resistente 'Tadinia' foram as seguintes: 46, 3, 34, 30, 28, 54, 45, 52, 58, 75, 12, 77, 47 e 8. No outro extremo, as progênies 80, 6, 11, 21, 64, 79 e 66 foram mais suscetíveis que o parental suscetível 'Yecora rojo' (Tabelas A5, A6, A7, A8 – Anexo 3). Interações

interalélicas como a epistase podem explicar este fenômeno. Por outra parte a sobredominância para resistência ou susceptibilidade também pode explicar a segregação transgressiva da resistência a *Septoria tritici* manifestada pela população estudada.

5.4 Conclusões

Devido à oscilação do comportamento médio das progênies em relação a *Septoria tritici*, foi decidida a formação de *bulks* para cada estágio fenológico estudado. Por sua vez diante desta situação é recomendável avaliar as progênies em mais de um estado fenológico e sim for possível em mais de um ano para determinar corretamente o perfil de resistência das mesmas.

Um modelo de herança oligo-poligênica onde um ou mais genes maiores são acompanhados de genes menores condicionando a resistência, explicaria de forma satisfatória a resistência a *Septoria tritici* na população de progênies estudada.

6 ANÁLISE MOLECULAR DE PROGÊNIES DE TRIGO VISANDO DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A *Septoria tritici* Rob.

Resumo

Marcadores moleculares têm sido extensivamente utilizados no mapeamento de genes de resistência em vários patossistemas, incluindo trigo. Os objetivos do presente trabalho foram detectar genes de resistência a *Septoria tritici* através de marcadores microssatélites e AFLPs em progênies F₁₀ de trigo derivadas do cruzamento triplo Tadinia x (Yecora rojo x UC 554). A técnica empregada foi a do *Bulked Segregant Analysis*, ou análise da mistura de DNA de indivíduos segregantes, com base nos resultados de avaliações de resistência das progênies efetuadas em três estádios fenológicos. Foram feitos testes com 307 *primers* de microssatélites pertencentes às séries wms e wmc e selecionados 262 *primers* polimórficos. Na análise com marcadores AFLPs foram utilizadas combinações de dois *primers* seletivos *Pst*I com dez *primers* *Mse*I. Não foi possível detectar genes de resistência na população Tadinia x (Yecora rojo x UC554). Três fatores podem ser apontados como responsáveis por este insucesso: 1) população de mapeamento derivada de cruzamento triplo; 2) presença de progênies não pertencentes ao cruzamento (fora do tipo) e 3) comportamento não esperado do parental UC554 em relação a resistência a *Septoria tritici*.

MOLECULAR ANALYSIS OF WHEAT PROGENIES AND DETECTION OF RESISTANCE GENES TO *Septoria tritici* Rob.

Summary

Molecular markers have been used to map disease resistance genes in several pathosystems including wheat. The objectives of the present work were to detect resistance genes to *Septoria tritici* using microsatellites and AFLPs in F₁₀ wheat progenies derived from the three way cross Tadinia x (Yecora rojo x UC 554). The employed technique was the Bulk Segregant Analysis of progenies chosen based on disease evaluations made in three phenological stages. 307 microsatellite primers were tested belonging to the series wms and wmc, and 262 polymorphic ones were selected. In AFLP analysis, combinations of two selective primers *Pst*I with ten primers *Mse*I were used. It was not possible to detect resistance genes in the population Tadinia x (Yecora rojo x UC554). Three factors can be pointed as responsible for this failure 1) employment of a three way cross mapping population; 2) presence of progenies not belonging to the crossing (out of type), and 3) unexpected behavior of UC554 when inoculated with *Septoria tritici*.

6.1 Introdução

A introdução de mudanças no manejo da cultura de trigo tais como a prática do plantio direto, a aplicação de fertilizantes nitrogenados, o uso da irrigação e substituição das variedades locais adaptadas por cultivares exóticos de alta produtividade, contribuíram significativamente para o incremento da severidade de *Septoria tritici* nos últimos 20 anos (Eyal et al., 1987; King et al., 1983). Dada a importância da doença, faz-se necessário desenvolver estratégias para minimizar os danos ocasionados pelo patógeno à cultura. Uma das principais estratégias a serem consideradas é o controle genético. Neste ponto, a abordagem da problemática pode ser feita através de métodos de

melhoramento tradicional, envolvendo avaliações da resistência seguidas de seleção de genótipos resistentes, ou através de métodos moleculares ou ainda da combinação de ambos.

Por sua vez, no campo do melhoramento genético para resistência a doenças, as técnicas de seleção assistida por marcadores moleculares têm demonstrado ser de grande utilidade tanto na cultura do trigo quanto em outras culturas como milho, arroz, soja, aveia, cevada, centeio, algodão e numerosas espécies de hortaliças tais como alface, tomate, repolho, berinjela, feijão e batata (Diers et al., 1992; Mahalingam & Skorupta, 1995; Rao-Arelli et al., 1994; Agrama & Mousa, 1996; Ferreira et al., 1995a, 1995b; Saghai-Marooof et al., 1996; Assigbetse et al., 1994; Miklas et al., 1996; Boscaroli et al., 1998).

Atualmente, com o auge dos métodos moleculares, surge a possibilidade de detectar e mapear genes que conferem a resistência e implementar esquemas de seleção assistida, visando piramidar genes de maior efeito fenotípico. Porém, trabalhos objetivando detectar estes genes através de técnicas moleculares no patossistema *Septoria tritici* x trigo são escassos na literatura.

Existem na literatura trabalhos exemplificando a utilização bem sucedida de marcadores microsatélites e AFLPs na detecção de genes de resistência a doenças e pragas em espécies de importância agrícola. Ogliari (1999), por exemplo, identificou um monogene que confere resistência a *Exserohilum turcicum* em milho. Locus de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em milho foram identificados por Brunelli (2000). Chantret et al. (2000) identificaram e mapearam um QTL que confere resistência *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* em trigo. Em batata, foi detectado o gene *Gpa2* que confere resistência ao nematóide do cisto (*Globodera rostochiensis*) (Roupe et al., 1997). Em tomate, foi detectado o gene *Cf-9* que confere resistência ao fungo *Cladosporium fulvum*.(Colwyn et al., 1995).

O objetivo deste estudo foi detectar genes responsáveis pela resistência a *Septoria tritici* em progênies F₁₀ de trigo derivadas do cruzamento triplo

Tadinia x (Yecora rojo x UC 554), através de marcadores microsatélites e AFLPs, empregando a técnica do *Bulked Segregant Analysis*.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Material vegetal

Foi utilizada uma população segregante desenvolvida e cedida a este estudo pelo Dr. Jorge Dubcovsky do *Department of Agronomy and Range Science* (Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA). Esta população é composta por 77 famílias F₁₀, derivadas do cruzamento Tadinia x (Yecora rojo x UC554). As famílias F₁₀ foram previamente avaliadas para resistência à mancha foliar sob condições de campo na localidade de Davis. Das 77 linhagens avaliadas, aproximadamente a metade exibiu uma boa resistência sob condições de infestação severa (Dubcovsky, comunicação pessoal).

No desenvolvimento da população de mapeamento, foi adotado o método de *bulk*, onde o avanço das gerações segregantes envolveu autofecundações sucessivas em ausência de seleção.

6.2.2 Extração de DNA

Uma vez selecionadas as plantas F₁₀ resistentes e suscetíveis (Capítulo 3), procedeu-se à extração do DNA e a mistura equivalente dos mesmos para compor dois *bulks* (resistentes por um lado e suscetíveis por outro), o DNA das linhagens parentais e do híbrido F₁ foram incluídos como controle.

Para extração de DNA, foram usadas 6 folhas de cada progênie com 60 dias de idade (segunda folha abaixo da última folha de cada perfilho). As folhas foram trituradas em um macerador empregando nitrogênio líquido para facilitar o processo. O material triturado foi armazenado em freezer -80°C até a extração do DNA, que foi extraído conforme o protocolo CTAB (Hoisington et al., 1994).

6.2.3 Análise molecular com marcadores microssatélites

A genotipagem dos progenitores com 307 marcadores microssatélites foi efetuada em um primeiro estágio com a finalidade de escolher primers polimórficos, empregando *primers* da serie wms desenvolvidos na Alemanha (Röder et al., 1998) e primers wmc desenvolvidos pelo *Wheat Microsatellite Consortium*. Parte deste trabalho foi desenvolvido na Argentina, recebendo a colaboração da Eng. Agr. Ana Rosa Schlatter (*Instituto de Recursos Biológicos do INTA Castelar-Argentina*) e parte no *Wheat Molecular Genetics Laboratory*, sob direção do Dr. Jorge Dubcovsky (*University of California-Davis*). Posteriormente, foi efetuada a análise molecular dos parentais e *bulks* (R e S) empregando os microssatélites que foram polimórficos entre os progenitores.

As reações de amplificação foram feitas em volume final de 12,5 μL , contendo 3 μL de DNA (50 ng/ μL), 0,5 unidade de *Taq DNApolimerase* (Promega), 1x tampão de *Taq*, 100 μM de cada dNTP, 1,5 mM Cl_2Mg , 0,15 μL de *forward primer*, 0,15 μL de *reverse primer* e 5,83 μL de água Milli Q autoclavada. As amplificações foram conduzidas em termocicladores PE 9700 (Perkin Elmer-Applied Biosystems).

O programa de amplificação foi o seguinte: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50, 55 ou 60°C (dependendo da temperatura de anelamento de cada *primer*) e 2 minutos a 72°C. Por fim, foi realizada uma extensão por 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, as amostras receberam 3 μL de tampão de carregamento (Bromofenol + xylene xyanol + formamida), foram desnaturadas a 94°C durante 5 minutos e imediatamente colocadas em gelo. Os fragmentos amplificados foram resolvidos por eletroforese vertical (Gibco-BRL modelo S2) em gel de poliacrilamida 6%. O tampão de corrida utilizado foi TBE 0,5X na cuba superior e TBE 1X na cuba inferior. O tempo de corrida foi de aproximadamente 3 horas a 40 watts. Foi adicionado em cada gel um padrão molecular do tipo *ladder* 100pb para informação do peso molecular dos

fragmentos resolvidos. Os géis foram corados com o kit de coloração com prata da Promega (Madison, WI, EUA).

6.2.4 Análise molecular com marcadores AFLPs

A análise com marcadores AFLPs foi desenvolvida no *Instituto de Recursos Biológicos –INTA Castelar* (Argentina) sob orientação da Dra. Susana Marcucci-Poltri. O protocolo para análise dos marcadores AFLP utilizado é uma variante do protocolo descrito por Vos et al. (1995) modificado e otimizado para trigo (Khan et al., 2000). A modificação básica consistiu na realização da restrição e ligação numa única etapa. Deste modo, o procedimento ficou restrito a três etapas: 1) Restrição-ligação; 2) Pré-amplificação e 3) Amplificação definitiva.

Para a restrição-ligação do DNA genômico foram adicionados em um microtubo de centrifuga (1,5 mL): 500 ng de DNA genômico, 2,5 U *Pst*I, 2,5 U *Mse*I, 6,0 µL de tampão de reação 5X (Tris-HAc 10 mM pH 7,5, Acetato de Mg 10 mM e Acetato de K 50 mM, DTT 5mM e 50µl de BSA (10 mg/ml); foram adicionados também: 5 pmoles de *Pst*I-adaptador, 50 pmoles de *Mse*I-adaptador, 12 pmoles De ATP 10 mM, 1 U de T4 DNA ligase (Pharmacia). O volume final foi completado com dH₂O para atingir 20 µL. A mistura foi incubada a 37°C durante 5 h.

O preparo dos adaptadores foi realizado da seguinte forma: Adaptador *Pst*I: Foram misturados 1,7 µg de *Pst*I-oligo.1, 1,5 µg de *Pst*I-oligo.2, 3 µL do tampão de PCR 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM) e 60 µL de dH₂O. A mistura foi aquecida a 95°C e deixada resfriar lentamente. A concentração final do adaptador *Pst*I foi de 5 pmoles/µL. No caso do Adaptador *Mse*I, foram misturados 16 µg de *Mse*I-oligo.1, 14 µg de *Mse*I.2, 3 µL do tampão de PCR 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM) e 60 µL de dH₂O; aquecidos a 95°C e deixados resfriar lentamente. A concentração final do adaptador *Mse*I foi de 50 pmoles/µL.

Foram desenvolvidas duas reações de amplificação consecutivas. Na primeira reação, chamada de pré-amplificação, foram utilizados *primers PstI* e *MseI* com extensão de 1 nucleotídeo seletivo na extremidade 3'. Os produtos PCR da reação de pré-amplificação foram utilizados como molde na segunda reação, denominada amplificação seletiva, na qual foram utilizados primers com 3 nucleotídeos seletivos adicionados à extremidade 3' dos *primers*. Na pré-amplificação foram utilizados os *primers* “*PstI*-oligo (+1)” e “*MseI*-oligo (+1)”, com extensão de 1pb na extremidade 3' dos mesmos.

Para o coquetel de pré-amplificação, foi adicionado 0,075 μL *PstI*-oligo.(+1) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0,075 μL *MseI*-oligo.(+1) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0,5 μL dNTPs 5 mM, 2,5 μL 10X-tampão *Taq* Promega [KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9,0 (a 25°C), 1,0% Triton X-100; Mg-livre], 1,5 μL MgCl_2 25 mM, 0,20 μL (1U// μL) *Taq* polimerase, 16,65 μL dH_2O e 5 μL do DNA produto da reação de restrição-ligação.

A amplificação foi realizada de acordo com a seguinte programação: 1) 94°C por 2 minutos, 2) 94°C por 30 segundos, 3) 50°C por 30 segundos, 4) 72°C por 1 minuto; os passos 2 a 4 foram repetidos por 34 vezes. Os produtos da amplificação foram mantidos a 4°C.

Na amplificação seletiva AFLP-PCR, foram utilizados *primers PstI* e *MseI* ambos com extensão de 3 pares de bases adicionados à extremidade 3'. As reações foram realizadas através de diferentes pares de *primers* obtidos de acordo com a seqüência de combinação das bases adicionadas a extremidade 3' dos *primers*. O Coquetel AFLP-PCR foi preparado adicionando-se 0,03 μL de *primer PstI* (+3)(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0,03 μL de *primer MseI* (+3)(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0,4 μL de dNTPs 10 mM, 2,0 μL de tampão *Taq* 10x-Promega (Mg-livre), 1,2 μL de MgCl_2 25 mM, 0,01 μL (1U// μL) de *Taq* polimerase, 16,93 μL de dH_2O e 1,2 μL de DNA produto da reação de pré-amplificação (PCR +1).

Os *primers* básicos são *PstI*-primer (5'- GAC TGC GTA CAT GCA GA xyz-3') e *MseI*-primer (5'- GAT GAG TCC TGA GTA AA xyz-3'), onde x, y e z

representam as bases seletivas que são específicas e constantes em um mesmo *primer* mas variam entre *primers*.

A amplificação foi realizada de acordo com a programação: 1) 94°C (4 minutos), 2) 94°C (30 segundos), 3) 65°C (30 segundos), 4) -1°C por ciclo até atingir a temperatura de 56°C, 5) 72°C (1 minuto), 6) 94°C (30 segundos), 7) 56°C (30 segundos), 8) 72°C (30 segundos), os passos 6 a 8 foram repetidos por 30 vezes, 9) 72 °C (7 minutos). Os produtos da amplificação foram mantidos a 4°C.

Após a amplificação seletiva, o resultante de cada reação foi misturado a 4 µL de tampão formamida 2X (formamida 98%, EDTA 10 mM, pH 8,0, azul de bromofenol e cianol xileno). A seguir, as amostras foram incubadas a 94°C por 5 minutos, após aquecimento, as amostras foram imediatamente transferidas para gelo.

Os produtos de PCR resultantes da amplificação seletiva foram resolvidas em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6%, uréia 7,5 M, tampão 1X TBE). A corrida eletroforética foi desenvolvida a 40 W (2000 volts) utilizando tampão TBE 0.5X na cuba superior e TBE 1X na cuba inferior. O tempo de corrida foi de aproximadamente 3 horas. Os géis foram corados com o kit de coloração com prata da Promega (Madison, WI, EUA).

As combinações de primers seletivos testados foram P40=AGC, P41=AGG versus M31=AAA, M37=ACG, M38=ACT, M39=AGA, M40=AGC, M41=AGG, M42=AGT, M43=ATA, M44=ATC e M45=ATG.

6.2.5 Análise Estatística

6.2.5.1 Detecção e mapeamento de genes de resistência

Foram efetuados testes de qui-quadrado para cada marcador para verificar se as proporções observadas de genótipos obedecem à proporção mendeliana esperada. No caso de linhagens F₁₀ recombinantes homozigóticas e na ausência de distorção na segregação, estas proporções devem ser de 1:1 (1RR:1rr).

Para o mapeamento dos genes ou regiões genômicas associadas aos genes de resistência foi realizada uma análise da variância do tipo monofatorial, tendo genótipos em cada loco marcador com variável independente e área foliar coberta por lesões necróticas e contendo picnídios com variável dependente. Esta análise foi efetuada com a finalidade de confirmar a ligação dos marcadores ao gene ou genes responsáveis pela resistência a septoriose e a participação relativa dos mesmos na variância fenotípica total (Edwards et al., 1987; Boscariol et al., 1998; Malvas, 1998).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Análise molecular com marcadores microssatélites

Os 202 *primers* da série wms testados revelaram os seguintes índices de polimorfismo entre genitores da população F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC 554): 21 (10,39%) foram do tipo ABC (sendo: A= alelo de Tadinia; B= alelo de Yecora rojo e C= alelo de UC 554); 22 do tipo ABB (10,89%); 41 do tipo ABA (20,29%); 20 do tipo AAC (9,90%); 73 (36,14%) foram monomórficos AAA e 25 (12,38%) não amplificaram (Tabela A1–Anexo 4). Na análise dos *bulks*, 11 *primers* foram polimórficos entre *bulks*, mas quando estes foram utilizados para genotipar a população segregante, mostraram-se não ligados a segmentos cromossômicos contendo genes de resistência (Tabela 1).

No que se refere à série wmc, nos 105 *primers* testados foi verificado o seguinte polimorfismo nos progenitores: 29 (27,62%) foram do tipo ABC; 6 do tipo ABB (5,71%); 5 do tipo ABA (4,76%); 6 do tipo AAC (5,71%); 39 (37,14%) foram monomórficos AAA e 20 (19,05%) não amplificaram (Tabela A2–Anexo4). Ao exemplo do acontecido com os *primers* da série wms, na análise dos *bulks*, 11 *primers* foram polimórficos entre *bulks*, mas quando estes foram utilizados para genotipar a população segregante mostraram-se não ligados a segmentos cromossômicos controlando a resistência a *Septoria tritici* Rob. (Tabela 2).

Tabela 1. *Status* nos *bulks* e na população segregante [F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] dos *primers* microssatélites (Série wms *Germany*) polimórficos entre *bulks*.

<i>Primer</i>	Polimorfismo em progenitores	<i>Status</i> na população
wms6	ABC*	não ligado
wms32	ABC	não ligado
wms99	ABC	não ligado
wms174	ABC	não ligado
wms282	ABC	não ligado
wms111	ABB	não ligado
wms190	ABA	não ligado
wms213	ABA	não ligado
wms397	ABA	não ligado
wms249	ACC	não ligado
wms558	ACC	não ligado

*A: Alelo de Tadinia, B: Alelo de Yecora rojo e C: Alelo de UC 554.

Tabela 2. *Status* nos *bulks* e na população segregante [F_{11} Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] dos *primers* microssatélites (Série *wmc*) polimórficos entre *bulks*.

<i>Primer</i>	Polimorfismo em progenitores	<i>Status</i> na população
wmc183	ABC*	não ligado
wmc243	ABC	não ligado
wmc182	ABC	não ligado
wmc166	ABC	não ligado
wmc136	ABC	não ligado
wmc110	ABC	não ligado
wmc219	ABC	não ligado
wmc99	ABC	não ligado
wmc327	ABC	não ligado
wmc156	ABB	não ligado
wmc238	ABB	não ligado

*A: Alelo de Tadinia, B: Alelo de Yecora rojo, C: Alelo de UC 554.

6.3.2 Análise molecular com marcadores AFLPs

Das combinações de primers *Pst*I e *Mse*I testadas, apenas três exibiram polimorfismos desejados. A primeira delas exibiu presença de fragmento de DNA amplificado em Tadinia (pai resistente), ausência de banda em Yecora rojo e UC554 (pais susceptíveis, assumindo UC 554 com susceptível); presença de banda em *bulk* resistente e ausência de banda no *bulk* susceptível (Figura 2A). A segunda variante de polimorfismo observada manifestou ausência de banda em Tadinia, presença em Yecora rojo e UC 554; ausência de banda em *bulk* resistente e presença da mesma no *bulk* susceptível (Figura 2B). A terceira combinação de polimorfismo exibiu o seguinte padrão: presença de banda em Tadinia (pai resistente), ausência de banda em Yecora rojo, presença em UC554 (admitindo UC 554 como pai resistente segundo resultado das inoculações); presença de banda em *bulk* resistente e ausência de banda no *bulk* susceptível. (Figura 2C).

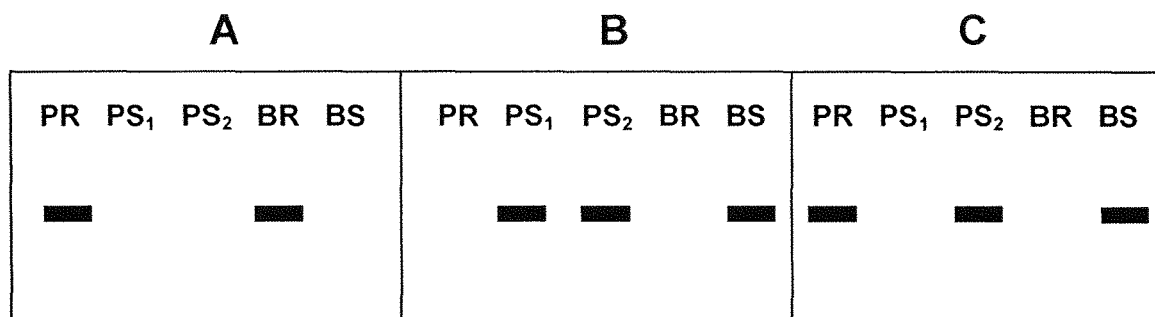


Figura 2 - Polimorfismo de AFLPs em progenitores e *bulks*. PR: Pai resistente (Tadinia); PS₁: Pai susceptível 1 (Yecora rojo); PS₂: Pai susceptível 2 (UC 554); BR: *Bulk* resistente; BS: *Bulk* susceptível.

Porém, quando plantas foram individualmente genotipadas, o padrão de polimorfismo verificado no *bulk* não foi mantido, sendo o mesmo, apenas consequência da presença de progênies não pertencentes ao cruzamento. Este fato foi verificado ao observar os *bulks* onde apareceram alguns alelos raros (presentes nos *bulks*, mas não nos pais). Isto sugere a presença de algumas progênies não pertencentes ao cruzamento no conjunto total de progênies. Devido a este fato e diante a impossibilidade de se obter os resultados esperados a análise de AFLPs da população F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC 554) foi interrompida. Uma posterior depuração desta população com base na informação proporcionada pelos marcadores microsatélites possibilitará a continuação do estudo com marcadores AFLPs.

Basicamente três fatores podem ser apontados como responsáveis pelo insucesso na detecção de genes de resistência a *Septoria tritici* nesta população. 1) população de mapeamento derivada de cruzamento triplo; 2) presença de progênies não pertencentes ao cruzamento (fora do tipo) e 3) comportamento não esperado do parental UC554 em relação à resistência a *Septoria tritici*.

A escolha da população de mapeamento adequada é um dos quesitos indispensáveis para garantir a detecção de genes de resistência. Populações derivadas de cruzamentos simples entre dois parentais contrastantes para o

caráter em estudo são as ideais. Nesta situação, a inclusão de um terceiro parental e a própria complexidade genômica do trigo, podem ser apontadas como as principais causas do insucesso deste trabalho. Como consequência da complexidade do genoma de trigo é freqüente observar microssatélites que amplificam mais de um loco dando como resultado um padrão complexo de bandas que dificulta em grande maneira a análise dos géis. Somado a isto, a inclusão de um terceiro parental contribuiu para dificultar ainda mais a análise dos dados moleculares sobre tudo em aqueles primers com polimorfismo do tipo ABB onde não é possível adjudicar as bandas a ambas linhagens parentais (Yecora rojo e UC554) em forma independente.

A presença de plantas contaminantes foi detectada dentro das progênies, isto é, plantas fenotipicamente diferentes da média das plantas de uma determinada progênie que foram detectadas na primeira avaliação da resistência em casa de vegetação. Através de uma caracterização agrônômica de todas as progênies, foram eliminadas as plantas contaminantes e as progênies purificadas foram avaliadas para resistência no ano seguinte. Embora esta purificação tenha sido efetiva para eliminar as plantas fora de tipo dentro de progênies não conseguiu eliminar progênies não pertencentes ao cruzamento detectadas através da análise de AFLPs e microssatélites, onde foram detectados alelos presentes nas progênies, mas ausentes nas linhagens parentais. Este foi outro dos fatores que influiu negativamente, complicando a análise molecular sobre tudo a de AFLPs, determinando a presença de falsos polimorfismos. Ainda estas progênies fora do tipo podem ser também as responsáveis por monomorfismos entre *bulks* fechados na análise com marcadores microssatélites.

O comportamento não esperado de UC554, cultivar que se esperava susceptível à doença e que na verdade comportou-se como moderadamente resistente a resistente nos três ambientes testados (Piracicaba, Castelar e Davis) teve uma influência negativa nos resultados. Segundo isto, UC 554 pode

estar contribuindo com alelos de resistência e de susceptibilidade, simultaneamente.

6.4 Conclusões

Não foi possível detectar genes de resistência na população F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC554). Três fatores podem ser apontados como responsáveis pelo insucesso na detecção de genes de resistência a *Septoria tritici* nesta população. 1) população de mapeamento derivada de cruzamento triplo; 2) presença de progênies não pertencentes ao cruzamento (fora do tipo) e 3) comportamento não esperado do parental UC554 em relação à resistência a *Septoria tritici*.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Detectou-se interação significativa entre resistência e estado fenológico nas progênies estudadas, o qual indica que existem genes de resistência que atuam especificamente em determinados estádios de desenvolvimento da cultura (estádio-específicos). Sendo significativa a interação genótipo x estágio fenológico, a aplicação de uma intensidade de seleção muito alta num determinado estágio fenológico, pode acarretar a perda de genótipos que em outros estádios poderiam apresentar um bom desempenho. Portanto, é recomendável aplicar baixas intensidades de seleção e avaliar as progênies em pelo menos dois estádios fenológicos.

Os isolados de *Septoria tritici* avaliados apresentaram diferenças significativas no grau de agressividade e virulência, indicando a presença de resistência horizontal e vertical nos genótipos estudados.

O insucesso na detecção de genes de resistência a *Septoria tritici* na população F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC 554) foi devido aos seguintes fatores: (i) população de mapeamento derivada de cruzamento triplo; (ii) presença de progênies não pertencentes ao cruzamento, e (iii) comportamento não esperado do parental UC554 em relação à resistência a *Septoria tritici*.

ANEXOS

ANEXO DO CAPÍTULO 1

Tabela A1. Anova conjunta dos estádios fenológicos de plântula-perfilhamento para a variável AFL. Progêneses F₁₁ [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Estádio	1	12,97606	12,9760	4,11	0,04599*
Bloco (Estádio)	6	0,691661	0,11527	0,04	0,9998 ^{ns}
Progêneses	79	938,7871	11,8833	3,77	0,0001**
Estádio x Prog.	79	249,1962	3,15438	93,06	0,0001**
Erro	474	16,06616	0,03389		
Total	639	1217,7173			

CV: 7,31. R²: 0,98. Média geral AFL: 2,52. FV: Fontes de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado médio.

ns: não significativo. *: significativo ao 5%. **: significativo ao 1%.

Tabela A2. Anova conjunta dos estádios fenológicos de plântula-folha bandeira para a variável AFL. Progêneses F₁₁ [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Estádio	1	4,02273	4,02273	0,63	0,4295 ^{ns}
Bloco (Estádio)	6	6,81893	1,13649	0,18	0,9820 ^{ns}
Progêneses	79	1194,536	15,1207	2,37	0,0001**
Estádio x Prog.	79	503,8466	6,37786	124,93	0,0001**
Erro	474	24,19886	0,05105		
Total	639	1733,423			

CV: 8,76. R²: 0,98. Média geral AFL: 2,58. FV: Fontes de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado médio.

ns: não significativo. *: significativo ao 5%. **: significativo ao 1%.

Tabela A3. Anova conjunta dos estádios fenológicos de perfilhamento – folha bandeira para a variável AFL. Progêneses F_{11} [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Estádio	1	2,548988	2,548988	0,30	0,5839 ^{ns}
Bloco (Estádio)	6	6,726743	1,121124	0,13	0,9917 ^{ns}
Progêneses	79	1163,924	14,73322	1,75	0,0001**
Estádio x Prog.	79	665,8760	8,428810	166,09	0,0001**
Erro	474	24,05443	0,050748		
Total	639	1863,1307			

CV: 9,24. R^2 : 0,98. Média geral AFL: 2,44. FV: Fontes de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado médio.

ns: não significativo. *: significativo ao 5%. **: significativo ao 1%.

Tabela A4. Anova conjunta dos estádios fenológicos de plântula-perfilhamento-folha bandeira para a variável AFL. Progêneses F_{11} [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Estádio	2	13,03185	6,515925	1,09	0,3393 ^{ns}
Bloco (Estádio)	9	7,118672	0,790964	0,13	0,9988 ^{ns}
Progêneses	79	1412,137	17,87516	2,99	0,0001**
Estádio x Prog.	158	945,9459	5,987000	132,36	0,0001**
Erro	711	32,15972	0,045232		
Total	959	2410,393			

CV: 8,47. R^2 : 0,98. Média geral AFL: 2,51. FV: Fontes de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado médio.

ns: não significativo, *: significativo ao 5%, **: significativo ao 1%.

ANEXO DO CAPÍTULO 3

Tabela A1. Anova da variável AFL no estágio fenológico de perfilhamento. Progêneses F₁₁ [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo (ano 1999).

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Blocos	2	0,371893	0,18594	2,28	0,1051 ^{ns}
Progêneses	79	488,3719	6,18192	75,96	0,0001**
Erro	158	12,85824	0,08138		
Total	239	501,6020			

CV: 13,62. R²: 0,97. Média geral AFL: 2,09. FV: Fontes de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado médio.
ns: não significativo. *: significativo ao 5%. **: significativo ao 1%.

Tabela A2. Anova da variável AFL no estágio fenológico de folha bandeira. Progêneses F₁₁ [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo (ano 1999).

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Blocos	2	0,119405	0,05970	0,73	0,4851ns
Progêneses	79	451,3508	5,71330	69,54	0,0001**
Erro	158	12,98046	0,08215		
Total	239	464,4507			

CV: 13,79. R²: 0,97. Média geral AFL: 2,07. FV: Fontes de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado médio.
ns: não significativo. *: significativo ao 5%. **: significativo ao 1%.

Tabela A3. Anova da variável AFL no estágio fenológico de plântula. Progêneses F_{11} [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo (ano 2000).

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Blocos	3	0,391928	0,13064	3,82	0,0106**
Progêneses	79	528,2830	6,68712	195,53	0,0001**
Erro	237	8,105296	0,03419		
Total	319	536,7802			

CV: 6,95. R^2 : 0,98. Média geral AFL: 2,66. FV: Fontes de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado médio.

ns: não significativo, *: significativo ao 5%, **: significativo ao 1%.

Tabela A4. Anova da variável AFL no estágio fenológico de folha bandeira. Progêneses F_{11} [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo (ano 2000).

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Blocos	3	6,427011	2,14233	31,55	0,0001**
Progêneses	79	1170,100	14,8113	218,12	0,0001**
Erro	237	16,09356	0,06791		
Total	319	536,7802			

CV: 10,4. R^2 : 0,98. Média geral AFL: 2,50. FV: Fontes de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado médio.

ns: não significativo. *: significativo ao 5%. **: significativo ao 1%.

53	1,5000	V	S	U	R	Q	X	T	W	
73	1,4467	V	S	U	R		X	T	W	
50	1,4433	V	S	U	R	Y	X	T	W	
27	1,4433	V	S	U	R	Y	X	T	W	
60	1,3867	V	S	U	Z	Y	X	T	W	
30	1,3333	V	S	A	U	Z	Y	X	T	W
77	1,3300	V		A	U	Z	Y	X	T	W
28	1,2767	V	B	A	U	Z	Y	X	T	W
40	1,2233	V	B	A	U	Z	Y	X		W
70	1,1633	V	B	A		Z	Y	X	C	W
25	1,1133	V	B	A		Z	Y	X	C	W
3	0,9433	V	B	A		Z	Y	X	C	W
26	0,8333	V	B	A		Z	Y	X	C	W
12	0,8333	V	B	A		Z	Y	X	C	W
63	0,7800	V	B	A		Z	Y	X	C	W
58	0,7800	V	B	A		Z	Y	X	C	W
72	0,7233	V	B	A		Z	Y	X	C	W
29	0,5567		B	A		Z	Y	X	C	W
33	0,5567		B	A		Z	Y	X	C	W
67	0,5567		B	A		Z	Y	X	C	W
18	0,5567		B	A		Z	Y	X	C	W
65	0,5000		B	A		Z	Y	X	C	
66	0,5000		B	A		Z	Y	X	C	
74	0,5000		B	A		Z	Y	X	C	
52	0,5000		B	A		Z	Y	X	C	
15	0,4433		B	A		Z	Y		C	
37	0,4433		B	A		Z	Y		C	
45	0,3900		B	A		Z			C	
14	0,3900		B	A		Z			C	
19	0,3867		B	A		Z			C	
24	0,3333		B	A					C	
35	0,2800		B						C	
34	0,2767		B						C	
43	0,2767		B						C	
46	0,2767		B						C	
8	0,2767		B						C	
13	0,1700								C	

Médias seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes. $\alpha = 0.05$. Linhagens parentais: 13 = 'Tadinia'; 56 = 'Yecora rojo' e 74 = 'UC 554'.

78	1,6667	T	Q	S	U	P	W	R	V
25	1,5033	T	Q	S	U	X	W	R	V
18	1,3900	T	Y	S	U	X	W	R	V
63	1,3867	T	Y	S	U	X	W	R	V
52	1,3867	T	Y	S	U	X	W	R	V
19	1,3333	T	Y	S	U	X	W	Z	V
29	1,2800	T	Y	A	U	X	W	Z	V
55	1,2767	T	Y	A	U	X	W	Z	V
51	1,1667	T	Y	A	U	X	W	Z	V
46	1,1100	T	Y	A	U	X	W	Z	V
16	1,1100	T	Y	A	U	X	W	Z	V
15	1,0533	T	Y	A	U	X	W	Z	V
45	1,0000	T	Y	A	U	X	W	Z	V
54	0,9467	T	Y	A	U	X	W	Z	V
17	0,9433	T	Y	A	U	X	W	Z	V
12	0,8867		Y	A	U	X	W	Z	V
35	0,8333		Y	A	X	W	Z	V	
65	0,7200		Y	A	X	W	Z		
58	0,6667		Y	A	X	W	Z		
74	0,6667		Y	A	X	W	Z		
77	0,6100		Y	A	X	Z			
26	0,5567		Y	A	X	Z			
27	0,5567		Y	A	X	Z			
47	0,5567		Y	A	X	Z			
30	0,5533		Y	A	X	Z			
67	0,5533		Y	A	X	Z			
57	0,5000		Y	A	X	Z			
73	0,5000		Y	A	X	Z			
24	0,4433		Y	A	Z				
60	0,4433		Y	A	Z				
66	0,4433		Y	A	Z				
64	0,4433		Y	A	Z				
70	0,3867		Y	A	Z				
28	0,3333			A	Z				
37	0,3333			A	Z				
8	0,3333			A	Z				
13	0,3300			A	Z				
3	0,2767			A					

Médias seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes. $\alpha = 0,05$.
 Linhagens parentais: 13 = 'Tadinia'. 56 = 'Yecora rojo'. 74 = 'UC 554'.

Tabela A7. Avaliação da performance das progênies F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC554) de trigo em relação ao isolado IPBR1 de *Septoria tritici*, no estágio fenológico de plântula (AFL: médias ordenadas em forma decrescente em quanto à severidade) (ano 2000).

Progênie	AFL					
66	4,8550					A
79	4,7725		B			A
64	4,7700		B			A
80	4,6650		B		A	C
6	4,6250		B		A	C
21	4,5850		B		A	C
11	4,5825		B		A	C
56	4,5825		B		A	C
42	4,5625		B		A	C
4	4,5425		B	D	A	C
50	4,4375		B	D	A	C
31	4,3975	E	B	D	A	C
41	4,3750	E	B	D	A	C
7	4,3325	E	B	D	A	C
68	4,3125	E	B	D	A	C
76	4,2925	E	B	D		C
60	4,1875	E		D	F	C
36	4,0000	E	G	D	F	
75	3,8725	E	G		F	H
2	3,7075		G	I	F	H
30	3,6875	J	G	I	F	H
5	3,5000	J	G	I	K	H
49	3,4800	J	G	I	K	H L
10	3,4575	J	G	I	K	H L
20	3,3750	J	M	I	K	H L
59	3,2700	J	M	I	K	N L
37	3,2300	J	M	I	K	N L
40	3,2075	J	M	I	K	N L
69	3,1875	J	M	I	K	N L
65	3,1450	J	M		K	N L
71	3,1050		M	O	K	N L
61	3,0225		M	O	K	N L
62	3,0000	P	M	O	K	N L
27	2,9375	P	M	O	Q	N L
54	2,8525	P	M	O	Q	N R
16	2,8325	P	M	O	Q	N R
53	2,8125	P		O	Q	N R
38	2,7925	P	S	O	Q	N R
72	2,7900	P	S	O	Q	N R
39	2,7700	P	S	O	Q	N R
9	2,5825	P	S	O	Q	T R
32	2,5650	P	S	O	Q	T R

23	2,4600	P	S	Q	T R
22	2,4575	P	S	Q	T R
1	2,4175		S	Q	T R
48	2,4150		S	Q	T R
24	2,3750		S	U	T R
17	2,2500		S	V U	T
57	2,1875			V U	T
28	2,1875			V U	T
73	2,1450			V U	T
55	1,8550		W	V U	
25	1,8325		W	V U	
70	1,7700		W	V X	
47	1,5600		W	X	Y
77	1,5425		W	Z X	Y
74	1,4575		W	Z X	Y
78	1,4150		W	Z X	Y
18	1,3750	A	W	Z X	Y
52	1,3125	A	W	Z X	Y B
43	1,2700	A		Z X	Y B
26	1,2700	A		Z X	Y B
58	1,2700	A		Z X	Y B
46	1,2700	A		Z X	Y B
51	1,2275	A		Z X	Y B
35	1,1900	A		Z	Y B
15	1,1675	A		Z C	Y B
45	1,1450	A		Z C	Y B
29	1,1450	A		Z C	Y B
13	1,1250	A		Z C	Y B
67	1,1050	A		Z C	Y B
33	1,1050	A		Z C	Y B
12	1,0425	A		Z C	Y B
34	1,0425	A		Z C	Y B
63	1,0425	A		Z C	Y B
19	1,0200	A		Z C	Y B
14	1,0000	A		Z C	B
44	0,8325	A		C	B
8	0,7925			C	B
3	0,6250			C	

Médias seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes. $\alpha = 0,05$.
 Linhagens parentais: 13 = 'Tadinia'. 56 = 'Yecora rojo'. 74 = 'UC 554'.

Tabela A8. Avaliação da performance das progênies F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC554) de trigo em relação ao isolado IPBR1 de *Septoria tritici*, no estágio fenológico de folha bandeira (AFL: médias ordenadas em forma decrescente em quanto à severidade) (ano 2000).

Progênie	AFL								
59	5,0000								A
20	5,0000								A
79	5,0000								A
56	5,0000								A
80	5,0000								A
41	4,9575								A
53	4,9575								A
2	4,9575								A
10	4,9575								A
40	4,9575								A
27	4,9175								A
39	4,9175								A
42	4,9150								A
25	4,8725		B						A
68	4,6675		B					A	C
37	4,5400		B	D				A	C
38	4,3350	E	B	D				A	C
71	4,3325	E	B	D				A	C
50	4,3325	E	B	D				A	C
21	4,2500	E	B	D				A	C F
74	4,1250	E	B	D	G			C	F
36	4,1250	E	B	D	G			C	F
5	4,0825	E	H	D	G			C	F
31	4,0400	E	H	D	G			C	F
4	4,0000	E	H	D	G	I		C	F
19	3,8325	E	H	D	G	I	J	F	
69	3,6675	E	H	K	G	I	J	F	
72	3,6675	E	H	K	G	I	J	F	
76	3,6675	E	H	K	G	I	J	F	
6	3,6250	E	H	K	L	G	I	J	F
48	3,5425		H	K	L	G	I	J	F
9	3,4175		H	K	L	G	I	J	
65	3,3750		H	K	L	G	I	J	
32	3,3750		H	K	L	G	I	J	
33	3,3325		H	K	L		I	J	
62	3,2525			K	L		I	J	
34	3,2475			K	L		I	J	
22	3,2075			K	L			J	
14	3,1250			K	L	M		J	
49	3,0850			K	L	M		J	
15	3,0825			K	L	M		J	
18	3,0825			K	L	M		J	
1	3,0425			K	L	M			

24	3,0000	N	K L M		
61	2,8750	N	L M		
23	2,3750	N	M	O	
51	2,2500	N		O	
55	2,2500	N		O	
44	2,0825			O	
63	1,2500		P		
17	1,0000	Q	P		
73	0,9575	Q	P R		
16	0,9175	Q	S P R		
29	0,8325	T	Q S P R		
66	0,7075	T	Q S P R U		
43	0,4600	T	Q S R U		
78	0,4150	T	Q S R U		
60	0,3750	T	Q S R U		
11	0,2925	T	Q S R U		
57	0,2500	T	Q S R U		
35	0,2075	T	S R U		
70	0,1675	T	S U		
26	0,1675	T	S U		
7	0,1675	T	S U		
64	0,1250	T		U	
13	0,0425			U	
67	0,0425			U	
30	0,0000			U	
28	0,0000			U	
54	0,0000			U	
45	0,0000			U	
52	0,0000			U	
3	0,0000			U	
58	0,0000			U	
75	0,0000			U	
12	0,0000			U	
77	0,0000			U	
46	0,0000			U	
47	0,0000			U	
8	0,0000			U	

Médias seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes. $\alpha = 0,05$.
 Linhagens parentais: 13 = 'Tadinia'. 56 = 'Yecora rojo'. 74 = 'UC 554'.

Tabela A9. Severidades médias das progênie F₁₁ [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo pertencentes aos extremos resistente e suscetível da população (estádio fenológico de perfilhamento (ano 1999).

Extremo Resistente		Extremo Suscetível	
Progênie	AFL ^a	Progênie	AFL ^a
8	0,28	6	4,61
46	0,28	80	4,61
43	0,28	4	4,44
34	0,28	10	4,39
35	0,28	42	4,28
24	0,33	41	4,28
19	0,39	2	4,22
14	0,39	55	4,07
45	0,39	7	3,89
37	0,44	20	3,89
15	0,44	5	3,72
52	0,50	11	3,72
AFL média do extremo R: 0,36		AFL média do extremo S: 4,18	

a: escala de Ziv & Eyal (1987): (0-5) (0= 0%, 1= 5%, 2= 20%, 3= 50%, 4= 70%, 5= 100%).

Tabela A10. Severidades médias das progênes F_{11} [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo pertencentes aos extremos resistente e suscetível da população (estádio fenológico de folha bandeira) (ano 1999).

Extremo Resistente		Extremo Suscetível	
Progênie	AFL ^a	Progênie	AFL ^a
3	0,28	10	4,67
8	0,33	80	4,61
37	0,33	20	4,50
28	0,33	39	4,44
70	0,39	42	4,44
64	0,44	41	4,39
66	0,44	6	4,28
60	0,44	40	4,11
24	0,44	21	4,00
73	0,50	4	3,61
57	0,50	76	3,57
67	0,55	38	3,44
AFL média do extremo R: 0,41		AFL média do extremo S: 4,17	

a: escala de Eyal & Brown (1976): (0-5) (0= 0%, 1= 12%, 2= 20%, 3= 50%, 4= 75%, 5= 87%).

Tabela A11. Severidades médias das progênies F₁₁ [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo pertencentes aos extremos resistente e suscetível da população (estádio fenológico de plântula) (ano 2000).

Extremo Resistente		Extremo Suscetível	
Progênie	AFL ^a	Progênie	AFL ^a
8	0,79	66	4,86
44	0,83	69	4,77
14	1,00	64	4,77
19	1,02	80	4,67
63	1,04	6	4,63
34	1,04	21	4,59
12	1,04	11	4,58
33	1,10	42	4,56
67	1,11	4	4,54
3	1,13	50	4,44
29	1,15	31	4,39
45	1,15	41	4,38
AFL média do extremo R: 1,03		AFL média do extremo S: 4,60	

a: escala de Ziv & Eyal (1987): (0-5) (0= 0%, 1= 5%, 2= 20%, 3= 50%, 4= 70%, 5= 100%).

Tabela A12. Severidades médias das progênes F_{11} [Tadinia x (Yecora rojo x UC 554)] de trigo pertencentes aos extremos resistente e suscetível da população (estádio fenológico de folha bandeira) (ano 2000).

Extremo Resistente		Extremo Suscetível	
Progênie	AFL ^a	Progênie	AFL ^a
8	0,00	59	5,00
47	0,00	20	5,00
46	0,00	79	5,00
77	0,00	80	5,00
12	0,00	41	4,96
75	0,00	53	4,98
58	0,00	2	4,96
3	0,00	10	4,96
52	0,00	40	4,92
45	0,00	27	4,92
54	0,00	39	4,92
28	0,00	42	4,92
AFL média do extremo R: 0,00		AFL média do extremo S: 4,96	

a: escala de Eyal & Brown (1976): (0-5) (0= 0%, 1= 12%, 2= 20%, 3= 50%, 4= 75%, 5= 87%).

ANEXO DO CAPÍTULO 4

Tabela A1. Principais características dos primers microssatélites (Série wms *Germany*) e polimorfismo revelado na avaliação dos progenitores Tadinia, Yecora rojo e UC 554 e das progênes F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC 554) integrantes dos *bulks* resistente (R) e susceptível (S).

<i>Primer</i>	Cromossomo	Temperatura anelamento (°C)	Polimorfismo em progenitores	Polimorfismo em <i>Bulks</i> R e S
wms 6	4B	55	ABC	PM
wms 11	1B	50	ABC	M
wms 32	2A	55	ABC	PM
wms 46	7B	60	ABC	M
wms 88	6B	60	ABC	M
wms 99	1A	60	ABC	PM
wms 140	1B	55	ABC	M
wms 149	4B	55	ABC	M
wms 153	1B	60	ABC	M
wms 174	5D	55	ABC	PM
wms 233	7A	50	ABC	M
wms 274	1-7B	50	ABC	M
wms 276	7A	55	ABC	M
wms 282	7A	55	ABC	PM
wms 296	2A	55	ABC	M
wms 302	7B	60	ABC	M
wms 337	1D	55	ABC	M
wms 437	7D	50	ABC	M
wms 539	2D	60	ABC	M
wms 610	4A	60	ABC	M
wms 611	7B	55	ABC	M
wms 5	3A	50	ABB	M
wms 30	3A	50	ABB	M
wms 44	7D	60	ABB	M
wms 66	5B	60	ABB	M
wms 107	4B	60	ABB	M
wms 111	7D	55	ABB	PM
wms 132	6B	60	ABB	M
wms 155	3A	60	ABB	M
wms 186	5A	60	ABB	M
wms 205	5D	60	ABB	M
wms 234	5B	55	ABB	M
wms 265	2A	55	ABB	M
wms 272	5D	50	ABB	M
wms 358	5D	55	ABB	M
wms 428	7D	60	ABB	M
wms 437	7D	50	ABB	M
wms 473	2A	55	ABB	M
wms 566	3B	60	ABB	M
wms 458	1D	60	ABB	M
wms 499	5B	60	ABB	M

wms 540	5B	55	ABB	M
wms 639	5-BD	55	ABB	M
wms 2	3A	50	ABA	M
wms 37	7D	60	ABA	M
wms 60	7A	60	ABA	M
wms 107	-	-	ABA	M
wms 154	5A	55	ABA	M
wms 160	4A	60	ABA	M
wms 183	3D	55	ABA	M
wms 190	5D	60	ABA	PM
wms 192	5D	60	ABA	M
wms 213	5B	60	ABA	PM
wms 247	3B	55	ABA	M
wms 251	4B	55	ABA	M
wms 259	1B	55	ABA	M
wms 264	1B	60	ABA	M
wms 273	1B	55	ABA	M
wms 293	5A	55	ABA	M
wms 294	2A	55	ABA	M
wms 297	7B	55	ABA	M
wms 314	3D	55	ABA	M
wms 333	7B	55	ABA	M
wms 334	6A	50	ABA	M
wms 335	5B	55	ABA	M
wms 340	3B	60	ABA	M
wms 341	3D	55	ABA	M
wms 344	7B	55	ABA	M
wms 359	2A	55	ABA	M
wms 383	3D	60	ABA	M
wms 389	3B	60	ABA	M
wms 397	4A	55	ABA	PM
wms 459	6A	55	ABA	M
wms 469	6D	60	ABA	M
wms 495	4B	60	ABA	M
wms 526	2B	55	ABA	M
wms 544	5B	55	ABA	M
wms 547	3B	60	ABA	M
wms 558	2A	55	ABA	M
wms 577	7B	55	ABA	M
wms 583	5D	60	ABA	M
wms 626	6B	50	ABA	M
wms 636	2A	50	ABA	M
wms 645	3D	55	ABA	M
wms 43	7B	60	AAC	M
wms 55	6D	60	AAC	M
wms 63	7A	60	AAC	M
wms 102	2D	60	AAC	M
wms 130	7A	60	AAC	M
wms 146	7B	60	AAC	M
wms 148	2B	60	AAC	M
wms 164	1A	55	AAC	M
wms 179	5A	55	AAC	M
wms 249	2A-D	55	AAC	PM
wms 257	2B	60	AAC	M
wms 261	2D	55	AAC	M

wms 264	1B	60	AAC	M
wms 268	1B	55	AAC	M
wms 275	2A	50	AAC	M
wms 339	2A	50	AAC	M
wms 372	2A	60	AAC	M
wms 427	6A	50	AAC	M
wms 515	2A	60	AAC	M
wms 558	2A	55	AAC	PM
wms 3	3D	55	AAA	M
wms 4	4A	55	AAA	M
wms 47	2B	60	AAA	M
wms 52	3D	60	AAA	M
wms 55	2-2B	60	AAA	M
wms 66	4-5B	60	AAA	M
wms 67	5B	60	AAA	M
wms 70	6B	60	AAA	M
wms 95	2A	60	AAA	M
wms 102	2D	60	AAA	M
wms 113	4B	55	AAA	M
wms 120	2B	60	AAA	M
wms 121	5-7D	50	AAA	M
wms 122	2A	60	AAA	M
wms 124	1B	60	AAA	M
wms 136	1A	60	AAA	M
wms 146	7B	60	AAA	M
wms 157	2D	60	AAA	M
wms 159	5B	60	AAA	M
wms 161	3D	60	AAA	M
wms 169	5B	60	AAA	M
wms 212	5D	60	AAA	M
wms 219	6B	55	AAA	M
wms 232	1D	60	AAA	M
wms 285	3B	55	AAA	M
wms 293	5A	55	AAA	M
wms 299	3B	55	AAA	M
wms 304	5A	55	AAA	M
wms 319	2B	55	AAA	M
wms 320	2D	55	AAA	M
wms 356	2A	55	AAA	M
wms 357	1A	60	AAA	M
wms 361	6B	60	AAA	M
wms 369	3A	55	AAA	M
wms 391	3A	55	AAA	M
wms 397	4A	60	AAA	M
wms 400	7B	55	AAA	M
wms 408	5B	55	AAA	M
wms 410	2B	55	AAA	M
wms 445	2A	55	AAA	M
wms 455	2D	55	AAA	M
wms 456	3D	60	AAA	M
wms 480	3A	60	AAA	M
wms 493	3B	60	AAA	M
wms 494	6A	60	AAA	M
wms 498	1B	60	AAA	M
wms 512	2A	60	AAA	M

wms 526	2B	55	AAA	M
wms 533	1-3B	60	AAA	M
wms 537	7B	60	AAA	M
wms 573	7A	50	AAA	M
wms 664	3D	55	AAA	M
wms 674	3A	60	AAA	M
wms 16	2B-5D-7B	50	NA	NA
wms 33	1-ABD	60	NA	NA
wms 68	5B-7B	60	NA	NA
wms 71	1-2A; 2-2A; 3D	60	NA	NA
wms 72	3B	55	NA	NA
wms 106	1D	60	NA	NA
wms 108	3B	60	NA	NA
wms 112	3B-7B	55	NA	NA
wms 114	3B-3D	60	NA	NA
wms 129	5A	50	NA	NA
wms 131	1B-3B	60	NA	NA
wms 135	1A	60	NA	NA
wms 156	5A	60	NA	NA
wms 191	2B-6B-5D	60	NA	NA
wms 210	2B-2D	60	NA	NA
wms 260	7A	55	NA	NA
wms 301	2D	55	NA	NA
wms 350	7A-7D	55	NA	NA
wms 376	3B	60	NA	NA
wms 415	5A	55	NA	NA
wms 497	1A-2A-3D	55	NA	NA
wms 518	6B	55	NA	NA
wms 614	2A	60	NA	NA
wms 644	6B-7B	60	NA	NA
wms 654	5D	55	NA	NA

A: Alelo de Tadinia. B: Alelo de Yecora rojo. C: Alelo de UC 554. PM: Polimórfico entre *bulks*. M: monomórfico entre *bulks*. NA: não amplificou (testados três vezes).

Tabela A2. Principais características dos primers microssatélites (Série wmc: *Wheat Microsatellite Consortium*) e polimorfismo revelado na avaliação dos progenitores Tadinia, Yecora rojo e UC 554 e das progêneses F₁₁ Tadinia x (Yecora rojo x UC 554) integrantes dos bulks resistente (R) e susceptível (S).

<i>Primer</i>	Cromossomo	Temperatura Anelamento (°C)	Polimorfismo em progenitores	Polimorfismo em Bulks R e S
wmc183	.*	50	ABC	PM
wmc243	2D-B; 6A-7A;4A-3A	60	ABC	PM
wmc177	2A	50	ABC	M
wmc182	3-6-7B; 3-7D; 7A	50	ABC	PM
wmc166	-	50	ABC	PM
wmc8	4B	60	ABC	M
wmc167	-	50	ABC	M
wmc173	4A	50	ABC	M
wmc136	5B-5D-4A	60	ABC	PM
wmc105	-	60	ABC	M
wmc109	7D-3D-5B-2A?-4D	60	ABC	M
wmc110	5A	60	ABC	PM
wmc111	2D	60	ABC	M
wmc74	4B-5B-4D-5A	60	ABC	M
wmc219	3A-4A	60	ABC	PM
wmc218	7B	60	ABC	M
wmc138	-	50	ABC	M
wmc82	-	60	ABC	M
wmc91	-	60	ABC	M
wmc94	7D	50	ABC	M
wmc97	5D	50	ABC	M
wmc99	3D; 3A; 7D	50	ABC	PM
wmc25	2B; 2D; 5B; 2A	50	ABC	M
wmc356	2A; 2B	60	ABC	M
wmc326	3B	60	ABC	M
wmc327	-	60	ABC	PM
wmc317	-	60	ABC	M
wmc226	-	50	ABC	M
wmc103	2A-6B-6A	50	ABC	M
wmc156	1B	50	ABB	PM
wmc160	5B	50	ABB	M
wmc184	-	60	ABB	M
wmc238	4B	60	ABB	PM
wmc180	-	50	ABB	M
wmc14	7D	60	ABB	M
wmc79	4A-4D	60	ABA	M
wmc157	-	50	ABA	M
wmc17	7A	50	ABA	M
wmc19	-	60	ABA	M
wmc24	1A	50	ABA	M
wmc236	-	60	AAC	M
wmc107	-	60	AAC	M
wmc231	3B	60	AAC	M
wmc84	-	50	AAC	M
wmc90	-	50	AAC	M

wmc88	-	50	AAC	M
wmc143	-	50	AAA	M
wmc150	-	50	AAA	M
wmc164	-	50	AAA	M
wmc213	-	50	AAA	M
wmc237	7B	60	AAA	M
wmc240	-	60	AAA	M
wmc108	-	50	AAA	M
wmc113	-	50	AAA	M
wmc115	-	50	AAA	M
wmc116	-	60	AAA	M
wmc197	-	50	AAA	M
wmc77	-	60	AAA	M
wmc92	-	50	AAA	M
wmc95	6B-1A	50	AAA	M
wmc76	-	50	AAA	M
wmc325	-	60	AAA	M
wmc206	2B-2D	60	AAA	M
wmc318	5D	60	AAA	M
wmc319	-	60	AAA	M
wmc321	-	60	AAA	M
wmc324	-	60	AAA	M
wmc18	2D	60	AAA	M
wmc21	-	60	AAA	M
wmc23	-	60	AAA	M
wmc27	2B	60	AAA	M
wmc78	3B	50	AAA	M
wmc81	-	60	AAA	M
wmc209	-	50	AAA	M
wmc210	-	50	AAA	M
wmc211	-	60	AAA	M
wmc22	-	50	AAA	M
wmc25	-	50	AAA	M
wmc34	-	50	AAA	M
wmc233	5D	60	AAA	M
wmc101	-	50	AAA	M
wmc225	-	60	AAA	M
wmc227	-	60	AAA	M
wmc228	-	60	AAA	M
wmc158	7A	50	AAA	M
wmc13	-	60	NA	NA
wmc5	-	60	NA	NA
wmc9	4A	60	NA	NA
wmc10	7B	60	NA	NA
wmc106	-	50	NA	NA
wmc114	-	60	NA	NA
wmc36	-	60	NA	NA
wmc136	4A	60	NA	NA
wmc89	4A-4B-4D	50	NA	NA
wmc98	-	50	NA	NA
wmc20	1 ^A	50	NA	NA
wmc80	-	60	NA	NA
wmc207	-	60	NA	NA
wmc208	-	50	NA	NA
wmc16	4B	60	NA	NA

wmc26	-	60	NA	NA
wmc28	5B	50	NA	NA
wmc100	-	50	NA	NA
wmc229	-	60	NA	NA
wmc230	-	60	NA	NA

Alelo de Tadinia. B: Alelo de Yecora rojo. C: Alelo de UC 554. PM: Polimórfico entre *bulks*. M: Monomórfico entre *bulks*. NA: Não amplificou (testados três vezes). *: Ainda não foram mapeados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAMA, H.A.S.; MOUSSA, M.E. Identification of RAPD Markers Tightly Linked to the Dwarf Mosaic Virus Resistance gene in maize. **Maydica**, v.41, p.205-210, 1996.
- AHMED, H.U.; MUNDT, C.C.; COAKLEY, S. M. Host-pathogen relationship of geographically diverse isolates of *Septoria tritici* and wheat cultivars. **Plant Pathology**, v.44, p.838-847, 1995.
- ASSIGBETSE, K.B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M.P.; GEIGER, J.P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on Cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopathology**, v.84, p.622-626, 1994.
- ATTARI, H.E.; SARRAFI, A.; GARRIGUES, S.; DECHAMP-GUILLAUME, G.; BARRAULT, G. Diallel analysis of partial resistance to an Iranian strain of bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *cerealis*) in wheat. **Plant Pathology**, v.45, p.1134-1138, 1996.
- BENNETT, M.D.; SMITH, J.B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Philosophical Transcripts of the Royal Society of London**, v.274, p.227-274, 1976.

- BOSCARIOL, R.L.; SOUZA, A.A.; TSAI, S.M.; CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de regiões genômicas associadas à resistência a dois isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.2, p.132-138, 1998.
- BROWN, J.S.; KELLOCK, A.W.; PADDICK, R.G. Distribution and dissemination of *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter in relation to the epidemiology of speckled leaf blotch of wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.29, p.1139-1145, 1978.
- BROWN, J.K.; KEMA, G.H.J.; FORRER, H.R.; VERSTAPPEN, E.C.P.; ARRAIANO, L.S.; BRADING, P.A.; FOSTER, E.M.; FRIED, P.M.; JENNY, E. Resistance of wheat cultivars and breeding lines to septoria tritici blotch caused by isolates of *Mycosphaerella graminicola* in field trials. **Plant Pathology**, v.50, p.325-338, 2001.
- BRUNELLI, K.R. Mapeamento de genes de resistência a *Puccinia polysora* Undrew em milho (*Zea mays*). Piracicaba, 1999. 114p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BRYAN, G.J.; COLLINS, A.J.; STEPHENSON, P.; ORRY, A.; SMITH, J.B. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.557-563, 1997.
- BUCHANAN, F.C.; ADAMS, L.J.; LITTLEJOHN, R.P.; MADDOX, J.F.; CRAWFORD, A.M. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. **Genomics**, v.22, p.397-403, 1994.

- CHANTRET, V.; SOURDILLE, P.; RODER, M.; TAVAUD, M.; BERNARD, M.; DOUSSINAULT, G. Location and mapping of the powdery mildew resistance gene *MIRE* and detection of a resistance QTL by bulked segregant analysis (BSA) with microsatellites in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.1217-1224, 2000.
- COLWYN, M.T.; VOS, P.; ZABEAU, M.; JONES, D.A.; NORCOTT, K.A.; CHADWICK, B.P.; JONES, J.D.G. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. **Plant Journal**, v.8, p.785-794, 1995.
- DIERS, B.W.; MANSUR, L.; IMSANDE, J.; SHOEMAKER, R.C. Mapping of *Phytophthora* resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. **Crop Science**, v.32, p.377-383, 1992.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 1986. 355p.
- DU, C.G.; NELSON, L.R.; McDANIEL, M.E. *Septoria* and *Stagonospora* diseases of cereals: a compilation of global research. In: INTERNATIONAL SEPTORIA WORKSHOP, México, 1999. **Proceedings**. México: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo - CIMMYT, 1999. p.160-162.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, v.116, p.113-125, 1987.
- EYAL, Z.; AMIRI, Z.; WAHL, I. Physiologic specialization of *Septoria tritici*. **Phytopathology**, v.63, p.1087-1091, 1973.

- EYAL, Z.; BROWN, M.B. A quantitative method for estimating density of *Septoria tritici* pycnidia on wheat leaves. **Phytopathology**, v.66, p.11-14, 1976.
- EYAL, Z. Integrated control of *Septoria* diseases of wheat. **Plant Disease**, v.65, p.763-768, 1981.
- EYAL, Z.; SCHAREN, A.L.; PRESCOTT, J.M.; GINKEL, M. van. **Enfermedades del trigo causadas por *Septoria*: conceptos y métodos relacionados con el manejo de estas enfermedades**. México: CIMMYT, 1987. 45p.
- EYAL, Z.; SCHAREN, A.L.; HUFFMAN, M.D.; PRESCOTT, J.M. Global insights into virulence frequencies of *Mycosphaerella graminicola*. **Phytopathology**, v.75, p.1456-1462, 1985.
- FERREIRA, M.E.; YANDEL, B.S.; WILLIAMS, P.H.; OSBORN, T.C. Genetic mapping of locus controlling resistance to *Albugo candida* in *Brassica napus*. **Phytopathology**, v.85, p.218-220, 1995a.
- FERREIRA, M.E.; RIMMER, M.E.; WILLIAMS, P.H.; OSBORN, T.C. Mapping of loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. **Phytopathology**, v.85, p.213-217, 1995b.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 220p.
- GAIR, R.; JENKINS, J. E. E.; LESTER, E. **Cereal pests and diseases**. 4.ed. Suffolk: Farming Press, 1987. 268p.

- GILCHRIST, D.G.; SCHAREN, A.L. Host-pathogen relationships of wheat and *Septoria tritici*. **Phytopathology**, v.78, p.762-766, 1988.
- HALAMA, P. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola* teleomorph of *Septoria tritici* in France. **Plant Pathology**, v.45, p.135-138, 1996.
- HELGUERA, M.; KHAN, I.A.; DUBCOVSKY, J. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.625-631, 2000.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. **Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. 2.ed. Mexico: CIMMYT, 1994. 51p.
- JACOBS, T.; BROERS, L H.M. The inheritance of host plant effect on latency period of wheat leaf rust in spring wheat: estimation of gene action and number of effective factors in F₁, F₂ and backcross generations. **Euphytica**, v.44, p.197-206, 1989.
- JLIBENE, M.; GUSTAFSON, J.P.; RAJARAM, S. Inheritance of resistance to *Mycosphaerella graminicola* in hexaploid wheat. **Plant Breeding**, v.112, p.301-310, 1994.
- KEMA, G.H.J.; SILFHOUT, C.H. van. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem III. Comparative seedling and adult plant experiments. **Phytopathology**, v.87, p.266-272, 1997.

- KHAN, I.A.; PROCUNIER, J.D.; HUMPHREYS, D.G.; TRANQUILLI, G.; SCHLATTER, A.R.; MARCUCCI-POLTRI, S.; FROHBERG, R.; DUBCOVSKY, J. Development of PCR-Based markers for a high grain protein content gene from *Triticum turgidum* ssp. *Dicoccoides* transferred to bread wheat. **Crop Science**, v.40, p.518-524, 2000.
- KING, J.E.; COOK, R.J.; MELVILLE, S.C. A review of *Septoria* diseases of wheat and barley. **Annuary of Applied Biology**, v.103, p.345-373, 1983.
- KOLMER, J.A. Virulence in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* isolates from Canada to genes for adult-plant resistance to wheat leaf rust. **Plant Disease**, v.81, p.267-271, 1997.
- LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.1111-1115, 1993.
- LEE, T.S.; GOUGH, F.J. Inheritance of *Septoria* leaf blotch (*S. tritici*) and Pyrenophora tan spot (*P. tritici repentis*) resistance in *Triticum aestivum* cv. Carifen 12. **Plant Disease**, v.68, p.848-851, 1984.
- 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.397-401, 1989.
- LIU, Z.W.; BIYASHEV, R.M.; SAGHAI-MAROOF, M.A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.869-876, 1996.

- MADARIAGA, R.B. Presença em Chile de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter, estado sexuado de *Septoria tritici* Rob. ex Desm. **Agricultura Técnica**, v.46, p.209-211, 1986.
- MADARIAGA, R.B.; GILCHRIST, D.G.; MARTENSEN, A.N. Presence and role of *Mycosphaerella graminicola* in California wheat. **Phytopathology**, v.79, p.1141, 1989.
- MAHALINGAM, R.; SKORUPTA, H.T. Bulk segregant analysis for identification of RAPD markers associated with resistance to *Heterodera glycines* L. on linkage group A in Peking cultivar. **Soybean Genetics Newsletter**, v.22, p.237-241, 1995.
- MALVAS, C.C. Análise de ligação de genes de resistência de *Brassica oleracea* a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*. Piracicaba, 1998. 60p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- McDONALD, B.A.; MARTINEZ, J.P. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. **Phytopathology**, v.80, p.1368-1373, 1990.
- McINTOSH, R.A. Breeding wheat for resistance to biotic stresses. **Euphytica**, v.100, p.19-34, 1998.
- METHA, Y.R. **Doenças do trigo e seu controle**. 1.ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres/Summa Phytopathologica, 1978. 190p.

- METHA, Y.R. Occurrence of *Septoria tritici* and its perfect state in Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEPTORIA DISEASES OF CEREALS, 3., Zurich, 1989. **Proceedings**. Zurich: Swiss Federal Research Station for Agronomy, 1989. p.34-35.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESELLI, 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 the National Academy of Science**, v.88, p.9828-9832, 1991.
- MIKLAS, P.V.; JOHNSON, E.; STONE, V.; BEAVER, J.S.; MONTOYA, C.; ZAPATA, M. Selective mapping of QTLs conditioning disease resistance in common bean. **Crop Science**, v.36, p.1344-1351, 1996.
- NARVAEZ, I.; CALDWELL, R.M. Inheritance of resistance to leaf blotch of wheat caused by *Septoria tritici*. **Phytopathology**, v.47, p.529-530, 1954.
- OGLIARI, J.B. Identificação e localização de um gene de resistência de milho a *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs através do uso de marcadores moleculares microssatélites. Piracicaba, 1999. 114p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- PEARCE, W.L.; SANFORD D. A. van; HERSHMAN, D.E. Partial resistance to powdery mildew in soft red winter wheat. **Plant Disease**, v.80, p.1359-1362, 1996.
- PETERSON, R.F. **Wheat**: botany, cultivation, and utilization. New York: Interscience Publishers, 1965. 422p.

- POTTS, D.A.; HUGHES, G.R. Inheritance of resistance to *Septoria tritici* in wheat. **Canadian Journal of Plant Science**, v.67, p.285, 1987.
- PROVAN, J.; POWELL, W.; WAUGH, R. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.1078-1084.
- RAO-ARELLI A.P.; MYERS, G.O.; WEBB, D.M. DNA fingerprinting of soybean accessions with resistance to soybean cyst. **Soybean Genetics Newsletter**, v.21, p.212-218, 1994.
- RILLO, A.O.; CALDWELL, R.M. Inheritance of resistance to *Septoria tritici* in *Triticum aestivum* subsp. *vulgare* 'Bulgaria 88' (Abstr.). **Phytopathology**, v.56, p.897, 1966.
- ROBERT, O.; DEDRYVER, F.; LCONTE, M.; ROLLAND, B.; VALLEVIEILLE-POPE, C. Combination of resistance tests and molecular tests to postulate the yellow rust resistance gene *Yr17* in bread wheat lines. **Plant Breeding**, v.119, p.467-472, 2000.
- RÖDER, M.S.; PLASCHKE, J.; KONIG, S.U.; BORNER,A.; SORRELLS, M.E. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. **Molecular General Genetics**, v.246, p.327-333, 1995.
- RÖDER, M.S.; KORZUM, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M.H.; LEROY, P.; GANAL, M.W. A microsatellite map of wheat. **Genetics**, v.149, p.2007-2023, 1998.

- ROUPPE, J.; van der VOORT; WOLTERS, P.; FOLKERTSMA, R.; HUTTEN, R.; ZANDVOORT, P. van; VINKE, H.; KANYUKA, K.; BENDAHMANE, A.; JACOBSEN, E.; JANSSEN, R.; BAKKER, J. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.874-880, 1997.
- ROSIELLE, A.A.; BROWN, A.G.P. Inheritance, heritability and breeding behavior of three sources of resistance to *Septoria tritici* in wheat. **Euphytica**, v.28, p.385-392, 1979.
- SAADAOU, E.M. Physiologic specialization of *Septoria tritici* in Morocco. **Plant Disease**, v.71, p.153-155, 1987.
- SAGHAI MAROOF, M.A.; YUE, Y.G.; XIANG, Z.X.; STROMBERG, E.L.; RUFENER, L. Identification of quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot disease in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.539-546, 1996.
- SANDERSON, F.R.A. *Mycosphaerella* species as the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. and Desm. **New Zeland Journal of Botany**, v.10, p.707-710, 1972.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**: 8.0 edition. Cary, 1999.
- SCOTT, P.R.; SANDERSON, F.R.; BENEDIKZ, P.W. Occurrence of *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter teleomorph of *Septoria tritici* on wheat in UK. **Plant Pathology**, v.37, p.285-290, 1988.
- SHAW, M.W.; ROYLE, D.J. Airborne inoculum as a source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in the winter wheat crops in the UK. **Plant Pathology**, v.38, p.35-43, 1989.

- SIMON, M.R.; CORDO, C.A. Diallel analysis of four resistance components to *Septoria tritici* in six crosses of wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Breeding**, v.117, p.123-126, 1998.
- SINGH, D.; PARK, R.F.; McINTOSH, R.A. Inheritance of seedling and adult plant resistance to leaf rust of selected Australian spring and English winter wheat varieties. **Plant Breeding**, v.120, p.503-507, 2001.
- SOMASCO, O.A.; QUALSET, C.O.; GILCHRIST, D.G. Single-gene resistance to *Septoria tritici* blotch in the spring wheat cultivar 'Tadinia'. **Plant Breeding**, v.115, p.261-267, 1996.
- STATISTICA, version 5.0: electronic statistics textbook. Tulsa: StatSoft, 2002. Disponivel em: <[http://www. Statsoft.com/textbook/stathome.html](http://www.Statsoft.com/textbook/stathome.html)>. Acesso em: 20 abr. 2002.
- TORABI, M.; NAZARI, K. Seedling and adult plant resistance to yellow rust in Iranian bread wheat. **Euphytica**, v.100, p.51-54, 1998.
- TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G.A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, v.322, p.652-656, 1986.
- VANDERPLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. Orlando: Academic Press, 1984. 194p.

- VEREET, J.A.; HOFFMANN, G.M.; PORTNER, J. Nachweis des Teleomorph *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter (Anamorph: *Septoria tritici* Rob. apud Desm.) in der Bundesrepublik Deutschland. **Journal of Phytopathology**, v.130, p.105-110, 1990.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.
- WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G.; THANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.1-6, 1994.
- WIESE, M.V. *Septoria* Leaf and Glume Blotch. **Compendium of wheat diseases**. Minnesota: American Phytopathological Society, 1977. 106p.
- WILSON, R.E. Resistance to *Septoria tritici* in two wheat cultivars determined by independent, single dominant genes. **Australian Plant Pathology**, v.8, p.16-18, 1979.
- WU, K.S.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular General Genetics**, v.241, p.225-235, 1995.
- ZHANG, Q.; SHEN, B.Z.; DAI, X.K.; MEI, M.H.; SAGHAI MAROOF, M.A.; LI, Z.B. Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.91, p.8675-8679, 1994.

ZIV, O.; EYAL, Z. Assessment of yield component losses caused in plants of spring wheat cultivars by selected isolates of *Septoria tritici*. **Phytopathology**, v.68, p.791-796, 1978.

ZIV, O.; SACKS, J.M.; EYAL, Z. Inheritance of tolerance to *Septoria* leaf blotch of wheat. **Phytopathology**, v.71, p.119-123, 1981.

ZUCKERMAN, E.; ESHEL, A.; EYAL, Z. Physiological aspects related to tolerance of spring wheat cultivars to *Septoria tritici* Blotch. **Phytopathology**, v.87, p.60-65, 1996.