

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**INTRODUCCIÓN DE *Fhb1-Sr2* PARA INCREMENTAR LA RESISTENCIA  
A FUSARIOSIS DE ESPIGA Y ROYA DE TALLO DE TRIGO**

por

**Miguel Angel RAFFO BUSCO**

TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de *Magister* en Ciencias  
Agrarias opción Ciencias  
Vegetales

Montevideo

URUGUAY

Julio 2019

Tesis aprobada por el tribunal integrado por: (PhD) Ariel Castro, (PhD) Clara Pritsch y (PhD) Silvia Pereyra, el 15 de julio de 2019. Autor: Ing. Agr. Miguel Raffo. Directora: Ing. Agr. (PhD) Silvia Germán, Co-director: Lic. Biol. (Dr.) Gustavo Azzimonti.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Ana por su paciencia, consejos y apoyo emocional durante todo el proceso de formación, elementos que han sido un soporte fundamental para el desarrollo de este trabajo.

A mis directores de tesis: Silvia Germán y Gustavo Azzimonti quienes aparte de haberme orientado y apoyado durante todo el proceso, me han transmitido valores profesionales que continuarán siendo mi guía en las actividades que vendrán.

A Clara Pritsch quien como profesora ha sabido despertar mi entusiasmo por las actividades de investigación, y me ha apoyado en las actividades de biología molecular desarrolladas en la tesis.

A Silvia Pereyra, Bettina Lado, Ariel Castro y todos los demás compañeros que de alguna forma han aportado constructivamente al desarrollo de este trabajo.

A Fernando, Richard, Noelia, Dahiana y Vanessa, quienes además de haberme ayudado con el trabajo han hecho que los días de trabajo sean amenos y de disfrute.

A mi familia y amigos quienes siempre me han dado fuerza y apoyo incondicional.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo económico y al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria por darme la posibilidad de llevar a cabo mi trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u> .....	1
1.1. TRIGO – CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE Y SITUACIÓN ACTUAL .....	1
1.2. FUSARIOSIS DE LA ESPIGA DE TRIGO.....	2
1.2.1. <u>Importancia mundial y en Uruguay</u> .....	2
1.2.2. <u>El patógeno</u> .....	2
1.2.3. <u>Ciclo y epidemiología</u> .....	4
1.2.4. <u>Condiciones predisponentes para la enfermedad</u> .....	5
1.2.5. <u>Síntomas</u> .....	5
1.2.6. <u>Efectos negativos sobre el cultivo</u> .....	5
1.2.7. <u>Estrategias de control de la enfermedad</u> .....	6
1.2.7.1. Variedades resistentes.....	6
1.2.7.2. Prácticas culturales.....	7
1.2.7.3. Control químico.....	7
1.2.7.4. Control biológico.....	8
1.3. ROYA DE TALLO DE TRIGO.....	8
1.3.1. <u>Importancia mundial y en Uruguay</u> .....	8
1.3.2. <u>Características generales de la RT</u> .....	9
1.4. MARCADORES MOLECULARES Y SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES .....	10
1.5. RESISTENCIA GENÉTICA.....	14
1.5.1. <u>Resistencia genética a FE</u> .....	15
1.5.1.1. Tipos y mecanismos de resistencia a FE.....	15
1.5.1.2. Fuentes de resistencia a FE.....	17
1.5.1.3. QTL de resistencia a FE reportados.....	18
1.5.1.4. <i>Fhb1</i> .....	20
1.5.1.5. Efecto de la acumulación de QTL de resistencia..	23
1.5.2. <u>Mejoramiento por resistencia a FE y fuentes de                 resistencia utilizadas en el Programa de Mejoramiento                 Genético de Trigo de INIA</u> .....	25
1.5.3. <u>Resistencia genética a RT</u> .....	27
1.5.3.1. Genes mayores.....	27
1.5.3.2. Genes menores y QTL.....	29

1.5.3.3. <i>Sr2</i> .....	31
1.5.4. <u>Mejoramiento por resistencia a RT en el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo de INIA</u> .....	31
1.6. OBJETIVO GENERAL.....	33
1.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
1.8. HIPÓTESIS.....	33
2. <u>INTROGRESSION OF THE COUPLED <i>Fhb1-Sr2</i> FOR RESISTANCE TO FUSARIUM HEAD BLIGHT AND STEM RUST INTO URUGUAYAN ELITE WHEAT CULTIVARS</u> .....	34
2.1. SUMMARY.....	34
2.2. INTRODUCTION.....	35
2.3. MATERIAL AND METHODS.....	37
2.3.1. <u>Plant materials and development of populations</u> .....	37
2.3.2. <u>Marker-assisted selection</u> .....	40
2.3.3. <u>Evaluation of Fusarium Head Blight and Stem Rust resistance</u> .....	41
2.3.4. <u>Statistical analysis</u> .....	43
2.4. RESULTS.....	44
2.4.1. <u>Development of <i>Fhb1-Sr2</i> lines</u> .....	44
2.4.2. <u>Fusarium Head Blight Type II resistance</u> .....	44
2.4.3. <u>Stem rust resistance</u> .....	47
2.5. DISCUSSION.....	48
2.6. CONCLUSIONS.....	51
2.7. ACKNOWLEDGMENTS.....	52
2.8. REFERENCES.....	52
3. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES</u> .....	60
4. <u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u> .....	66

## RESUMEN

La fusariosis de la espiga (FE) y la roya de tallo (RT) amenazan la sustentabilidad del cultivo de trigo en el mundo. *Fhb1* es un QTL que confiere alto nivel de resistencia a FE, pero está presente en muy baja proporción del germoplasma del Programa de Mejoramiento Genético de Trigo de INIA-Uruguay. *Sr2* es un gen extensamente utilizado que confiere resistencia parcial duradera a RT. *Fhb1* y *Sr2* están ligados en repulsión, aproximadamente a 3cM en el cromosoma 3B. Recientemente en la Universidad de Minnesota, EUA, se desarrollaron líneas de trigo con *Fhb1* y *Sr2* acoplados. Para incorporar *Fhb1-Sr2* en cultivares uruguayos elite, una línea donante fue cruzada y retrocruzada tres veces con cuatro cultivares que no portan ambos genes y que expresan un nivel de resistencia a FE y RT de intermedio a bajo: Génesis 2375, Génesis 6.87, INIA Madrugador e INIA Don Alberto. Los genotipos portadores de *Fhb1-Sr2* fueron seleccionados de la descendencia de cada cruce utilizando el marcador molecular *UMN10* para *Fhb1* durante el proceso de retrocruzamiento. En la descendencia de la última retrocruza, se utilizaron *UMN10* y *SNP-3BS-8* para *Fhb1*, y *Sr2-ger9* para *Sr2*, para seleccionar líneas homocigotas de los cuatro cruzamientos. El efecto de *Fhb1* sobre la resistencia a FE en los cuatro diferentes backgrounds genéticos fue cuantificado en experimentos de invernáculo, comparando la severidad de infección entre líneas homocigotas con y sin los marcadores para *Fhb1* y *Sr2*. Los resultados del ANOVA mostraron que *Fhb1* tuvo un efecto significativo aumentando el nivel de resistencia Tipo II en las cuatro poblaciones (disminución promedio de N\_AUDPC de 18,4 %) y que su efecto fue independiente de la población. Un experimento preliminar de RT de campo indicó que las líneas portadoras de *Sr2* tuvieron una disminución en el coeficiente de infección de 54,5 y 76,5 % en las poblaciones derivadas de Génesis 2375 y Génesis 6.87, respectivamente. La introducción de *Fhb1-Sr2* en estas líneas y su utilización en programas de mejoramiento permitirá aumentar y diversificar la resistencia a FE y RT, y reducir el riesgo de epidemias.

*Palabras clave:* *Triticum aestivum*, fusariosis de espiga, roya de tallo, resistencia, *Fhb1-Sr2*.

## **INTRODUCTION OF *Fhb1*-*Sr2* TO INCREASE THE RESISTANCE TO FUSARIUM HEAD BLIGHT AND STEM RUST OF WHEAT**

### **SUMMARY**

Fusarium head blight (FHB) and Stem rust (SR) threaten the sustainability of the wheat crop worldwide. *Fhb1* is a QTL that confers high level of FHB resistance but is present in a very low proportion of INIA-Uruguay Wheat-Breeding Program germplasm. *Sr2* is a widely used gene conferring durable partial resistance to SR. *Fhb1* and *Sr2* are linked in repulsion, approximately 3 cM apart on chromosome 3B. Lines with *Fhb1* and *Sr2* in coupling were recently developed at the University of Minnesota, USA. In order to incorporate *Fhb1*-*Sr2* into Uruguayan elite wheat cultivars, a donor line was crossed and backcrossed three times with four cultivars lacking both genes and expressing an intermediate to low level of resistance to FHB and SR: Génesis 2375, Génesis 6.87, INIA Madrugador and INIA Don Alberto. Genotypes carrying *Fhb1*-*Sr2* were selected from the offspring of each cross using the molecular marker UMN10 for *Fhb1* during backcrossing. In the offspring of the last backcross, UMN10 and SNP-3BS-8 for *Fhb1*, and *Sr2*-ger9 for *Sr2*, were used to select homozygous lines in the four crosses. The effect of *Fhb1* on the resistance to FHB in the four different genetic backgrounds was quantified in greenhouse experiments comparing the severity of infection of homozygous lines with and without the *Fhb1* and *Sr2* markers. The ANOVA results showed that *Fhb1* had a significant effect increasing Type II resistance in the four populations (average reduction of N\_AUDPC of 18.4 %), and that its effect was independent of the population. A SR field test indicated that lines with *Sr2* had a coefficient of infection decrease of 54.5 and 76.5 % in the populations derived from Génesis 2375 and Génesis 6.87, respectively. The introduction of *Fhb1*-*Sr2* in these lines and their utilization in Wheat Breeding Programs might contribute to increase and diversify the resistance to FHB and SR, and to reduce the risk of epidemic outbreaks.

*Keywords:* *Triticum aestivum*, Fusarium head blight, stem rust, resistance, *Fhb1*-*Sr2*.

## **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1.1. TRIGO – CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE Y SITUACIÓN ACTUAL**

El trigo panadero (*Triticum aestivum*, Familia: *Poaceae*) ha sido el alimento básico de las principales civilizaciones de Europa, Asia y Norte de África durante más de 8000 años. Es el cultivo más sembrado a nivel mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2017), proporcionando alrededor de la quinta parte del total de calorías consumido por los humanos. Su origen fue en el cercano oriente (Matsuoka, 2011), que abarca el este del Mediterráneo, sureste de Turquía, norte de Iraq y oeste de Irán, en donde comenzó su proceso de domesticación alrededor de 10.000 años atrás.

Su cultivo se produce actualmente bajo diversas condiciones ambientales en 125 países, abarcando una superficie total de 219 millones de hectáreas (FAO, 2017). Los países de mayor producción son China, India, EE.UU., Rusia y Francia. En Uruguay, ha sido tradicionalmente el principal cultivo de invierno (DIEA, 2017), siendo su primer destino el mercado interno y en segundo lugar la exportación.

*Triticum aestivum* es una especie autógena alo-hexaploide ( $2n = 6x = 42$ , AABBDD) originada a partir de eventos de poliploidización entre la especie tetraploide *Triticum turgidum* spp. *diccicum* ( $2n = 4x = 28$ , AABB) y la especie diploide *Aegilops tauschii* ( $2n = 2x = 14$ , DD, Chantret, 2005). Su genoma es complejo comparado al de otros cultivos, debido a su gran tamaño (estimado en 16Gb), y a la alta proporción de secuencias repetidas (alrededor de 85 %, International Wheat Genome Sequencing Consortium - IWGSC, 2018). A pesar de ello, a través de esfuerzos realizados por el IWGSC, se ha conseguido secuenciar su genoma con una cobertura de 94 % en bloques de pseudomoléculas que se otganizan a lo largo de los cromosomas.



## **1.2. FUSARIOSIS DE LA ESPIGA DEL TRIGO**

### **1.2.1. Importancia mundial y en Uruguay**

La fusariosis de la espiga (FE) o golpe blanco, denominada en inglés *Fusarium head blight*, *head scab* o *ear blight*, es una de las enfermedades más severas que afecta el cultivo de trigo alrededor del mundo. Ha sido identificada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) como la principal limitante para la producción de trigo en algunas regiones (Xu, 2003).

La enfermedad es causada por especies del género *Fusarium* que afectan un amplio número de géneros de gramíneas y leguminosas de interés económico (Goswami y Kistler, 2004), entre ellas: *Triticum*, *Hordeum*, *Oryza*, *Avena*, *Zea*, *Glycine*, *Lolium*, *Medicago*, *Sorghum*, *Trifolium*.

Las epidemias de FE están estrechamente relacionadas a las condiciones ambientales y actualmente el impacto de la enfermedad se ha incrementado debido a los efectos indirectos del cambio climático (West *et al.*, 2012). Estudios nacionales (Díaz y Pereyra, 2011) mostraron que la frecuencia de ocurrencia de condiciones climáticas que predispongan las epidemias de FE en Uruguay tales como la del año 1977, ha aumentado en los últimos años. Actualmente, la FE presenta grandes desafíos para su control. Por este motivo es importante la adopción de un manejo que integre adecuadas prácticas culturales, control químico y principalmente la utilización de cultivares con niveles aceptables de resistencia genética, ya que por sí solas, ninguna de estas prácticas es totalmente efectiva.

### **1.2.2. El patógeno**

La FE puede estar causada por distintas especies biológicas del género *Fusarium*, entre las que se destacan por su importancia a nivel mundial y nacional, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. pseudograminearum*, *F. acuminatum*, *F. sporotrichioides* (Pereyra *et al.* 2006, Demeke *et al.* 2005). Sin embargo, el principal agente causal de esta enfermedad en la mayoría de los países, incluido Uruguay, lo constituyen especies que pertenecen al

complejo *Fusarium graminearum* (FGSC) (Umpierrez-Falaiche *et al.* 2013, Pereyra *et al.* 2006). Dentro de este complejo, se han reportado 16 especies filogenéticamente distintas (Sarver *et al.* 2011, Yli-Mattila *et al.* 2009, O'Donnell *et al.* 2008, Starkey *et al.* 2007), capaces de producir micotoxinas, particularmente del grupo de tricotecenos tipo B y zearalenona (Jansen *et al.*, 2005).

En todos los casos, las especies se distribuyen globalmente de acuerdo con las condiciones climáticas, geográficas y a los distintos hospederos presentes en los sistemas (van der Lee *et al.* 2015, Doohan *et al.* 2003).

En FGSC se reconocen varios quimiotipos relacionados a la producción de micotoxinas: la zearalenona (ZEA), tricotecenos como el deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) y sus formas acetiladas de DON (Ac-DON, Buerstmayr *et al.* 2009, Díaz *et al.* 2002). Los quimiotipos suelen estar asociados a regiones geográficas específicas (Xu y Nicholson, 2009): en Europa el quimiotipo dominante es 15-AcDON (Talas *et al.* 2011, Jennings *et al.* 2004), en Asia predomina el quimiotipo productor de NIV (Zhang *et al.*, 2007), en América del Sur predomina el quimiotipo DON y 15-AcDON (Alvarez *et al.*, 2009) pero también se ha reportado el quimiotipo NIV en Brasil y Argentina (Sampietro *et al.*, 2011), en América del Norte el quimiotipo prevalente es 3-AcDON (Ward *et al.*, 2008). En Uruguay, la especie predominante *Fusarium graminearum* es productora de los tricotecenos DON y 15-AcDON. Sin embargo, en la última década se han reportado quimiotipos productores de ZEA (Umpiérrez-Falaiche *et al.* 2013, Pereyra *et al.* 2006) debido a la presencia de las nuevas especies detectadas al Este del país.

Otra característica de gran importancia en las poblaciones de *Fusarium* es su agresividad, definida generalmente como la capacidad del patógeno en causar síntomas de enfermedad de mayor o menor magnitud en el hospedero (Pariaud *et al.*, 2009). Esta característica es cuantitativa, heredada como un carácter complejo (Miedaner, 1997), asociada generalmente a la expresión de varios genes localizados en diferentes regiones del genoma (QTL, Quantitative Trait Loci, Pariaud *et al.*, 2009).

### 1.2.3. Ciclo y epidemiología

*Fusarium graminearum* es saprófito y parásito facultativo (Bushnell *et al.* 2003, Araus *et al.* 1993) con capacidad de colonizar eficientemente el tejido vivo de sus hospederos en cualquier momento del ciclo de vida del huésped. Posteriormente, puede establecerse en el tejido senescente y en rastrojos (Figura 1). Esto último podría haber contribuido a una mayor importancia de la enfermedad en los sistemas actuales de labranza de siembra directa, donde persiste en el residuo del cultivo.

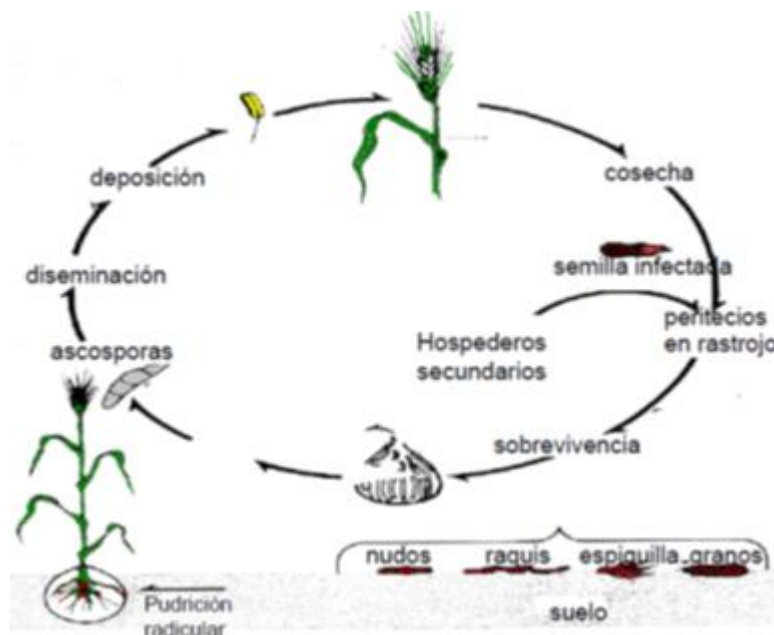


Figura no 1: Ciclo de fusariosis de la espiga (modificado de Reis, 1988).

*Fusarium graminearum* produce ascosporas originadas de forma sexual en los peritecios que representan el inóculo primario y principal de la enfermedad (Díaz y Pereyra 2011, Díaz 1996). Su modo de diseminación puede ser a través del viento, dispersándose a varios kilómetros de distancia, pero el inóculo endógeno de la chacra es el más importante para causar epidemias. La segunda clase de esporas producidas son los macroconidios, estructuras originadas asexualmente en los esporoquios, que a diferencia de las ascosporas se producen en menor proporción y sólo pueden diseminarse a cortas distancias por salpicado de las gotas de lluvia.

#### **1.2.4. Condiciones predisponentes para la enfermedad**

Las condiciones climáticas que favorecen la infección y posterior desarrollo del patógeno en el hospedero son temperaturas de 15 a 30 °C, con un óptimo de 25 °C, y condiciones de humedad relativa mayor a 90 % durante un periodo de 48 a 72 horas (Andersen, 1948). Para que ocurran epidemias es necesario que estas condiciones se den al momento de mayor susceptibilidad del cultivo (floración - llenado del grano).

#### **1.2.5. Síntomas**

La infección inicia cuando las ascosporas y/o conidios germinan sobre las anteras y comienzan a colonizar el ovario, otras estructuras florales y el resto de la espiga (Bushnell *et al.* 2003, Pritsch *et al.* 2000, Schroeder y Christensen 1963). Las espiguillas afectadas se tornan descoloridas rápidamente debido a la descomposición de su clorofila. Si las condiciones ambientales son muy favorables para el patógeno, la infección avanzará por el raquis hacia las espiguillas adyacentes, a través de la inserción de la espiguilla al raquis. Posteriormente se puede observar una coloración salmón en la base y bordes de la gluma que corresponde a los conidios del hongo. Hacia el final del ciclo se observan los peritecios sobre las espigas (Bushnell *et al.* 2003, Pritsch *et al.* 2000).

#### **1.2.6. Efectos negativos sobre el cultivo**

Las consecuencias de la enfermedad son mayores mientras más temprano se dé la infección. Cuando la infección ocurre durante la floración puede provocar abortos de flores. Infecciones durante la etapa de llenado de grano determinan menor tamaño de grano, e infecciones tardías, granos normales pero contaminados con micotoxinas (Buerstmayr *et al.* 2009, Díaz *et al.* 2002). El principal efecto negativo de la FE se da por la contaminación del grano con las micotoxinas. Particularmente, las especies pertenecientes al FGSC producen tricotecenos B, dentro de los cuales se encuentran el deoxinivalenol (DON), el nivalenol (NIV) y los derivados acetilados 3-acetil deoxinivalenol (3ADON), 15-acetil deoxinivalenol (15ADON) y 4acetil nivalenol (fusarenol, FUS-X). El DON es la micotoxina más frecuentemente encontrada en

granos contaminados por estos hongos (Meneely et al., 2011). Esta situación causa severas pérdidas económicas debido a las restricciones comerciales, nacionales e internacionales, en cuanto al contenido de micotoxinas permitido. La Comisión Europea permite un límite máximo de 0.75 partes por millón (ppm) de concentración de DON en el cereal y de 0.5 ppm en el producto elaborado final (Champeil *et al.*, 2004). En Uruguay existe un decreto del año 2001 que estableció un máximo permitido de 1mg/kg (1 ppm) de DON en harina y subproductos de trigo para consumo humano (Decreto Poder Ejecutivo N° 533/01). Para la alimentación animal existe una resolución ministerial del 2001 (Cabella y Eguren, 2012) que establece el límite máximo de DON en raciones de 5 ppm para bovinos de carne, ovinos y aves; 2 ppm para bovinos de leche; 1 ppm para cerdos y equinos; 2 ppm para otros animales y de 10 ppm para las materias primas (granos y sus subproductos) destinados a la elaboración de alimentos para animales.

Las máximas pérdidas porcentuales de rendimiento de grano registradas en Uruguay han sido de 31 % (Díaz 1996). También se ven afectadas la calidad física del grano, debido a su menor tamaño y una reducida germinación, así como la calidad panadera, por la destrucción de gránulos de almidón, paredes celulares y proteínas del endosperma.

### **1.2.7. Estrategias de control de la enfermedad**

Con el fin de disminuir el riesgo de daños causados por la FE se han propuesto diferentes estrategias para su control (Díaz y Pereyra, 2011). Se recomienda la adopción de prácticas de manejo integradas, que impliquen buenas prácticas culturales, control químico y principalmente la utilización de variedades con adecuado nivel de resistencia genética.

#### **1.2.7.1. Variedades resistentes**

La elección de variedades resistentes es considerada como la medida más efectiva para controlar la enfermedad (Schroeder y Christensen, 1963). La aplicación de fungicidas y las prácticas culturales actúan como medidas complementarias y su

eficiencia dependerá del nivel de resistencia del cultivar con el que se trabaje (Buerstmayr *et al.*, 2009). A pesar de la variabilidad genética existente para la resistencia a FE, es difícil encontrar cultivares que combinen rendimiento de grano alto y estable, buena calidad industrial y resistencia a la FE. Se tratará en profundidad la resistencia genética más adelante.

#### **1.2.7.2. Prácticas culturales**

Durante la última década han ocurrido cambios en las prácticas culturales relacionados a la disminución del laboreo. Dill-Macky y Jones (2000) comprobaron que la presencia de *Fusarium* spp. es mayor en campos con siembra directa o labranza reducida que en campos donde se laboreo y se entierran los residuos. El largo de la rotación es otro factor que afecta la cantidad de inóculo primario. Rotaciones más cortas (con mayor frecuencia de gramíneas en la misma), resultan en general, en mayor presencia del patógeno y esta situación se ve agravada cuando se utilizan repetidamente cultivos hospederos y variedades susceptibles (Champeil *et al.*, 2004). En condiciones de Uruguay, períodos de un invierno, o preferentemente dos, sin cultivos susceptibles en una chacra podrían contribuir a disminuir la carga de inóculo en la misma (Pereyra y Dill-Macky, 2008). Sin embargo, la presencia de gramíneas tanto cultivadas como nativas en las chacras aseguran inóculo presente a lo largo de casi todo el año.

#### **1.2.7.3. Control químico**

Los productos basados en triazoles (tebuconazol, metconazol, o prothioconazol) han sido utilizados extensamente (Mesterházy, 2003), aplicados como mezclas o sin combinar. Sin embargo, su uso no es generalizado debido a los altos costos de aplicación y a su eficiencia variable, dependiendo tanto del estrecho momento de aplicación como de la precisión de la aplicación. Otros factores que limitan el control de la enfermedad son la morfología de la espiga y la capacidad de los productos de ingresar en la misma, o permanecer protegiéndola externamente durante la ocurrencia de condiciones favorables para la enfermedad.

Los principios activos de mayor eficiencia disponibles en Uruguay son el tebuconazol y el metconazol (Díaz y Pereyra, 2011) y portioconazol. Las aplicaciones con boquillas doble abanico, seguidos por las de abanico plano han resultado ser las más efectivas. Respecto al momento de aplicación, las dobles aplicaciones a Zadoks 61 (inicio de floración) y Zadoks 65 (plena floración) fueron las que controlaron mejor la enfermedad, pero el análisis económico mostró que dentro de las aplicaciones únicas, las realizadas a estado Z61 fueron más eficientes y más rentables.

#### **1.2.7.4. Control biológico**

Los agentes de control biológico como bacterias y hongos pueden utilizarse para el control de *F. graminearum* y sus toxinas (Khan y Doohan, 2009). Se ha observado que aplicaciones de *Pseudomonas flourescens* (cepas: MKB 158, MKB 249, y 202) reducen la severidad de la FE y son capaces de disminuir significativamente los niveles de DON (hasta un 74 %). Cepas de *Bacillus*, *Lysobacter*, *Pseudomonas* y *Cryptococcus* han demostrado ser agentes de biocontrol satisfactorios (Yuen y Schoneweis, 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no han mostrado control completo de la enfermedad y se requieren estudios adicionales para evaluar la eficiencia y supervivencia de las cepas, así como la interacción con otros organismos (Dweba *et al.*, 2017).

### **1.3. ROYA DE TALLO DEL TRIGO**

#### **1.3.1. Importancia mundial y en Uruguay**

La roya de tallo (RT) del trigo, causada por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, es otra de las enfermedades más importantes que afectan el cultivo de trigo en el mundo. Históricamente fue considerada la enfermedad más destructiva, convirtiéndose en la enfermedad más temida por productores de trigo (Singh *et al.*, 2011). Varias regiones productoras de trigo presentan condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad y están propensas a pérdidas severas. Sin embargo, la enfermedad estuvo bajo control durante décadas en muchas regiones. En el año 1998 se detectó una nueva raza del patógeno virulenta frente a un gen de resistencia ampliamente utilizado a nivel

mundial denominado *Sr31*. Esta raza se denominó TTKS, por su espectro de virulencias, y Ug99, por haber sido detectada primeramente en Uganda y caracterizada en el año 1999 (Pretorius *et al.*, 2000). En 2003, Ug99 fue encontrada en Kenia y en 2007 en Yemen (Wanyera *et al.* 2006, Pretorius *et al.* 2000). Esta raza podría migrar a otras regiones afectando a muchos de los cultivares actualmente utilizados (Singh *et al.* 2006, Kolmer 2005). En la misma región también se han detectado variantes de la raza Ug99, con virulencia adicional sobre el gen *Sr24* (TTKST) y *Sr36* (TTTSK). Al 2018, 14 variantes de Ug99 fueron identificadas desde Sudáfrica hasta Iran (Omrani, 2018) y no se habido reportes en los demás continentes. Debido a esta situación, en 2005 se creó un consorcio internacional denominado “Borlaug Global Rust Initiative” (BGRI) con los objetivos de mitigar y prevenir los efectos de la enfermedad (BGRI, 2018).

En nuestra región, el uso generalizado de cultivares con buena resistencia genética, portadores mayoritariamente de los genes *Sr24* y *Sr31*, limitó durante años la magnitud de las epidemias (Germán *et al.* 2011, Germán *et al.* 2007). Sin embargo, durante 2014, se observó una epidemia generalizada de roya del tallo en Argentina y Uruguay (4.6 millones de ha., Campos *et al.*, 2015). En Paraná (Argentina), las pérdidas de rendimiento promedio en ensayos experimentales fueron desde 13 a 21 %. En el año 2015 se repitió esta situación y posteriormente RT ha causado epidemias más leves y localizadas en cultivos comerciales de variedades susceptibles. Estas epidemias de RT probablemente fueron provocadas por el alto porcentaje del área sembrada con cultivares susceptibles, la cual alcanzó el 50 % en Argentina y el 48 % en Uruguay en 2014. La alta frecuencia de cultivares susceptibles puede explicarse en gran parte por el alto uso de cultivares de origen francés de alto rendimiento y que no poseen genes de resistencia a RT efectivos para las razas de *Puccinia graminis* presentes en la región.

### **1.3.2. Características generales de la RT**

*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* es un hongo biotrófico. La RT produce pústulas marrones de gran tamaño, que pueden afectar principalmente las vainas foliares y



tallos, pero también pueden observarse en hojas, glumas y aristas (Singh *et al.*, 2008). En la hoja, las pústulas generalmente se forman en el lado inferior, pero ocasionalmente pueden penetrar en la superficie superior.

El hongo puede crecer en un rango de temperatura de 2 a 30 °C con un óptimo entre 15 y 24 °C para la germinación de las urediniosporas, y de 5 a 40 °C con un óptimo en 30 °C para la esporulación (Roelfs *et al.*, 1992). Para que ocurra la infección se requiere agua libre sobre la superficie del follaje durante unas 6 a 8 horas. Debido a los requerimientos elevados de temperatura, la RT infecta a los cultivos cuando ya está avanzado su ciclo, afectando con mayor severidad las variedades que se siembran o maduran tardíamente.

Las esporas producidas por el hongo (urediniosporas) pueden diseminarse a tejidos nuevos de la misma planta o plantas adyacentes para causar nuevas infecciones, o pueden ser transportadas por el viento recorriendo cientos de kilómetros, e incluso atravesar continentes (Brown y Hovmøller 2002, Roelfs 1985). Los cultivos hospederos principales incluyen el trigo harinero, trigo duro, cebada y triticale. Durante el verano se ha comprobado la sobrevivencia local de *P. graminis* f. sp. *tritici* sobre plantas voluntarias o guachas de trigo y cebada (Germán *et al.*, 2011), a partir de las que se genera el inóculo primario para las infecciones en el cultivo.

#### **1.4. MARCADORES MOLECULARES Y SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES**

Los marcadores moleculares han demostrado ser herramientas invaluable para caracterizar los recursos genéticos, permitiendo mejorar nuestra comprensión y utilización de la variación genética dentro y entre las especies (Farokhzadeh y Alifakheri, 2014). El uso de marcadores moleculares es extensivo en diversos campos de las ciencias vegetales. Algunas de las áreas en las que han sido utilizados exitosamente son la evaluación de germoplasma, el mapeo genético, la postulación de genes y el mejoramiento de cultivos (Xu 2010, Jiang 2013).

La selección asistida por marcadores (SAM) se refiere al uso de marcadores moleculares que están estrechamente ligados a características de interés agronómico, como resistencia a estrés biótico y abiótico, y que pueden ser utilizados para sustituir o asistir a la selección fenotípica (Narasimhulu *et al.*, 2013). Existen cinco consideraciones principales para el uso de marcadores moleculares en SAM (Mackill y Ni, 2001, Mohler y Singrün 2004): i) confiabilidad: preferentemente los marcadores deben estar ligados a menos de 5 cM del locus de interés, ii) cantidad y calidad de ADN requerido: la utilización de algunos marcadores requiere gran cantidad de ADN, el cual algunas veces puede ser difícil de obtener en la práctica y aumentar los costos, iii) procedimiento técnico: el nivel de simplicidad para su uso y el tiempo requerido para la técnica, iv) polimorfismo: idealmente el marcador debería ser altamente polimórfico en el material de mejoramiento, v) costo: el uso del marcador debe ser rentable.

La SAM tiene un enorme potencial para mejorar la eficiencia y la precisión del mejoramiento genético. Los marcadores moleculares pueden clasificarse en dos categorías: marcadores clásicos y marcadores de ADN (Xu, 2010). Los marcadores clásicos incluyen los morfológicos, citológicos y bioquímicos. Los marcadores de ADN se han basado en diferentes técnicas de detección de polimorfismo como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su sigla en inglés), el método de hibridación Southern y la secuenciación de ADN (Collard *et al.*, 2005). Los marcadores más extensamente utilizados en cereales son los SSRs (simple Sequence Repeats) o microsatélites, los cuales presentan la ventaja de ser codominantes, relativamente simples de utilizar, de bajo costo y, generalmente presentan alto grado de polimorfismo (Collard y Mackill, 2008). Los marcadores STS (Sequence Tagged Site), SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) también han sido utilizados en SAM (Sharp *et al.*, 2001). Sin embargo, ha habido un creciente desarrollo de nuevas tecnologías y marcadores, apuntando a reducir el costo e incrementar la eficiencia. Entre ellos se incluyen los SNP (Single Nucleotide Polymorphism), los SFP (Single Feature Polymorphisms), los DArT (Diversity Array Technology) y los RAD (Restriction Site-Associated DNA, Gupta *et al.*, 2008).

Collard y Mackill (2008) clasificaron la aplicabilidad de los marcadores en cinco áreas, aunque puede haber superposición en estas categorías:

1) Selección asistida para evaluación de material de mejoramiento: a través de la SAM el mejorador puede seleccionar para uno o varios rasgos de interés, cuando antes no era posible hacerlo mediante la selección fenotípica convencional, ya sea debido a la baja heredabilidad, por ser un rasgo difícil de calificar, o por la presencia de un gen que enmascara a otros genes (Walker *et al.*, 2002). En segundo lugar, la SAM facilita el seguimiento y la fijación de una serie de componentes genéticos individuales, que al asociarse, definen la expresión general del rasgo (Farokhzadeh y Alifakheri, 2014). Esto se aplica en el caso de muchos rasgos cuantitativos, donde cada componente genético puede hacer una contribución relativamente pequeña a la determinación general del fenotipo. Además, el uso de SAM permite la selección de genes recesivos sin necesidad de validación en cada generación a través de una prueba de progenie. Esto es de particular importancia en los programas de retrocruzamiento, donde el objetivo es corregir un genotipo establecido (el padre recurrente) para una única debilidad (por ejemplo, la susceptibilidad a la enfermedad) mediante la retención de la cantidad mínima de material genético del parental donante. Finalmente, los marcadores pueden ayudar en la elección de los padres en los programas de mejoramiento. En algunas situaciones, esto puede dirigirse a maximizar la diversidad, lo que es deseable para la explotación de la heterosis, en otras situaciones, el objetivo puede ser minimizarla, a fin de preservar complejos genéticos adaptados presentes en el germoplasma élite.

2) Retrocruzamiento asistido por marcadores: el retrocruzamiento es el método más comúnmente utilizado para incorporar uno o varios genes en una variedad adaptada o élite. En la mayoría de los casos, el padre utilizado para retrocruzamiento tiene un gran número de atributos deseables, pero es deficiente en alguna característica en particular (Collard y Mackill, 2008). El uso de marcadores en retrocruzamiento aumenta la eficiencia de selección. Los marcadores se pueden usar para la detección del gen o QTL de interés, siendo esto particularmente útil para rasgos que tienen fenotipos difíciles de medir. También se pueden utilizar para seleccionar rasgos de

etapa reproductiva en etapa de plántula, permitiendo una selección temprana del carácter de interés. Otra de las utilidades consiste en seleccionar la progenie con el gen objetivo y los eventos de recombinación entre el locus objetivo y los marcadores flanqueantes, nos referimos a esto como "selección recombinante". El propósito de la selección recombinante es reducir el tamaño del segmento del cromosoma donante. Los genes que afectan negativamente el rendimiento del cultivo pueden estar ligados al gen objetivo del padre donante, denominado "linkage drag" (Hospital, 2005). Mediante el uso de marcadores que flanquean un gen objetivo, por ejemplo, situados a menos de 5 cM en cada lado, el "linkage drag" puede ser minimizado. Por último, usando marcadores que no estén ligados al locus objetivo pero que estén distribuidos en todos los demás cromosomas, se puede seleccionar contra el genoma del donante, lo que acelerará la recuperación del genoma del padre adaptado.

El método de retrocruzamientos en general presenta como limitante el tiempo requerido, ya que se necesita el desarrollo de varias generaciones de crecimiento. Técnicas tales como el avance acelerado de generaciones y la descendencia de semilla única pueden contribuir a disminuir el tiempo por generación y mejorar la aplicación de esta metodología (Watson *et al.* 2018).

3) Piramidación de genes asistida por marcadores: es el proceso de combinar varios genes de interés en un mismo genotipo (Collard y Mackill, 2008). Puede ser posible a través de la selección fenotípica convencional, pero por lo general no es fácil identificar las combinaciones de genes deseados. Las plantas deben ser evaluadas para todos los rasgos de interés, por lo tanto, puede ser muy difícil de evaluar en ciertos tipos de poblaciones (por ejemplo, F2) o para características que requieran ensayos destructivos. Con la SAM, la selección de las plantas de interés puede ser realizada solamente utilizando una muestra de ADN, sin necesidad de fenotipar. La aplicación más extendida para la piramidación ha sido para combinar genes de resistencia a múltiples enfermedades con el objetivo de desarrollar resistencia duradera (Shanti *et al.* 2001, Singh *et al.* 2001).

4) Selección en generaciones tempranas (Ribaut y Betrán, 1999): aunque los marcadores se pueden utilizar en cualquier etapa durante un programa de mejoramiento, representan una gran ventaja en las primeras generaciones, porque las plantas con combinaciones de genes indeseables pueden ser eliminadas. De esta forma, permite a los mejoradores centrar la atención en un número menor de líneas de alta prioridad.

5) SAM combinada: hay varios casos en que la detección fenotípica convencional se puede combinar estratégicamente con la SAM. La "SAM combinada" (Moreau *et al.*, 2004) podría ser adoptada, por ejemplo, para identificar determinados genes o QTL que controlen un rasgo que permanecerá sin fenotipar, o cuando se necesita manipular un gran número de QTL. Estudios de simulación indican que este enfoque es más eficiente que el exclusivamente fenotípico, especialmente si se utiliza cuando hay gran tamaño de población y en rasgos de baja heredabilidad (Hospital y Charcosset, 1997).

## **1.5. RESISTENCIA GENÉTICA**

La resistencia genética es la capacidad de la planta para reducir el crecimiento y desarrollo del patógeno luego del contacto con la planta o durante el desarrollo del patógeno en la planta (Niks *et al.*, 1993). A lo largo del tiempo se han identificado diferentes cualidades de la resistencia genética, lo que permitió caracterizar dos grandes tipos de resistencia, que se denominaron resistencia vertical y resistencia horizontal (Vanderplank, 1968). La resistencia vertical es de tipo cualitativo (la planta esta enferma o sana), regulada de forma mono u oligogénica y asociada a una alta especificidad de las razas del patógeno. Los genes asociados a este tipo de resistencia se denominan genes mayores y en general se expresan desde el estado de plántula. La resistencia horizontal es de tipo cuantitativo (la planta presenta diferentes niveles de enfermedad), regulada de forma poligénica o multigenica y asociada generalmente a una baja especificidad de las razas del patógeno. Los genes asociados a esta resistencia se denominan genes menores. Estos dos tipos de resistencia reciben actualmente otros nombres, dependiendo de la característica particular a la cual se quiera hacer referencia

(Lannou, 2012), como por ejemplo resistencia completa vs. resistencia parcial, resistencia de plántula vs. resistencia planta adulta, resistencia cualitativa vs. resistencia cuantitativa.

### **1.5.1. Resistencia genética a FE**

La resistencia a FE es de carácter cuantitativo y de tipo horizontal, al menos para las especies más prevalentes como *F. graminearum* y *F. culmorum* (Mesterházy *et al.*, 1999, van Eeuwijk *et al.*, 1995).

#### **1.5.1.1. Tipos y mecanismos de resistencia a FE**

Los dos principales mecanismos de resistencia genética a FE fueron clasificados por Schroeder y Christensen (1963) como resistencia a la infección inicial (Tipo I) y resistencia a la propagación de los síntomas y el patógeno a través de la espiga (tipo II). Un tercer tipo de resistencia asociada a la acumulación de micotoxinas en el grano fue descrito por Miller y Arnison (1986). Posteriormente Mesterházy (2002) extendió la clasificación a siete tipos de resistencia que pueden variar de forma independiente entre los genotipos:

- I. Resistencia a la infección inicial
- II. Resistencia a la diseminación de síntomas y del patógeno en la espiga
- III. Resistencia a la infección del grano
- IV. Tolerancia
- V. Resistencia a la acumulación de toxinas
- VI. Resistencia a la infección tardía
- VII. Resistencia a la muerte de espiguillas por encima del sitio de infección

La mayoría de los programas de mejoramiento genético de trigo (PMGT) utilizan la determinación de resistencia Tipo II para caracterizar su germoplasma. Sin embargo, debido a la preocupación de seguridad alimentaria asociadas con la toxina DON, ha

habido un creciente interés en caracteres de resistencia expresados en granos (McMullen *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se han encontrado características morfológicas y de desarrollo que actúan como mecanismos de escape de la planta frente al patógeno (Rudd *et al.*, 2001). Entre ellos, se ha encontrado que genotipos sin aristas y de espiga laxa son más resistentes que genotipos con aristas y espiga compacta (Kollers *et al.*, 2013). Lo mismo sucede con genotipos que ubican su fecha de floración fuera del período de condiciones ambientales favorables para el patógeno. La extrusión de anteras ha sido propuesta como otro carácter morfológico que influencia la resistencia genética a FE, en particular afectando la resistencia tipo I (Lu *et al.* 2012, Skinnes *et al.* 2010, Graham y Browne, 2009). Se han mapeado QTL para la resistencia tipo I que han estado asociados también con la extrusión de anteras en la misma región cromosómica (por ejemplo Qfhs.ifa-5A actúa controlando ambos caracteres).

Los genes de enanismo utilizados para incrementar la productividad han estado relacionados a la resistencia a FE en diversos estudios (Buerstmayr *et al.* 2000). Por largo tiempo se tuvo la hipótesis de que las plantas de menor estatura tienen mayor exposición a los patógenos presentes en el suelo (Miedaner y Voss, 2008), debido a la mayor movilidad de las esporas desde los restos de cultivo infectado hacia las hojas y la espiga. Tres genes mayores asociados a enanismo, provenientes de dos variedades japonesas (*Rht-B1b* sinónimo *Rht1* y *Rht-D1b* sinónimo *Rht2* derivados de Norin 10 y *Rht8* derivado de Akakomugi) han sido utilizados en más de la mitad de los cultivares de trigo del mundo (Gale *et al.* 1985). Srinivasachary *et al.* (2008) observaron que el nivel de resistencia correlacionó negativamente con la presencia de *Rht-D1b*, resultando en plantas con un menor nivel de resistencia tipo I a FE. Sin embargo, Voss *et al.* (2008) demostraron que existen excepciones de líneas portadoras del alelo *Rht-D1b* que pueden presentar altos niveles de resistencia a FE. Hilton *et al.* (1999) concluyeron que el efecto de *Rht-B1b* y *Rht-D1b* sobre la FE es altamente dependiente del background genético y las condiciones ambientales. Miedaner y Voss (2008) observaron que el gen *Rht8* al igual que *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, incrementó la infección de FE en el cultivar de resistencia moderada Mercia.

### 1.5.1.2. Fuentes de resistencia a FE

Asiáticas: algunas regiones del continente asiático han estado sometidas regularmente a epidemias de FE (Bai y Shaner, 1994). En estos lugares se han logrado altos niveles de resistencia y los materiales generados han sido distribuidos hacia otras regiones y utilizados en diversos PMGT. Estas fuentes de resistencia han sido la base de los primeros proyectos para determinar la base genética de la resistencia a FE (Buerstmayr *et al.*, 2009).

La variedad china de trigo primaveral Sumai 3 (portadora del gen de resistencia *Fhb1*), originada a partir del cruzamiento entre el trigo italiano Funo y la variedad Taiwan Xiaomai, ha sido la principal fuente de resistencia de tipo II utilizada en los PMGT alrededor del mundo (Buerstmayr *et al.*, 2009). Se han reportado otros cultivares con relativamente alto nivel de resistencia a FE, por ejemplo, los cultivares chinos Ning 7840 y Ning 894037, ambos derivados de Sumai 3 pero con mayores niveles de adaptación (Shen *et al.* 2003, Zhou *et al.* 2003); Wuhan, que posee alto nivel de resistencia y del cual se desconoce su pedigree exacto (Somers *et al.*, 2003); Wangshuibai, que posee nivel de resistencia alto y estable y es considerado no relacionado con Sumai 3 (Liu y Anderson, 2003); los cultivares japoneses Nyu Bai (portador de *Fhb1*) y Nobeoka Bozu; y el cultivar coreano Chokwang (Yang *et al.*, 2005). A pesar de que Nobeoka Bozu y Chokwang son parte del mismo grupo genealógico asiático, parecen no estar emparentadas con Sumai 3, por lo tanto, presentan un alto potencial para el mejoramiento como fuentes de resistencias alternativas y/o complementarias.

Europeas: antiguos cultivares de trigo invernal, como por ejemplo Kooperatorka, Praag 8 y Bizel, poseen relativamente alto nivel de resistencia a FE y pueden servir como fuentes para el mejoramiento (Badea *et al.* 2008, Snijders 1990a). Sin embargo, debido al bajo valor agronómico, no han sido extensamente utilizados hasta el momento (Kosová *et al.*, 2009). Actualmente, existen fuentes de resistencia moderada que tienen buena adaptación a las condiciones prevalentes en Europa, por ejemplo, el cultivar Suizo Arina (Paillard *et al.*, 2004), los cultivares alemanes Cansas, Petrus y



Dream (Klahr *et al.* 2007, Schmolke *et al.* 2005), los cultivares franceses Renan (Gervais *et al.*, 2003) y Apache (Holzapfel *et al.*, 2008), el cultivar holandés Romanus (Badea *et al.*, 2008) y el cultivar Rumano Fundulea F201R (Shen *et al.* 2003, Ittu *et al.* 2002).

Americanas: las principales fuentes de resistencia Sudamericanas a FE son los trigos primaverales brasileños Frontana y Encruzilhada (Steiner *et al.*, 2004). Los estudios iniciales del cultivar Frontana fueron realizados por Schroeder y Christensen (1963) y desde entonces se ha propuesto que su resistencia es el resultado de diferentes componentes. El componente principal se asocia a la inhibición de la infección inicial del hongo (resistencia tipo I, van Ginkel *et al.* 1996, Singh *et al.* 1995), pero también se ha observado un efecto sobre la dispersión sobre la espiga (resistencia tipo II) y sobre su habilidad para degradar y tolerar altos niveles de DON.

El cultivar Alsen, liberado por la Universidad de North Dakota en el año 2000, tiene como uno de sus ancestros a Sumai 3 y es utilizado ampliamente en el mejoramiento a FE debido a que combina buen nivel de resistencia, alto rendimiento en grano y excelente calidad panadera (Frohberg *et al.*, 2006).

Otras especies: una posible fuente de resistencia para trigos hexaploides y tetraploides es su parental salvaje *T. turgidum ssp. dicoccoides*. Otto *et al.* (2002) identificaron un QTL de resistencia en esta especie que podría diferir de los anteriormente identificados en trigos hexaploides. Existen otras especies exóticas que tienen potencial como donantes de genes de resistencia a FE, por ejemplo se han encontrado QTL novedosos en *Lophopyrum ponticum* (Shen y Ohm, 2006), *Leymus racemosus* (Qi *et al.*, 2008), *Roegneria kamoji* y *Roegneria ciliaris* (Chen y Liu, 2000).

### **1.5.1.3. QTL de resistencia a FE reportados**

Numerosos estudios han demostrado que la herencia de la resistencia a FE es de carácter cuantitativo, por lo tanto el método más preciso para estudiarla es mediante el análisis de QTL (Buerstmayr *et al.*, 2009). Se han identificado más de 100 QTL de resistencia a FE, la mayoría de ellos pertenecen al genoma B y en segundo lugar al

genoma A. Haciendo énfasis en los más estables y de mayor efecto, Buerstmayr *et al.* (2009) resumió 22 regiones presentes en 16 cromosomas reportadas hasta el momento. A continuación, se describen las principales. Región 1D con QTL de resistencia moderada reportado en dos trigos invernales europeos y uno primaveral. Región 2A con QTL de alta resistencia derivado del parental susceptible Stoa. Región 2B: casi toda la longitud de este cromosoma está cubierta por intervalos de QTL, presentes en fuentes chinas, europeas, norteamericanas y trigos duros. Región 2D con QTL de efecto consistente exclusivamente en materiales de origen chino. Región 3A con QTL cercano al marcador *Xgwm2* en *T. dicoccoides*, mostrando una clara asociación con menor incidencia. Región 3BS con QTL *Fhb1* identificado en el cultivar chino “Sumai 3”. Es el QTL validado de mayor efecto y está asociado a los marcadores *Xbarc133*, *Xgwm493*, *Xgwm533* y *UMN10*. Región 3D con QTL de efecto moderado encontrado en la región asociada al marcador *Xgwm341*, presente en el cultivar susceptible de trigo invernal estadounidense Patterson y en el cultivar invernal moderadamente resistente europeo Cansas. Región 4B con QTL asociado a disminución en incidencia de FE en los cultivares asiáticos Wuhan y Wangshuibai y en los cultivares estadounidenses Ernie y Stoa. Región 4D con QTL ligado al gen de enanismo *Rht-D1*. Región 5A con *Qfhs.ifa-5A*, importante QTL asociado a resistencia tipo I en materiales de origen asiático, sudamericano, norteamericano y europeo. Región 5B con QTL en diferentes partes de este cromosoma. Posiblemente los trigos europeos invernales Cansas y Forno comparten un QTL común en esta región. Región 6B con *Fhb2*, identificado en el cultivar chino “Sumai 3” y otras fuentes de resistencia del mismo origen, confiriendo resistencia tipo II. Región 7A con QTL asociado al marcador *Xgwm276* en distintas variedades de origen chino. Región 7B con QTL proveniente de líneas de origen chino y trigo invernal norteamericano.

Qi *et al.* (2008) reportaron un QTL denominado *Fhb3* que confiere resistencia tipo II a FE en el cromosoma 7Lr#1 de la especie exótica *Leymus racemosus*, el cual fue introgresado hacia el cromosoma 7AS de *Triticum aestivum*. Sin embargo, el QTL podría estar ligado a caracteres no deseados (Xue *et al.*, 2010).

Xue *et al.* (2011) identificaron dos QTL en los cromosomas 4B y 5A en el cultivar chino Wangshiubai, designados *Fhb4* y *Fhb5*, respectivamente. Ambos QTL confieren resistencia tipo I a FE. *Fhb4* fue acotado a un rango de 1.7cM entre los marcadores *Xhbg226* y *Xgwm149*, mientras que *Fhb5* fue acotado a un rango de 0.3cM entre los marcadores flanqueantes del locus *Xgwm304* y *Xgwm41*.

Cainong *et al.* (2015) encontraron un QTL de resistencia tipo II a FE en la especie perenne *Elymus tsukushiensis* denominado *Fhb6* que fue transferido exitosamente a la región homeóloga del cromosoma 1A de trigo. *Fhb6* parece ser un nuevo locus de resistencia ya que es el primer QTL que mapea en este cromosoma.

Kim *et al.* (1993) designaron *Fhblop* a un QTL de resistencia tipo II ubicado en el cromosoma 7D, el cual fue transferido a trigo desde la especie *Thinopyrum ponticum*, pero aún no ha sido utilizado en PMGT debido a que está fuertemente ligado a caracteres no deseados. En estudios recientes realizados por Guo *et al.* (2015) fue renombrado como *Fhb7* y acotado a un intervalo cromosómico menor, de alrededor de 1.7 cM, flanqueado por los marcadores moleculares SSR *XsdauK66* y *Xcfa2240*. Estos avances han reducido los problemas derivados de la introducción de *Fhb7* y mejorado su utilidad para los PMGT.

#### **1.5.1.4. *Fhb1***

La mayoría de los estudios de resistencia a FE han sido realizados sobre el cultivar de origen chino “Sumai 3” y sus derivados (Liu *et al.*, 2008). Waldron *et al.* (1999) detectaron el QTL *Qfhs.ndsu-3BS* en el cromosoma 3BS, el cual posteriormente fue denominado *Fhb1* por Liu *et al.* (2006). Este QTL fue validado utilizando los marcadores moleculares SSR *Xgwm493* y *Xgwm533* flanqueantes, y explicó 41.6 % y 24.8 % de la variación fenotípica de la resistencia tipo II en dos poblaciones de mapeo (Anderson *et al.*, 2001). Su efecto también ha sido confirmado en otras poblaciones por diferentes investigadores (Pumphrey *et al.* 2007, Buerstmayr *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2002). *Fhb1* es el QTL de resistencia a FE de trigo de efecto mayor y más consistente descubierto hasta la fecha (Bernardo *et al.*, 2012).

Liu *et al.* (2008) ajustaron el QTL a una región de 261 kb con siete genes candidatos y adicionalmente desarrollaron el marcador diagnóstico *UMN10*. Bernardo *et al.* (2012) caracterizaron la región *Fhb1* utilizando varios marcadores en un panel de germoplasma de trigo. Mediante análisis de los haplotipos observados en esta región, estos autores identificaron que los genotipos de trigo se agruparon en cuatro grupos principales: : (1) EE.UU.-Clark, (2) Asia, (3) EE.UU.-Ernie, y (4) Chinese Spring. El grupo (2) fue conformado por cultivares chinos y japoneses portadores de *Fhb1*, y pueden ser diferenciados de otros grupos por el marcador *Xsnp3BS*. Todas las accesiones relacionadas con Sumai 3 formaron un subgrupo dentro de los asiáticos asociados al marcador *Xsnp3Bs-8*.

Ya sea a través del uso de marcadores moleculares o de selección fenotípica, *Fhb1* ha sido utilizado en numerosos PMGT alrededor del mundo (Miedaner *et al.* 2006, Yang *et al.* 2003, Anderson *et al.* 2001). Sin embargo, su introducción ha estado asociada a la presencia de caracteres indeseables, como por ejemplo mayor nivel de susceptibilidad a RT (Zhang *et al.*, 2016). Esto en parte se debe a que *Sr2*, el gen de resistencia de planta adulta a RT más ampliamente utilizado, se encuentra ligado en fase de repulsión a *Fhb1* (figura 2), a una distancia aproximada de 3 cM. Recientemente Zhang *et al.* (2016) desarrollaron líneas de trigo recombinantes que

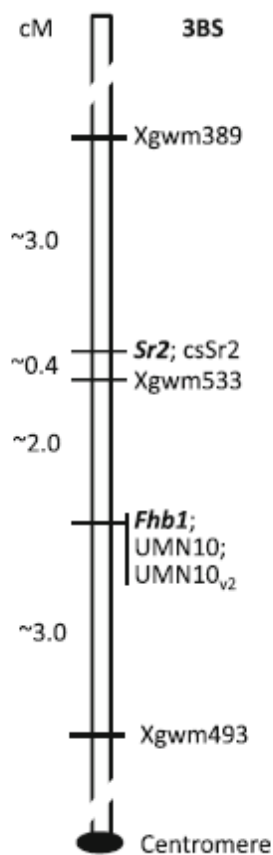


Figura no. 2: Mapa genético de *Fhb1* y *Sr2* en el cromosoma 3BS. Los marcadores *csSr2* y *Xgwm 533* están vinculados con *Sr2*, y *Xgwm 493* y *UMN10* con *Fhb1* (Zhang *et al.* 2016).

contienen ambos genes en fase de acoplamiento. Este material facilitará la transferencia de *Fhb1-Sr2* y contribuirá con la obtención de resistencia a FE y RT conjuntamente.

Tanto el mecanismo de acción de la resistencia proporcionada por *Fhb1* como el o los genes involucrados no están completamente demostrados. Según Jansen *et al.* (2005) la resistencia tipo II conferida por *Fhb1* puede estar asociada con la habilidad para transformar el DON en la forma no tóxica DON-3-O-glucoside. *F. graminearum* requiere el DON para esparcirse por las espiguillas y el raquis luego de la infección inicial (Jansen *et al.* 2005, Lemmens *et al.* 2005). Gunnaiah *et al.* (2012) determinaron una mayor acumulación de phenylpropanoides asociada con la presencia de *Fhb1*, que podría conducir a un efecto de mayor resistencia. Xiao *et al.* (2013) sugieren

que la resistencia podría ser explicada por cambios en la concentración de ácido jasmónico. Analizando el haplotipo de *Fhb1* para un par de líneas cercanamente isogénicas (NILs, por su sigla en inglés) resistentes y susceptibles, Schweiger *et al.* (2016) observaron que el gen GDSL lipasa podría ser el responsable de la resistencia, debido a que estuvo presente únicamente en la NIL resistente. Por otro lado, Rawat *et al.* (2016) concluyeron que el gen PFT (pore-forming toxin-like) es el responsable de conferir la resistencia a FE. Este gen codifica una lectina quimérica con dos dominios de aglutinina y un dominio de ETX/MTX2, y su expresión fue máxima en preemergencia de la espiga. Para confirmar su efecto demostraron que plantas

transgénicas con el gen PFT, poseían resistencia o mostraban desarrollo más lento de la enfermedad. También observaron que hubo variabilidad en la resistencia de las plantas transgénicas, la cual podría ser explicada por la expresión del transgen, o la posibilidad de que se requiera algún gen complementario a PFT para que la expresión de la resistencia sea completa. La detoxificación del DON fue independiente del gen PFT, pero estuvo localizada cerca de su bloque génico, por lo tanto en la mayoría de los casos estos componentes genéticos se estarían heredando conjuntamente. Estudios realizados por He *et al.* (2018) encontraron que PFT no solo estuvo presente en accesiones resistentes, sino que también fue encontrado en algunas accesiones susceptibles, sugiriendo que la resistencia conferida por *Fhb1* es parcialmente condicionada por PFT. Su *et al.* (2018) identificaron que la resistencia de *Fhb1* está asociada a una delección de 752 pb en el gen *TaHRC*, siendo este gen (a diferencia de *GDSL* y *PFT*) el único encontrado exclusivamente en accesiones del sur de China. Posteriormente Su *et al.* (2019) demostraron que *TaHRC* codifica una proteína que confiere susceptibilidad a FE y que la delección presente en líneas resistentes abarca el codon start resultando en el aumento de resistencia a FE.

#### **1.5.1.5. Efecto de la acumulación de QTL de resistencia**

En general, los PMGT han seguido dos vías para mejorar la resistencia a FE: la incorporación del QTL asociado a resistencia *Fhb1* conjuntamente, o no a la utilización de resistencia proveniente de germoplasma local adaptado (McMullen *et al.*, 2012). Pumphrey *et al.* (2007) estimaron que *Fhb1* confirió una reducción promedio de 23 % de la severidad de FE y de 27 % de granos dañados en trigos primaverales, lo que indica que aunque *Fhb1* es el QTL principal, por si solo no confiere resistencia suficiente. Por este motivo, varios trabajos se han orientado en combinar *Fhb1* con otros QTL validados en estudios previos o con resistencias provenientes de fuentes locales. Burlakoti *et al.* (2010) observaron que líneas que combinan QTL para los tipos I y II de resistencia tienen mayor resistencia a la FE que líneas que solo presentan QTL de resistencia tipo II.

Miedaner *et al.* (2006) demostraron que la combinación de los QTL *Fhb1* en 3BS, *Qfhs-ifa5.A* en 5A (provenientes de CM-82036) y el QTL en el cromosoma 3A proveniente de Frontana fue altamente efectiva para mejorar la resistencia en germoplasma adaptado alemán. Para los genotipos que presentaron los QTL en los cromosomas 3BS y 5A, se reportaron reducciones en severidad y en el contenido de DON de 55 y 78 %, en comparación con genotipos que carecían de ambos QTL. La combinación de *Fhb1* y *Qfhs-ifa5.A* contribuyó en mayor medida a la resistencia a FE que las combinaciones con el QTL en 3A de Frontana. El mayor nivel de resistencia fue logrado en las líneas que incluían los tres QTL simultáneamente.

La introducción de *Fhb1* y *Qfhs-ifa5.A* en el trigo primaveral Sueco Swedget y en el trigo invernal Checo Sylvie redujo significativamente la severidad de FE y el contenido de DON en el grano (Chrpová *et al.*, 2011). Para el cultivar Swedget la severidad de FE disminuyó 51.8 % y el contenido de DON 63.4 %, mientras que para el cultivar invernal Sylvie la severidad disminuyó 31.9 % y el contenido de DON 35.9 %. Cuando se estudiaron los QTL en forma separada, *Fhb1* fue el único que presentó efecto significativo en la disminución de los síntomas. Miedaner *et al.* (2011) reportaron que la introducción de estos mismos QTL en germoplasma de trigo primaveral e invernal europeo redujo los síntomas de la enfermedad en 36 % y 28-37 % respectivamente.

Shi *et al.* (2008) demostraron que la línea WSY, seleccionada de la triple cruza Sumai 3/Wangshuibai/Nobeoka Bozu, presentó mayor resistencia a FE que sus parentales. El haplotipo de WSY reveló que poseía los marcadores de los alelos asociados a resistencia en los cromosomas 1BL, 2BL, 5AS y 7AL de Sumai 3; 2AS, 2DS, 3AS y 6BS de Wangshuibai y 3BS de Nobeoka Bozu.

McCartney *et al.* (2007) evaluaron el efecto de los QTL de resistencia de Nyu Bai, Sumai 3 y Wuhan 1 sobre los caracteres asociados a la resistencia a FE y altura de planta. El QTL en el cromosoma 4B de Wuhan fue el más efectivo para controlar la FE, pero estuvo asociado a incremento significativo en la altura de la planta. Los QTL en el cromosoma 2D (Wuhan 1), 3BS y 5AS (Nyu Bai), 3BS y 5AS (Sumai 3)

también mejoraron la resistencia, aunque notablemente en esta serie experimental los QTL en el cromosoma 3BS de Sumai 3 y Nyu Bai fueron los menos efectivos. La resistencia a FE tuvo una tendencia a aumentar con mayor cantidad de QTL introducidos en un mismo genotipo.

Eckard *et al.* (2015) observaron que la acumulación de los QTL ubicados en los cromosomas 2A, 2B, 7B (provenientes de los cruzamientos entre Wheaton, Sapporo Haru Komungi Jugo y MULT 757) y 3B (*Fhb1*), explicaron entre el 18 y 21 % de la varianza para severidad en diferentes evaluaciones.

Como fue mencionado anteriormente, la fecha de floración y la altura de planta son características morfológicas que influyen en la severidad de la enfermedad, sin embargo, solo algunas de las evaluaciones incluyen un análisis de estos caracteres (Buerstmayr *et al.*, 2009). Gran parte de los QTL para resistencia reportados están asociados a estas características, por ejemplo, los QTL asociados a resistencia encontrados en los cromosomas 2D y 4D posiblemente estén solapados con la altura de planta, y podrían estar vinculados por ligamiento o efectos pleiotrópicos con los genes *Rht8* y *Rht-D1* que han sido mapeados en los mismos cromosomas. *Rht8* también ha sido asociado al gen *PpdD1* de insensibilidad al fotoperiodo.

### **1.5.2. Mejoramiento por resistencia a FE y fuentes de resistencia utilizadas en el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo de INIA**

Las primeras epidemias de FE registradas en la región datan de principios del siglo XX (Kohli y Díaz de Ackerman, 2013). Desde entonces, la ocurrencia de la enfermedad ha sido de frecuencia irregular, pero ha estado asociada a pérdidas severas en la producción. En la década de 1920s comenzaron a utilizarse como fuentes de resistencia las poblaciones criollas Barletta (o su selección Lin Calel MA) y Americano 44D (Klein Universal II). A partir de ellas se desarrollaron variedades comerciales que fueron utilizadas en la región. Posteriormente se utilizaron las fuentes de resistencia Ardito (derivada de la línea japonesa Akagomoughi), chino (probablemente Chinese Spring), Bagé y Marquis que fueron la base para el desarrollo de variedades comerciales hasta los 1960s. Las epidemias ocurridas en 1960, 1963 y 1967 ayudaron



a identificar el próximo conjunto de variedades superiores, como las variedades argentinas Klein Atlas, Vilela Sol, Oncativo INTA, Pergamino Gaboto y Tezanos Pintos Precoz, que demostraron un moderado a alto nivel de resistencia a campo. La variedad Pergamino Gaboto mostró únicamente resistencia tipo I, mientras el resto mostró resistencia tipo I y tipo II (De Galich, 1997).

La primera gran epidemia registrada en el Uruguay (1977) permitió caracterizar el comportamiento del germoplasma utilizado en el PMGT y eliminar el material más susceptible (Germán *et al.*, 2018). Más adelante, la distribución de nuevas fuentes de resistencia japonesas (Nobeoka Bozu, Nyu Bai, Abura) y chinas (Pekin 8) a los programas regionales, impulsó los esfuerzos por explorar su resistencia a pesar de sus malas características agronómicas, bajo potencial productivo y susceptibilidad a otras enfermedades (Sartori, 1982). En el PMGT de INIA-Uruguay, se utilizaron también fuentes de resistencia brasileras, como Toropi, Encruzilhada, Pel 73007 y Pel 73081.

Desde 1980 se han utilizado líneas distribuidas por CIMMYT, de buen potencial productivo y buena resistencia a múltiples enfermedades (Kohli y Díaz, 2013). En 1984 fue introducido por primera vez en la región el cultivar chino Sumai 3, el cual presentó problemas de adaptación al ambiente local. En Uruguay la resistencia basada en Sumai 3 fue introducida y seleccionada a partir de su línea derivada, Nanjing7840, la cual demostró mejor adaptación a las condiciones de nuestro país. En 1990 se evaluó y se identificó buen nivel de resistencia en varias líneas avanzadas introducidas, como Guam92//Pheasant//Bobwhite (6SRSN 22), NG8675/Catbird (7SRSN 05), Milan/Shanghai #7 (7SRSN 07), NG8201//Kauz (7SRSN 26) y Zuo 1330. La línea de CIMMYT Catbird (Chuan Mai #18//Bagula), que proviene de una fuente de resistencia diferente a Sumai 3, presentó excelente tipo agronómico y alto potencial de rendimiento. Su línea derivada, Catbird 1073, fue seleccionada como fuente de resistencia luego de varios años de evaluación.

Para incorporar variabilidad en materiales regionales adaptados, una de las estrategias utilizadas por INIA fue el desarrollo de un programa de pre-mejoramiento (Kohli y Díaz, 2013), el cual amplió el uso de fuentes de resistencia como Sumai 3

(China), Nobeoka Bozu (Japon), Catbird (Méjico), Frontana (Brasil) y Alsen (USA), intentando combinar la resistencia de distintos orígenes. Como producto se obtuvieron muchas líneas avanzadas F6 con alto nivel de resistencia, pero muy pocas de ellas presentaron buen potencial de rendimiento. A principios del 2000 el PMGT de INIA recibió poblaciones desarrolladas por otros países. Estas poblaciones fueron: CM82036/Remus desde Austria, Milan/Catbird desde Inglaterra, Mayoor//TKSN1081/Ae.squarrosa(222)/3/Flycather, Nobeoka Bozu/Sumai 3, Sumai 3/Gamenya, Fukuhokomugi/Oligoculm 380 y Frontana/INIA desde Méjico, así como Sagvari-N.Bozu/MM-Sumai 3 desde Hungría.

Actualmente, los materiales en etapas avanzadas de selección y las fuentes de resistencia, se caracterizan anualmente en viveros específicos inoculados artificialmente. Se determinan la incidencia y la severidad de FE, y en materiales seleccionados, se evalúan el porcentaje de granos con FE luego de cosecha, el contenido de DON y el nivel de resistencia tipo II en condiciones controladas (Germán *et al.*, 2018). Es relevante mencionar que la procedencia de la resistencia de los cultivares registrados proviene de ORL99192, la cual difiere en origen de *Fhb1*. Como resultado de este trabajo, en los últimos años se han liberado cultivares con buenos niveles de resistencia a FE. Adicionalmente, se están introduciendo técnicas moleculares para validar marcadores para los genes de resistencia ya caracterizados, así como para identificar posibles nuevos loci de resistencia presentes en el germoplasma del PMGT de INIA.

### **1.5.3. Resistencia genética a RT**

La resistencia genética a RT es diversa y puede estar regulada tanto por genes mayores como por genes menores.

#### **1.5.3.1. Genes mayores**

La resistencia a la RT se ha basado tradicionalmente en resistencia de tipo “gen por gen” (Flor, 1956). De los más de 60 diferentes genes de resistencia (*Sr*) catalogados (McIntosh *et al.*, 2017), casi todos son genes mayores raza-específicos (genes R) que

se expresan tanto en plántula como en planta adulta. Este tipo de resistencia está basada en un único producto del gen de resistencia, que al reconocer una molécula efectora producida por el patógeno, desencadena la respuesta inmunitaria de la planta (Jones y Dangl, 2006).

Una gran proporción del germoplasma altamente resistente de Sudamérica posee los genes *Sr31* y *Sr24* (Germán *et al.*, 2007). El gen *Sr31*, fue transferido a trigo a partir de la traslocación 1BL.1RS desde la especie *Secale cereale* (Zeller 1973, Schlegel y Korzun 1997). En el fragmento traslocado también se encuentran ligados los genes de resistencia a roya de la hoja *Lr26*, roya amarilla *Yr9* y oídio *Pm8*. *Sr31* ha sido el mayor componente de la resistencia a RT a nivel mundial (Jin y Singh, 2006). El gen *Sr24*, proveniente de *Thinopyrum elongatum*, se encuentra en la translocación en el cromosoma 3DL, donde también está presente el gen de resistencia a la roya de la hoja *Lr24* (McIntosh *et al.*, 1995). Sin embargo, como se comentó anteriormente en la sección 1.3.1, algunas de las razas del grupo Ug99 han demostrado virulencia sobre los genes *Sr31* y *Sr24*

En nuestra región los genes *Sr22*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr39*, y *Sr40* son efectivos frente a las razas de *P. graminis* f. sp. *tritici* presentes (Germán *et al.*, 2007). A pesar de que varios de los genes de resistencia descritos en la bibliografía confieren una alta resistencia a la raza Ug99 y su linaje, solo *Sr22*, *Sr26*, *Sr35* y *Sr50* son efectivos frente a todas las razas de importancia actual (Singh, 2012).

La resistencia proporcionada por genes mayores ha tenido éxito durante décadas en proteger al cultivo de la RT. Sin embargo, estos genes tienen efectividad transitoria cuando se utilizan individualmente debido a que, pueden surgir nuevas razas virulentas del patógeno mediante mutaciones, que presenten efectores no reconocidos por el gen R (Dawkins y Krebs, 1979). En condiciones naturales, esta rápida evolución de los patógenos se contrarresta, en especies de plantas hospederas, mediante la producción de genes R capaces de reconocer los nuevos efectores. Con el objetivo de aumentar la durabilidad de la resistencia conferida por estos genes y de ampliar la cobertura a razas del patógeno con diferente virulencia, los mejoradores buscan desarrollar cultivares

que combinen múltiples genes R (Ayliffe *et al.*, 2008), preferentemente efectivos frente a todas las razas del patógeno presentes en la región epidemiológica donde se utilizan. Para superar la resistencia conferida por varios genes, el patógeno debe acumular mutaciones sobre todos los genes R presentes en el genotipo, lo que disminuye drásticamente la probabilidad de que se generen razas virulentas sobre los mismos.

### 1.5.3.2. Genes menores y QTL

Otra clase de genes de resistencia a RT son los genes de resistencia que confieren resistencia parcial (genes RP Parlevliet, 1975) o de enroscamiento lento (Singh, 2012). A diferencia de los genes R, los genes RP presentan una reducción cuantitativa en los niveles de la enfermedad. Cuando los genes RP son utilizados de forma individual, están asociados a incrementos bajos o moderados de la resistencia, pero cuando se combinan varios de ellos, pueden conferir niveles de resistencia cercanos a la inmunidad (Singh *et al.*, 2005). Los genes RP tienen ventajas con respecto a los genes R (Ayliffe *et al.*, 2008), porque su resistencia es generalmente de amplio espectro (raza-no específica), es decir, son efectivos frente a todos los aislamientos del patógeno y no solo frente aquellos que contienen un efector específico, lo que resulta en una resistencia potencialmente duradera.

Cinco genes RP han sido identificados y catalogados. Debido a su pequeño efecto individual, resulta más difícil detectarlos y cartografiarlos individualmente en comparación a los genes R. Los genes designados hasta el momento comprenden: *Sr2/Yr30/Lr27/Pbc1* (Mago *et al.*, 2011), *Sr55/Lr67/Yr46/Pm46/Ltn3* (Herrera-Foessel *et al.*, 2014), *Sr56* (Bansal *et al.*, 2014) *Sr57/Lr34/Yr18/Pm38/Sb1/Ltn1* (Singh, 2012), y *Sr58/Lr46/Yr29/Pm39/Ltn2* (Singh *et al.*, 2013); que también confieren resistencia a otras enfermedades, como roya de la hoja (*P. triticina*, genes *Lr*), roya estriada (*P. striiformis*, genes *Yr*) y oidio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, genes *Pm*).

Análisis de QTL realizados por Kolmer *et al.* (2011), detectaron un QTL para resistencia de planta adulta a RT en el cromosoma 2BL, en una población de líneas

recombinantes endocriadas (RILs por su sugla en inglés) derivada de la cruce entre la línea susceptible RL6058 con la línea Thatcher con *Lr34*. El QTL en 2BL estuvo vinculado al marcador DArt wPt5044 y no estuvo asociada con ningún gen de resistencia previamente mapeado en Thatcher. Las líneas con *Lr34* y wPt5044 mostraron niveles de severidad de RT significativamente inferiores que líneas que solo presentaban *Lr34*.

Njau *et al.* (2013) realizaron análisis de QTL en una población de RILs derivada de Avocet S/Pavon 76. En este trabajo identificaron cinco QTL efectivos contra la raza Ug99. Tres de ellos provinieron de Pavon 76, mientras que los restantes provinieron de Avocet. QSr.cim-3B explicó 32 % de la variación fenotípica, los otros QTL de Pavon 76 explicaron el 24 % y 20 %. Los dos QTL provenientes de Avocet S explicaron el 8 % y el 6 % de la variación fenotípica.

En un análisis de QTL para una población de RILs derivada de RB07/MN06113-8, Bajgain *et al.* (2015) detectaron cuatro QTL provenientes de MN06113-8 y cinco provenientes de RB07. El QTL QSr.umn-2B.2 fue detectado en diferentes ambientes y explicó el siguiente porcentaje de la resistencia a RT: 31.4 % en Kenia 2012, 27.1 % en Kenia 13, 46.9 % en Etiopía 13, y 8.7 % en Saint Paul (MN, EE. UU.) 2013. Este QTL, derivado de MN06113-8 tuvo el mayor efecto en todos los ambientes excepto en MN, donde el QTL QSr.umn-4B.2 tuvo el mayor efecto con un 12.3 % de reducción de la enfermedad. Los demás QTL explicaron entre 5-13 % de la variación de la resistencia, pero fueron significativos solo en uno de los cuatro ambientes.

Actualmente, numerosos PMGT se están enfocando en desarrollar cultivares que contengan un alto nivel de resistencia conferido por tres vías: i) combinaciones de genes de resistencia mayores, i) varios genes RP juntos, o ii) combinaciones de algunos genes RP con algunos genes R efectivos frente a la población actual de RT (Ayliffe *et al.*, 2008). Se considera que este enfoque de piramidación hace que sea más difícil para el patógeno superar estas resistencias múltiples. El éxito de utilizar múltiples genes de resistencia en el desarrollo de cultivares depende de que los PMGT adopten esta estrategia uniformemente, ya que la utilización de genes R en forma individual por

algunos PMGT puede causar que el patógeno supere las resistencias piramidadas con mayor facilidad.

### **1.5.3.3. *Sr2***

El gen RP a RT más utilizado es *Sr2*. *Sr2* está localizado en el brazo corto del cromosoma 3B y fue transferido a trigo hexaploide desde la especie tetraploide *Triticum dicoccum* (emmer) en la década de 1920 (McFadden, 1930). La combinación de *Sr2* con otros genes de RP, es comúnmente conocida como el complejo *Sr2* (Singh *et al.*, 2008). Se cree que este complejo ha conferido niveles de resistencia efectivos y durables frente a RT en diversos cultivares de EE.UU., Australia y trigos primaverales de CIMMYT, entre otros (Ellis *et al.*, 2007).

*Sr2* es efectivo frente a todas las razas conocidas de RT, incluyendo la raza Ug99. Sin embargo, cuando está presente aisladamente proporciona una protección insuficiente, como fue demostrado en estudios realizados en Kenia bajo una alta presión de la enfermedad (Singh *et al.*, 2005). El mejoramiento tradicional utilizando *Sr2* ha sido difícil debido a su naturaleza recesiva y a que su fenotipo puede ser identificado únicamente en ensayos a campo. Durante años se han utilizado marcadores morfológicos como el “pseudo black chaff” (PBC - pigmentación oscura en las glumas, el pedúnculo y los entrenudos inferiores del tallo) y el “black internode” (BIN). Pero los niveles de expresión de estos marcadores morfológicos varían según el ambiente y el contexto genético (Singh *et al.* 2008, Kota *et al.* 2006, Sheen *et al.* 1968). En los últimos años se han desarrollado marcadores moleculares estrechamente ligados al gen que pueden ser utilizados para su selección, como los marcadores *Xgwm533* (Spielmeier *et al.*, 2003) y *csSr2* (Mago *et al.*, 2011).

### **1.5.4. Mejoramiento por resistencia a RT en el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo de INIA**

El mejoramiento por resistencia a RT fue uno de los principales objetivos del PMGT durante décadas. Sin embargo, la ocurrencia de largos periodos con ausencia de la enfermedad, disminuyó las oportunidades de selección por resistencia a la RT.

Como consecuencia, se registraron aumentos del área sembrada con cultivares susceptibles (cultivares INIA y de otros criaderos), y una disminución del área sembrada con cultivares resistentes. A su vez, un número considerable de líneas avanzadas y cultivares precomerciales tuvieron bajos niveles de resistencia frente a la enfermedad (Campos *et al.* 2015, Germán *et al.* 2007). Para contrarrestar esta situación, una de las acciones tomadas en el proceso de mejoramiento por resistencia a enfermedades de INIA, fue la caracterización de materiales en una colección específica para RT, sembrada tardíamente para favorecer el desarrollo de la enfermedad e inoculada artificialmente con aislamientos locales del patógeno (Germán *et al.* 2011, Germán y Verges 2007).

A partir del 2005 se han probado cultivares y líneas avanzadas en Kenia, para evaluar el comportamiento de los materiales locales a las nuevas razas del patógeno que no están presentes en nuestro continente (Ug99 y sus razas derivadas), y que eventualmente podrían migrar a nuestra región. Esta información es posteriormente utilizada para realizar cruza específicas. Las fuentes de resistencia seleccionadas en base a su baja infección en Uruguay y Kenia son utilizadas en los cruzamientos para desarrollar nuevas líneas resistentes. Proviene del PMGT de trigo de INIA y de colecciones distribuidas anualmente por el CIMMYT cuyas accesiones poseen mayoritariamente RP a las nuevas razas identificadas en el Este de África (Germán *et al.* 2011).

Recientemente se presentó a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) el proyecto “Roya de tallo: estrategias de manejo para prevenir su resurgimiento como problema relevante para la producción de trigo”, en el cual se identificarán QTL de resistencia en dos materiales resistentes a RT en Uruguay y Kenia (INIA Tero y Br23//CEP19/PF85490/3/). Además, utilizando SAM, se obtendrán materiales adaptados con combinaciones de genes mayores efectivos a las poblaciones locales y en Kenia (*Sr26*, *Sr32*, *Sr39*, Germán *et al.*, 2018). Los genes utilizados para este trabajo fueron obtenidos y cedidos por el Dr. Dundas (University of Adelaide, Australia), quien redujo el tamaño de las traslocaciones de especies afines en las que se encuentran los genes, reduciendo las características deletéreas asociadas

(Dundas *et al.*, 2007). Estas líneas serán también utilizadas como fuentes de resistencia a RT en el PMGT de INIA.

Estas estrategias han permitido desarrollar mejoramiento anticipatorio, adelantándose al escenario de incremento en importancia de la enfermedad debido a la posible migración de las razas presentes en África.

## **1.6. OBJETIVO GENERAL**

Contribuir al incremento, calidad y sustentabilidad de la producción de trigo nacional mediante aportes a la resistencia genética a FE y RT.

## **1.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Introducir *Fhb1/Sr2* en base a retrocruzas en cuatro cultivares elite INIA de distinto nivel de resistencia a FE y nivel intermedio de resistencia a RT, que no poseen estos genes.
- 2) Cuantificar el efecto de *Fhb1/Sr2* en reducir la infección de FE y RT

## **1.8. HIPÓTESIS**

- 1) La introducción de *Fhb1/Sr2* en base a retrocruzas y utilizando selección asistida por marcadores, es realizable.
- 2) La introducción de *Fhb1* en cultivares de INIA-Uruguay determina una reducción en los niveles de FE.
- 3) La introducción de *Sr2* en cultivares de INIA-Uruguay determina una reducción en los niveles de RT.
- 4) El aumento en los niveles de resistencia a FE y RT conferidos por *Fhb1* y *Sr2* no es afectado por el fondo genético de los cultivares recurrentes.



## **2. INTROGRESSION OF THE COUPLED *Fhb1-Sr2* FOR RESISTANCE TO FUSARIUM HEAD BLIGHT AND STEM RUST INTO URUGUAYAN ELITE WHEAT CULTIVARS<sup>1</sup>**

### **2.1. SUMMARY**

Fusarium head blight (FHB) and Stem rust (SR) threaten the sustainability of wheat production worldwide. *Fhb1* confers a significant level of FHB resistance but is poorly represented in the INIA-Uruguay wheat-breeding program. *Sr2* is a widely used gene conferring durable partial resistance to SR. *Fhb1* and *Sr2* are linked in repulsion (~3 cM apart) on chromosome 3B. However, lines with *Fhb1* and *Sr2* in coupling were recently developed at the University of Minnesota, USA. In order to incorporate *Fhb1-Sr2* into Uruguayan elite wheat cultivars the donor line was crossed and backcrossed three times with four cultivars lacking both genes and expressing an intermediate to low level of resistance to FHB and SR: Génesis 2375, Génesis 6.87, INIA Madrugador and INIA Don Alberto. Genotypes carrying *Fhb1-Sr2* were selected using the molecular markers *UMN10* for *Fhb1* during backcrossing and *UMN10* and *SNP-3BS-8* for *Fhb1*, and *Sr2-ger9* for *Sr2* in BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, allowing the selection of 81 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> lines homozygous for the markers from 29 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> families. The effect of *Fhb1-Sr2* on the response to FHB and SR in the different genetic backgrounds were quantified in a greenhouse experiment by comparing disease severities of homozygous BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> lines with and without the *Fhb1* and *Sr2* markers. The effect of *Fhb1* and the population derived from the different recurrent parents were significant, but the effect of their interaction on the reduction of N\_AUDPC was not significant. Lines with *Fhb1* had an increase in Type II resistance to FHB as indicated by a reduction of 18.4 % of the average N\_AUDPC (13.4 to 22.7 %). A SR field test indicated a decrease of 54.5 and 76.5 % of the coefficient of infection in lines with *Sr2* in Sr26/Génesis 2375\*4 and Sf26/Génesis 6.87\*4 populations, respectively. The introduction of *Fhb1-Sr2* will contribute in reducing the risk of FHB and SR in wheat crops in Uruguay.

*Keywords:* *Triticum aestivum*, Fusarium Head Blight, Stem Rust, Resistance, *Fhb1-Sr2*.

---

<sup>1</sup> El presente artículo será presentado en la revista Crop Science

## 2.2. INTRODUCTION

Fusarium head blight (FHB), mainly caused by the fungus *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorph: *Gibberella zeae* Schw. (Petch)], is a serious threat to wheat production worldwide (Bushnell *et al.*, 2003). FHB can reduce yield and affect grain quality due to contamination with mycotoxins as deoxynivalenol (DON). After severe epidemics, the harvested grains may not be marketable due to toxin limits imposed for commercialization. FHB represent great challenges for its control requiring the adoption of disease management that integrates appropriate cultural practices, chemical control and mainly the use of cultivars with acceptable levels of genetic resistance.

The genetic resistance to FHB is associated with the presence of quantitative trait loci (QTL, Buerstmayr *et al* 2009, QTL Mesterházy *et al.* 1999, van Eeuwijk *et al.* 1995). More than 100 QTL for resistance to FHB have been identified. Buerstmayr *et al.* (2009) summarized 22 regions present in 16 chromosomes containing QTL with high stability and effect on FHB resistance. The most important source of FHB resistance worldwide is the Chinese cultivar Sumai 3. Many studies of the resistance of Sumai 3 and its derivatives have been published (Brar *et al.* 2019, Niwa *et al.* 2014, Liu *et al.* 2008, Anderson *et al.* 2001). The most important QTL in Sumai 3, *Fhb1* (Liu *et al.*, 2006), is located on chromosome 3BS and confers a high level of FHB Type II resistance. Simple sequence repeat (SSR) markers linked with *Fhb1* accounted for 41.6 and 24.8 % of the variation in FHB resistance in two mapping populations (Anderson *et al.*, 2001). Subsequently, other researchers confirmed the effect of *Fhb1* in other populations (Pumphrey *et al.* 2007, Buerstmayr *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2002). Bernardo *et al.* (2012) and Liu *et al.* (2008) developed the diagnostic molecular markers SNP3BS-8 and UMN10 respectively, which can be useful for marker-assisted selection (MAS).

Stem rust (SR), caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Pgt), was historically considered the most destructive disease of wheat (Singh *et al.*, 1995). SR was successfully controlled in most of the wheat cropping regions for over 30 years using

resistant cultivars (Singh *et al.*, 2008), but since 1998, new virulent races of the pathogen were detected in eastern Africa (Ug99 race group, Wanyera *et al.* 2006, Pretorius *et al.* 2000). The Ug99 and derived races are virulent to most of the known *Sr* resistance genes. The annual stem rust tests conducted in Kenya and Ethiopia from 2005 to 2014 indicated that about 90 % of the current wheat varieties worldwide exhibited partial to complete susceptibility to these races (Singh *et al.*, 2015). Therefore, the possible migration of Ug99 and/or derived races to other regions poses a major threat to wheat production worldwide.

More than 60 genes conferring SR resistance have been cataloged (McIntosh *et al.*, 2017), most of which confer qualitative resistance (major genes). SR major genes have been extensively used in wheat breeding programs (WBP), however, the resistance has most frequently been effective for short periods of time due to the adaptation of the pathogen through mutations from avirulence to virulence (Dawkins and Krebs, 1979). Five minor genes of resistance to SR have been cataloged: *Sr2/Yr30/Lr27/Pbc1* (Mago *et al.*, 2011), *Sr55/Lr67/Yr46/Pm46/Ltn3* (Herrera-Foessel *et al.*, 2014), *Sr56* (Bansal *et al.*, 2014) *Sr57/Lr34/Yr18/Pm38/Sb1* (Singh, 2012), and *Sr58/Lr46/Yr29/ Pm39* (Singh *et al.*, 2013). These genes are race non-specific, express at the adult plant stage and confer or are tightly linked to genes that confer resistance to other diseases such as leaf rust (*Lr* genes), yellow rust (*Yr* genes) and powdery mildew (*Pm* genes). *Sr2*, located on chromosome 3BS, has been the most widely used among these genes, mostly in combination with major genes or other minor genes since when *Sr2* is present alone it provides insufficient protection (Singh *et al.* 2006). The molecular markers csSr2 (Mago *et al.*, 2011) and Wms533 (Röder *et al.*, 1998) can be used for MAS of *Sr2*.

The introduction of *Fhb1* and *Sr2* in adapted germplasm has been a high priority in WBPs of North America, Europe, Australia and in the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT, He *et al.* 2015, Ellis *et al.* 2007, Miedaner *et al.* 2006, Yang *et al.* 2003, Anderson *et al.* 2001). However, these genes were linked in repulsion phase, approximately 3 cM apart (Anderson *et al.*, 2001), in the studied

wheat accessions. Recently, Zhang *et al.* (2016) have overcome this restriction by developing lines that contain both genes in coupling phase.

Both FHB and SR are important diseases in Uruguay and the neighboring countries and represent serious threats for wheat production. The FHB epidemics increased their frequency of occurrence in Uruguay in the last decades (Germán *et al.*, 2018). The wheat area planted to susceptible cultivars to SR has increased considerably in the region after year 2000 and probably contributed to a generalized epidemic of SR in Argentina and Uruguay, in 2014 (Campos *et al.*, 2015). *Fhb1* is present in a very low frequency of the INIA-WBP germplasm, while *Sr2* has been introduced mainly by the use of CIMMYT germplasm, which carried *Fhb1* and *Sr2* in repulsion phase.

The present study had two main objectives: (1) to introduce *Fhb1* and *Sr2* in coupling phase in wheat elite germplasm from Uruguay and (2) to quantify the effect of *Fhb1* and *Sr2* in enhancing the resistance to FHB and SR in the developed lines. For this, a donor line with coupled *Fhb1-Sr2* was crossed and backcrossed with four INIA elite wheat cultivars lacking both genes and expressing different levels of resistance to FHB and SR. For each cross, wheat lines carrying *Fhb1* and *Sr2* in coupling were selected using appropriate molecular markers. The effect of *Fhb1* on the level of resistance to FHB in the different genetic backgrounds was quantified in a greenhouse experiment by comparing disease severities of lines with and without *Fhb1-Sr2*. A field test was conducted to estimate the effect of *Sr2* on the resistance to SR.

## **2.3. MATERIALS AND METHODS**

### **2.3.1. Plant materials and development of populations**

Sf26, the donor line of the coupled *Fhb1-Sr2* was developed by the University of Minnesota WBP (cross: CO03W269/Bigg Red, Zhang *et al.*, 2016) and kindly provided by Dr. Jim Anderson. Sf26 was crossed and backcrossed with four Uruguayan elite wheat cultivars, lacking molecular markers UMN10 for *Fhb1* and

csSr2 for Sr2 (Silva, pers. comm.): Génesis 2375 (LE2302/3/PF90099/OR1//GRANITO), Génesis 6.87 (PF90099/OR1//GRANITO/3/BAG10), INIA Madrugador (E.FED//CHUANMAI/BAU) and INIA Don Alberto (I.TIJ/LE2229). The Uruguayan elite wheat cultivars have different levels of resistance to FHB and SR (Table 1, extracted from Castro *et al.*, 2019; 2015).

Table 1: Resistance level to FHB and SR assigned for the four INIA elite wheat cultivars, according to the Uruguayan National Cultivar Evaluation (INIA/INASE).

	FHB type II*	FHB**	SR**
LE 2375 (Génesis 2375)	MS	MR	MR-MS
LE 2387 (Génesis 6.87)	MR-MS	MR	MS
LE 2332 (INIA Madrugador)	MS	MR-MS	MR-MS
LE 2331 (INIA Don Alberto)	SMS	S	MS-MR

R: resistant; MR: moderately resistant; MS: moderately susceptible; S: susceptible. \* Characterization of Type II resistance under greenhouse conditions (Pereyra, pers. comm.). \*\*Characterization of field resistance (Castro *et al.*, 2015)

Sf26 and the four INIA elite cultivars were planted and crossed in the field in 2016 at INIA La Estanzuela (LE: latitude 34.3° S, longitude 57.7° W, elevation 70masl). Generations F<sub>1</sub> to BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> were grown at INIA La Estanzuela greenhouse facilities, with temperature between 20 °C and 30 °C and light supplemented with 400W high sodium pressure lamps between 5:00 P.M. and 5:00 A.M. Plants were grown in pots filled with 1kg of a mixture of 1/3 of soil, 1/3 substrate (organic compost, VITATERRA) and 1/3 vermiculite (expanded vermiculite, Agrinobre). The water-soluble fertilizer Milagro (18:18:18 N-P-K plus microelements) was applied once a week, at a rate of 0,2 g/pot, from 15 days after planting until anthesis. The BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> generation was grown in a growth chamber at 22 °C temperature, 75-85 % relative humidity and 470W LED lightning (GCLB-8 2nd Generation, Grow Candy) in an 18/6 hours light/darkness cycle, to obtain accelerated plant development.

Sf26 was used as the female parent in the initial crosses (Figure 1). Twenty F<sub>1</sub> plants per population, each population derived from one of the four different crosses,

were used as the female parent in the backcross with each INIA elite cultivar parent to obtain the BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> generation. Subsequently, heterozygous *Fhb1-Sr2/fhb1-sr2* plants were selected with marker UMN10 from 40 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> and BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> plants per population, which were used as the female parents in the following crosses. Similarly, heterozygous BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> plants were selected among 40 plants for selfing. In order to obtain homozygous *Fhb1-Sr2* lines (R lines) and homozygous *fhb1-sr2* lines (S lines), 12 plants from each of eight BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> families were sown per population and the selected BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> were selfed for seed increase. Five pairs of R and S lines per population were selected for FHB phenotyping. For SR phenotyping R and S lines were selected based on seed availability.

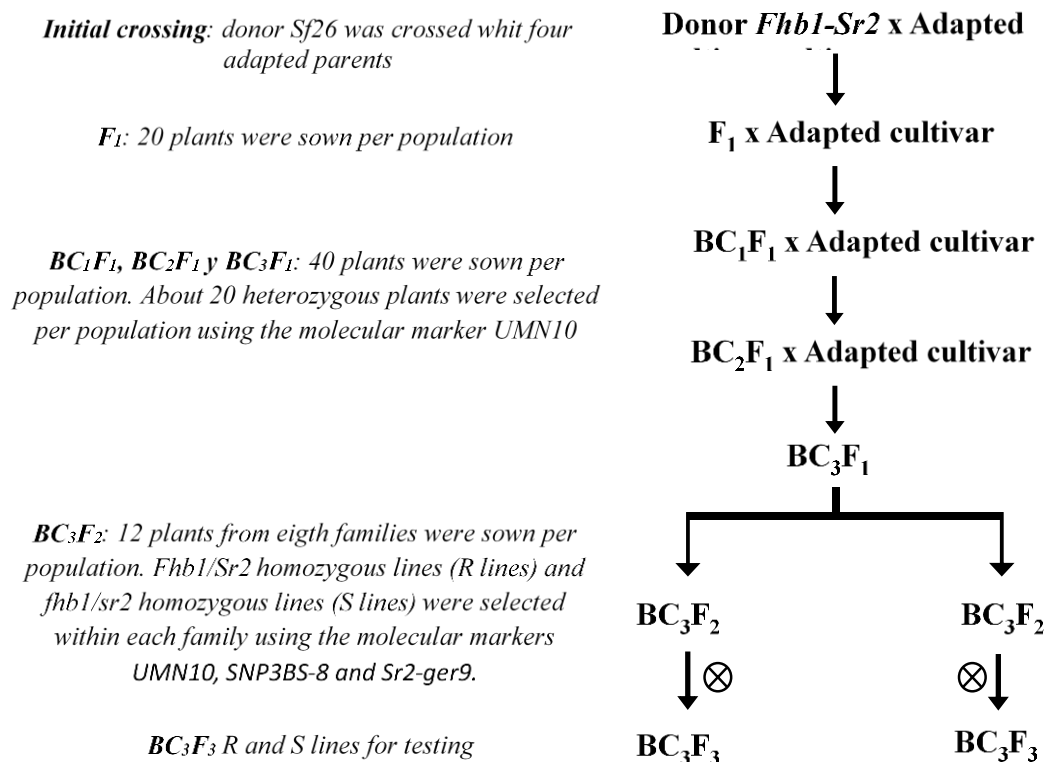


Figure 1: Backcrossing strategy used for the introduction of *Fhb1-Sr2* genes in four INIA elite cultivars (Génesis 2375, Génesis 6.87, INIA Madrugador and INIA Don Alberto), and development of R and S lines. ⊗: Selfing.

### **2.3.2. Marker-assisted selection**

The presence of *Fhb1-Sr2* was determined using the closely diagnostic molecular SSR marker UMN10, developed for *Fhb1* (Liu *et al.*, 2008). DNA extractions from the plant material were performed at INIA La Estanzuela Molecular Breeding Laboratory facilities using the CTAB 2 % method (Doyle, 1987). PCR was carried out with a volume of 10  $\mu$ L per reaction, consisting of 3.0  $\mu$ L of DNA (30 ng/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L of 10 X PCR buffer, 0.6  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1  $\mu$ L of dNTPs (2.0 mM), 0.1  $\mu$ L of primer F (10  $\mu$ M), 0.1  $\mu$ L of primer R (10  $\mu$ M), 0.05  $\mu$ L of Taq enzyme (5U) and 4.15  $\mu$ L of PCR water. The amplification protocol of the UMN10 marker was performed as indicated by Liu and Anderson (2003). The detection of the UMN10 marker on the DNA samples was performed with the 3730xl 96-Capillary Genetic Analyzer, service provided by the Yale University Applied Biosystems. The positive control of the *Fhb1* allele was the cultivar Sumai 3 and the donor line Sf26. As described in Liu *et al.* (2008), *Fhb1* allele had a band size of 240 bp, while the susceptibility allele *fhb1* had a band size of 237 bp.

The presence of *Fhb1* and *Sr2* at the end of the backcrossing program was confirmed with the Kompetitive Allele Specific PCR Genotyping System (KASP™) of the UMN10 and SNP3BS-8 markers for *Fhb1* (Bernardo *et al.*, 2012) and the *Sr2*-ger9 marker for *Sr2* (Mago *et al.*, 2011) at CIMMYT laboratory facilities at El Batán. Polymorphic marker primer sequences, type of marker and annealing temperatures used, are listed in Table 2. The PCR protocol and the visualization of the genotypic data for KASP were performed as indicated in Dreisigacker *et al.* (2016).

Table 2: Characteristics of the molecular markers used to detect the presence/absence of *Fhb1-Sr2*.

Marker	Primer	Sequence	T <sub>A</sub> (°C)	Reference
UMN10 <sup>1</sup>	FAM	GAATTACTCATTTTTAGATTTGTCTACATACA	50	Liu <i>et al.</i> , 2008
	VIC	GAATTACTCATTTTTAGATTTGTCTACATACG		
	Common	GAAGTTCATGCCACGCATATGCTAGTA		
SNP3BS-8 <sup>1</sup>	FAM	CACATGCATTTGCAAGGTTGTTATCC	54	Bernardo <i>et al.</i> , 2012
	VIC	CACATGCATTTGCAAGGTTGTTATCG		
	Common	CAAAGCAGCCTTAGGTCAATAGTTTGAAA		
Sr2-ger9 <sup>1</sup>	FAM	GTGCGAGACATCCAACACTCAC	63-55 <sup>3</sup>	Mago <i>et al.</i> , 2011
	VIC	GTGCGAGACATCCAACACTCAT		
	Common	CTCAAATGGTCGAGCACAAGCTCTA		
UMN10 <sup>2</sup>	Forward	CGTGGTTCACGTCTTCTTA	60	Liu <i>et al.</i> , 2008
	Reverse	TGAAGTTCATGCCACGCATA		

T<sub>A</sub>: Anneal temperature; <sup>1</sup>KASP marker; <sup>2</sup>SSR marker; <sup>3</sup>Touchdown over 63-55 °C for 60 seconds 10 cycles (Dropping 0.8 °C per cycle).

### **2.3.3. Evaluation of Fusarium Head Blight and Stem Rust resistance**

FHB Type II resistance was determined at INIA La Estanzuela under greenhouse and growth chamber facilities between October 2018 and February 2019. Plants were grown in a greenhouse until anthesis under the growing conditions described before. Two experiments were carried out at two planting times (October 24th and November 20th) with a complete nested block design with 10 replications were used. Each plot consisted of one pot with two plants. For each population, treatments included: five BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> homozygous *Fhb1-Sr2* lines (R lines), five BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> homozygous *fhb1-sr2* lines (S lines), each pair of lines derived from the same BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> family, and checks (Sumai 3, Sf26 and the INIA elite parent), adding a total of 46 treatments. Eight hundred seventy plants were tested in total.

Plants were inoculated at anthesis (Z6.5, Zadoks *et al.*, 1974) with a mix of 14 monosporic isolates collected from different cultivars, locations and years, and



representing of the *Fusarium graminearum (sensu stricto)* population present in Uruguay. The inoculum had a concentration of  $2 \times 10^5$  conidia/ml and 0.025 ml of Tween 20 was added per 1 ml of the solution. Ten  $\mu$ l of the inoculum solution was placed into the two central spikelets of the main spike of each plant with an Eppendorf pipette. Plants were left at room temperature for one hour and then placed in a dew chamber for 72 hours (20-22 °C, 100 % relative humidity). Later on, plants were transferred to a growth chamber (24 °C, 75-85 % relative humidity and 12 hours of photoperiod).

FHB Type II resistance was determined as the percentage of infected spikelets in the inoculated spikes at 7, 14 and 21 days post-inoculation. The area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated according to Campbell and Madden (1990) as:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

where,  $n$ : total number of observations,  $y_i$ : severity of observation  $i$ th,  $t_i$ : time for observation  $i$ th.

Due to low seed availability, an unreplicated field test was used to estimate the effect of *Sr2* on SR resistance. The assessment was carried out during 2019 at La Estanzuela (LE: latitude 34.3° S, longitude 57.7° W, elevation 70 masl). Five BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> R lines and five BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> S lines were selected according to seed availability from different BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> families of each population. Checks (Sf26 and the adapted parents) were planted on November 8<sup>th</sup> (off season) in single 1m rows. A spreader row of SR susceptible cultivars (Onix, Baguette 11, Baguette 13 and Baguette 601) was planted perpendicular to the plots. Irrigation, fertilization and weed control were performed as required. The trial was artificially inoculated three times injecting a suspension of uredinospores on distilled water with a few drops of Tween 20 into three tillers per plot at Z4.0 to Z4.9 stages (Zadoks *et al.*, 1974) and on the spreader row.

Inoculum collected in the field during winter 2018 and four Pgt isolates representing four different races of SR collected in previous years were used for inoculation: isolates 2048, 2372, 2749 and 2931 corresponding to races SPLKC, RHKTF, RRTTF, and QFCSC respectively (Jin *et al.*, 2008). The Pgt races were increased on the susceptible cultivar Little Club under greenhouse conditions and maintained at the Rust laboratory at INIA.

SR disease severity (DS) and infection response (IR) were recorded on stems and leaf sheaths at approximately Z8.5 growth stage. DS was evaluated in a 0 to 100 scale, according to the modified Cobb Scale (Peterson *et al.*, 1948) and IR was assessed as resistant (R), moderately resistant (MR), moderately susceptible (MS) and susceptible (S) as described in Roelfs *et al.* (1992). The coefficient of infection (CI) was calculated as the DS multiplied by a coefficient corresponding to the IR (R: 0.2, MR: 0.4, I = MRMS: 0.6, MS: 0.8, S: 1.0) as described in Stubbs *et al.* (1986).

#### **2.3.4. Statistical analysis**

Box-Cox transformation was used to correct for normal distribution of the residuals of AUDPC (N\_AUDPC) before the statistical analysis (Box and Cox, 1964).

FHB N\_AUDPC data were analyzed with the model:

$$Y_{ijklm} = \mu + M_i + F_{j(k)} + P_k + T_l + MP_{ik} + MT_{il} + R_{m(l)} + \varepsilon_{ijklm}$$

where, Y: FHB N\_AUDPC,  $\mu$  = general mean, M: *Fhb1* marker main effect  $i=\{1:\text{presence-2:absence}\}$ , F: family main effect  $j=\{1-5\}$  nested in P  $k=\{1-4\}$ , P: population main effect  $k=\{1-4\}$ , T: Trial main effect  $l=\{1-2\}$ , MP: *Fhb1* marker by population interaction, MT: *Fhb1* marker by trial interaction, R: repetition  $m=\{1-10\}$  nested in T  $l=\{1-2\}$  and  $\varepsilon$ : experimental error with normal distribution  $N(0, \sigma^2\varepsilon)$ .

To estimate the effect of *Fhb1*, only R and S lines were considered. To compare the populations, the factor interaction MP was removed from the model. The significance threshold level was set as  $\alpha \leq 0.05$ . Statistical analysis was performed using R statistical software with the stat package (R Development Core Team, 2016).

## 2.4. RESULTS

### 2.4.1. Development of *Fhb1-Sr2* lines

Sixty nine BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> heterozygous families were obtained in total, 18, 19, 16 and 16 for the populations derived from Génesis 2375, Génesis 2387, INIA Madrugador and INIA Don Alberto, respectively. After selfing, plants homozygous for *Fhb1-Sr2* and *fhb1-sr2* from twenty nine BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> families were selected (eight Sf26/Génesis 2375\*4 and seven for the rest of the populations). The number of lines with different *Fhb1-Sr2* genotypes obtained are shown in Table 3.

Table 3: Number of selected BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> families and number of homozygous and heterozygous plants per population.

Population	No. of families BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub>	<i>Fhb1-Fhb1</i>	<i>Fhb1-fhb1</i>	<i>fhb1-fhb1</i>
		<i>Sr2-Sr2</i>	<i>Sr2-sr2</i>	<i>sr2-sr2</i>
		No.	No.	No.
Sf26/G.2375*4	8	24	47	25
Sf26/G.2387*4	7	17	53	25
Sf26/I.Mad*4	7	17	51	28
Sf26/I.DAI*4	7	23	49	22
Total	29	81	200	100

G.2375: Génesis 2375, G.2387: Génesis 2387, I.Mad: INIA Madrugador, I.DAI: INIA Don Alberto.

For the obtention of homozygous BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> lines (*Fhb1-Sr2* and *fhb1-sr2*) the development of seven generations was required. The overall protocol took 26 months with an average duration of each generation of 3.7 months (average 3.2 generations per year).

### 2.4.2. Fusarium Head Blight Type II resistance

The most susceptible cultivar INIA Don Alberto had an average FHB severity of 26.5, 63 and 70.7 % at 7, 14, and 21 days post-inoculation (dpi), respectively. The average AUDPC was 560, with a coefficient of variation of 46.3 % and a severity of 45.1 % at 21 dpi.

Only the effect of *Fhb1* QTL and population on FHB N\_AUDPC values were highly significant (p-value<0.001) (Table 4).

Table 4. Analysis of variance of FHB N\_AUDPC.

Source of variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	P-value
QTL <i>Fhb1</i> (M)	1	51641	51641	165.5	2 e-16**
Pop (P)	9	74893	8321	26.6	2 e-16**
Trial (T)	1	286	286	0.9	0.33837 NS
Repetition/Trial (R)	18	3872	215	0.7	0.82392 NS
Family/Population (F)	16	6676	417	1.3	0.16738 NS
QTL <i>Fhb1</i> *Trial (MT)	1	184	184	0.6	0.44321 NS
QTL <i>Fhb1</i> *Pop (MP)	3	2017	672	2.2	0.09203 NS
Error	803	250581	312		

\*\*Significant at  $P < 0.001$  NS: non significant at  $P < 0.05$  probability level. Pop: population.

The average N\_AUDPC of R lines was 60.3 (35.6 % severity at 21 dpi), significantly lower than the N\_AUDPC of the S lines of 73.9 (51.1 % severity at 21 dpi, Figure 2A). *Fhb1* determined an average reduction of the FHB N\_AUDPC of 13.6 or 18.4 % for the four populations.

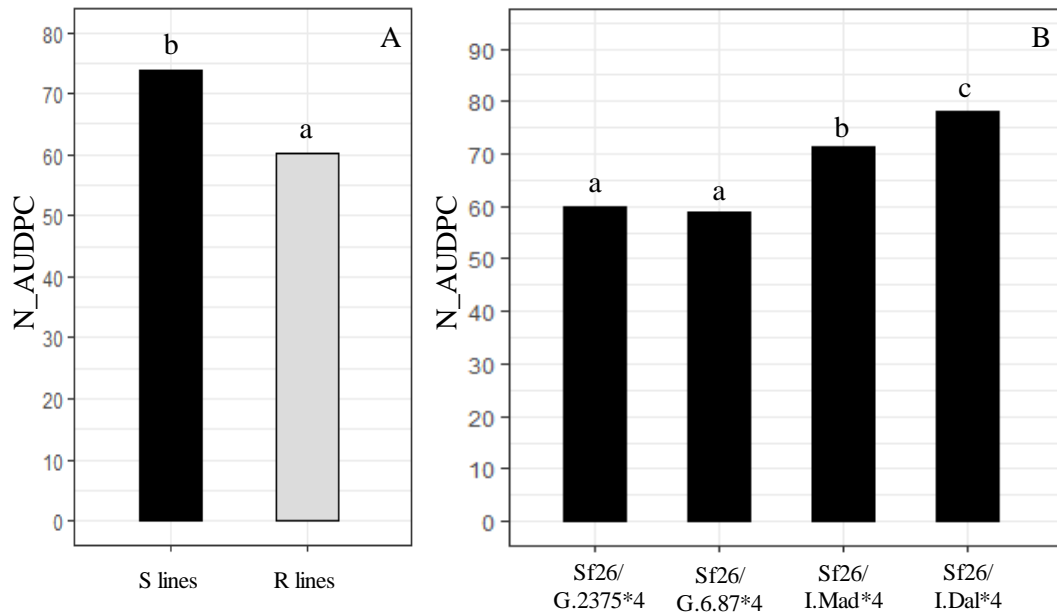


Figure 2. A: Average FHB N\_AUDPC of R (*Fhb1-Sr2*) and S lines (*fhb1-sr2*). N\_AUDPC values with same letters are not significantly different based on a Tukey test  $P\text{-value} \leq 0.01$ . B: Average FHB N\_AUDPC of R and S lines from each population. N\_AUDPC values with different letter are significantly different based on a Tukey test  $P\text{-value} \leq 0.05$ .

The FHB N\_AUDPC of lines derived from Génesis 2375 and Génesis 6.87 had significantly lower N\_AUDPC than the lines derived from INIA Madrugador and INIA Don Alberto. Lines from INIA Don Alberto had significantly higher N\_AUDPC than lines from INIA Madrugador.

Although the effect of the interaction of *Fhb1* and population was not significant on N\_AUDPC, mean values of R lines were lower as compared to the ones registered in S lines from each population (Figure 3). The adjusted means of the N\_AUDPC for each population had a reduction of N\_AUDPC of 22.7, 21.7, 17.0 and 13.4 % in Sf26/Génesis 6.87\*4, Sf26/INIA Madrugador\*4, Sf26/INIA Don Alberto\*4 and Sf26/Génesis 2375\*4 lines, respectively.

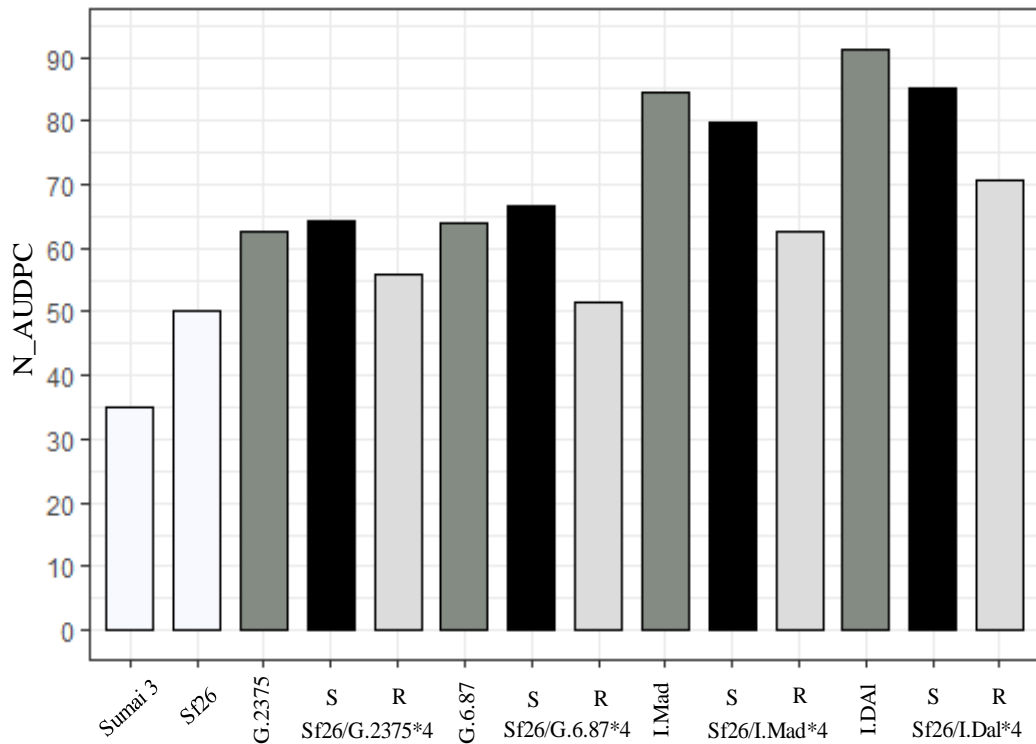


Figure 3. N\_AUDPC of the resistant check (Sumai 3), donor (Sf26), recurrent parents and R and S lines from each population. G.2375: Génesis 2375, G.6.87: Génesis 2387, I.Mad: INIA Madrugador, I.DAI: INIA Don Alberto.

### **2.4.3. Stem rust resistance**

The effect of Sr2 was estimated on lines derived from Génesis 2375 and Génesis 6.87, since only these materials had a substantial level of SR infection (Figure 4). The CI means of R and S lines from each population had a reduction of 54.5 and 76.5 % for the populations Sf26/Génesis 2375\*4 and Sf26/Génesis 6.87\*4, respectively.

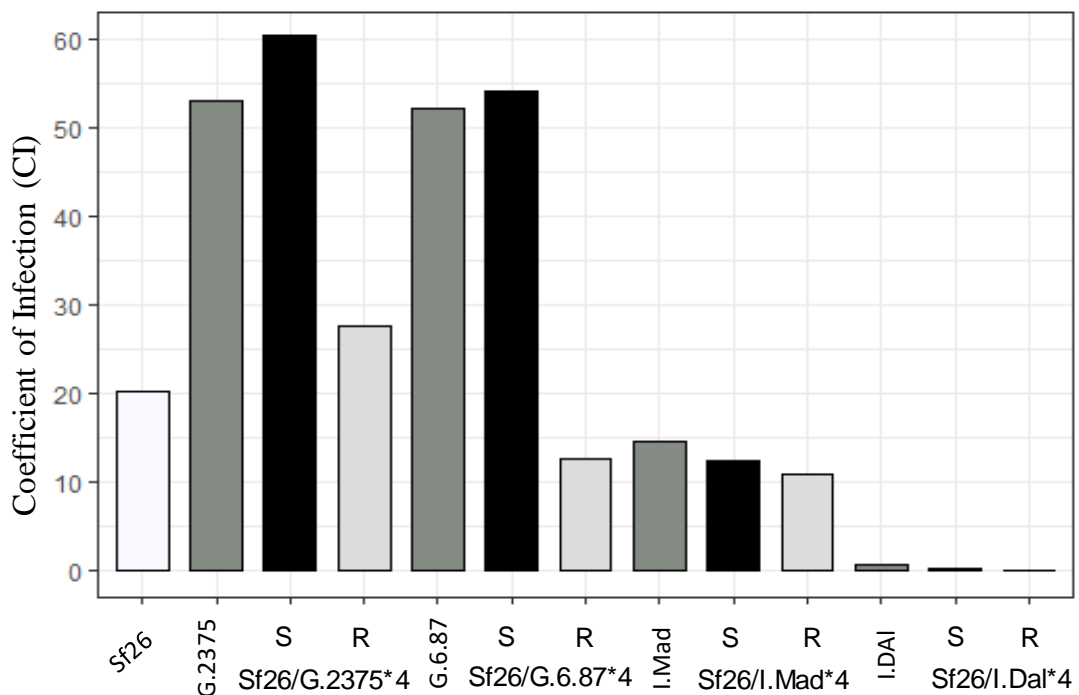


Figure 4. Stem rust coefficient of infection of the donor (Sf26) and recurrent parents and R and S lines from each population. G.2375: Génesis 2375, G.6.87: Génesis 2387, I.Mad: INIA Madrugador, I.DAI: INIA Don Alberto.

## 2.5. DISCUSSION

The genetic improvement of resistance to FHB is generally a slow process, due to the low heritability of the resistance (Verges *et al.* 2006, Snijders 1990b<sup>2</sup>). In addition, FHB does not occur every year in Uruguay, therefore opportunities for selection for resistance are relatively not frequent unless appropriate conditions are provided, such as testing in specific nurseries with artificial inoculation and sprinkler irrigation. The development of resistant cultivars is essential to reduce the risk of disease epidemics. FHB resistance has been durable, however, durable resistance to SR is more difficult to achieve. One of the strategies adopted by WBP to get durable resistance to SR has been the introduction of minor genes, either by accumulating several of them or by combining them with effective major genes (Ayliffe *et al.*, 2008).

<sup>2</sup> La diferenciación en Snijders 1990b es solo a efectos de esta tesis.

The use of MAS has an enormous impact to improve the efficiency and precision of genetic improvement, facilitating the introduction of genetic components of interest in adapted local germplasm (Collard and Mackill, 2008). In the present work, backcrossing assisted by markers allowed to select lines with the gene or QTL of interest in a short period of time, thus increasing the selection efficiency. MAS allowed also the selection of the minor gene *Sr2*, which is often more difficult to select phenotypically. It also allowed the selection of lines with *Fhb1* at the seedling stage, when under traditional schemes it must be screened in the reproductive stage.

For the four populations, a total of 81 BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> lines carrying *Fhb1-Sr2* were obtained, with an expected recovery of 93.75 % of the genetic background of the INIA elite cultivars used as recurrent parents. Using only UMN10 as a molecular marker for the selection of the heterozygous plants during the backcrossing process was enough for the selection of the heterozygous plants, provided the strong linkage between *Fhb1* and *Sr2*. Subsequently, the presence of *Sr2* was confirmed by the cs*Sr2* marker. Based on these results, we could confirm that UMN10 is a reliable marker for the selection of the coupled *Fhb1-Sr2*. The process carried out is a relevant technological contribution for the WBP in Uruguay, since it is the first MAS for resistance to FHB in Uruguay.

Results from this study indicated a strong effect of the presence of *Fhb1* and differences in FHB N\_AUDPC among R and S lines. The lines with *Fhb1* had an average reduction of the disease measured as N\_AUDPC of 18.4 % (range of 13.4 to 22.7 % in the different populations) compared to lines carrying *fhb1*. The FHB N\_AUDPC of the elite cultivars and the derived lines (Figure 2b) followed the same trend of resistance of the elite cultivars in field studies (Table 1).

The average FHB reduction attributed to *Fhb1* in this study was similar to values obtained in other studies. However, there are several reasons that make difficult the comparison of the different results obtained for the effect of *Fhb1*. Most of the publications estimated the *Fhb1* QTL effect in mapping populations, i.e. Zhang *et al.* (2012). Anderson *et al.* (2001) and Waldron *et al.* (1999) studied its effect under



greenhouse conditions, estimating a decrease of 15.7, 24.8-41.6 (two populations) and 15.4 %, respectively. The mapping populations derived in general from parents with highly variable genetic background, which might affect the *Fhb1* QTL effect. Jin *et al.* (2013) and Salameh *et al.* (2011) studied the *Fhb1* QTL effect in breeding materials under field conditions, estimating a decrease on the disease of 25.1 and 35 %, respectively. The estimation of the QTL effect can also be influenced by the environment in which the measurements are made (e.g., field, greenhouse, growth chamber) and by the inoculation method used (Pumphrey *et al.*, 2007). Possibly the publication by Pumphrey *et al.* (2007) has a greater similarity to this study in terms of the conditions in which the resistance conferred by *Fhb1* was evaluated. The authors studied the effect of *Fhb1* in 19 pairs of NILs developed from breeding lines of the University of Minnesota and reported that *Fhb1* conferred an increase in type II resistance of 31 %. Although this result is higher than the 18.4 % found in our work, this difference could be explained by the different parental materials used for the development of the lines in both studies.

Previous studies have focused on analyzing the independent effect of *Fhb1* or its interaction with other important QTL (Salameh *et al.*, 2011, Shi *et al.*, 2008, Buerstmayr *et al.*, 2003, Anderson *et al.*, 2001). The present research analyzed the relationship between the effect of *Fhb1* with the level of resistance of the background in which *Fhb1* was introduced. The magnitude of the reduction of FHB conferred by *Fhb1* in the four populations developed in this research suggests an similar effect of the QTL on type II resistance to FHB, since the interaction *Fhb1* and population was not significant. The complexity of the genetic basis of the resistance to FHB, as well as the influence of the environment on the expression of the resistance, requires additional studies to better understand the interaction between the different genetic backgrounds and *Fhb1*. The effect of *Fhb1* was estimated under greenhouse conditions phenotyping resistance type II, and yet, it has to be validated under field conditions.

The effect of *Sr2* was estimated in two populations and tended to be higher in the population derived from the INIA elite cultivar with lower level of SR resistance (G.2375, Figure 4). There are few studies that estimate the contribution of *Sr2* in the

resistance to SR. Zhang *et al.* (2016) developed 59 lines carrying *Sr2* derived from two different crosses, which had a reduction of SR severity ranging from 26 to 53 % in relation to their susceptible parent. The effect of *Sr2* measured in our populations was higher than the effect measured by Zhang *et al.* (2016). Additional characterization of SR resistance in experiments with replications, more adequate materials (R and S lines derived from the same BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> family) and under field conditions during the main field season should be carried out.

This work is an important contribution to the knowledge about the effectiveness of the genetic resistance conferred by *Fhb1* and *Sr2* in the adapted INIA elite wheat germplasm as well as the development of wheat lines adapted to the Uruguayan production conditions. The introduction of *Fhb1* in INIA cultivars might contribute to broaden the genetic base of resistance to FHB of the INIA WBP in Uruguay. In addition, the effect of these genes was validated in a context of local adapted germplasm. The developed lines will be used as valuable progenitors to increase the efficiency of breeding for resistance to FHB and SR in Uruguay. FHB is the most important threat to wheat production in our country, mostly due to the associated toxin contamination which may make the grain unmarketable. The resistance of the most resistant commercial cultivars to FHB that are available nationally is not enough to avoid grain yield losses and DON toxin contamination alone. Decreasing the FHB infection in 18.4 % through the introduction of *Fhb1* is very relevant and will impact in the viability of the crop, not only because of higher resistance but also most probably decreasing the DON toxin content.

## 2.6. CONCLUSIONS

In this research, the methodology used for the introduction of the coupled *Fhb1*-*Sr2* in the INIA elite cultivars with a single molecular marker was validated. Adapted lines carrying *Fhb1*-*Sr2* were developed and will contribute to increase resistance to FHB and SR in Uruguay. In addition, we confirmed the positive effect on type II resistance to FHB when *Fhb1* is in coupling with *Sr2*. Additional studies are required to better understand the relationship between the different adapted genetic backgrounds and *Fhb1*, and also to estimate its effect in reducing the disease and toxin

grain contamination under field conditions. Further studies are also required to estimate the effect of *Sr2* on the level of SR resistance in replicated field experiments conducted during the main season.

## 2.7. ACKNOWLEDGMENTS

We thank Noelia Pérez (National Institute of Agricultural Research-INIA Uruguay) for technical assistance with field and greenhouse activities. We also thank Victoria Bonnacarrere, Wanda Iriarte (INIA Uruguay) and Adriana Reyes (CIMMYT) for their assistance with biotechnology activities. The research that generated the results presented in this publication received financial support from the National Research and Innovation Agency under the code POS\_NAC\_2016\_1\_129877.

## 2.8. REFERENCES

- Anderson, J. A., Stack, R. W., Liu, S., Waldron, B. L., Fjeld, A. D., Coyne, C., ... & Frohberg, R. C. 2001. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(8), 1164-1168.
- Ayliffe M, Singh R, Lagudah E. 2008. Durable resistance to wheat stem rust needed. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(2), 187-192.
- Bansal, U., Bariana, H., Wong, D., Randhawa, M., Wicker, T., Hayden, M., & Keller, B. (2014). Molecular mapping of an adult plant stem rust resistance gene *Sr56* in winter wheat cultivar Arina. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(6), 1441-1448.
- Bernardo, A. N., Ma, H., Zhang, D., & Bai, G. 2012. Single nucleotide polymorphism in wheat chromosome region harboring *Fhb1* for Fusarium head blight resistance. *Molecular Breeding*, 29(2), 477-488.
- Box, G. E., & Cox, D. R. 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 26(2), 211-243.

- Brar, G. S., Pozniak, C. J., Kutcher, H. R., & Hucl, P. J. 2019. Evaluation of Fusarium head blight resistance genes *Fhb1*, *Fhb2*, and *Fhb5* introgressed into elite Canadian hard red spring wheats: effect on agronomic and end-use quality traits and implications for breeding. *Molecular Breeding*, 39(3), 44.
- Buerstmayr, H., Ban, T., & Anderson, J. A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding*, 128(1), 1-26.
- Buerstmayr H, Steiner B, Hartl L, Griesser M, Angerer N, Lengauer D, Miedaner T, Schneider T, Lemmens M. 2003. Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(3), 503-508.
- Buerstmayr, H., Lemmens, M., Hartl, L., Doldi, L., Steiner, B., Stierschneider, M., & Ruckenbauer, P. 2002. Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theoretical and Applied Genetics*, 104(1), 84-91.
- Bushnell, W. R., Hazen, B. E., Pritsch, C., & Leonard, K. 2003. Histology and physiology of Fusarium head blight. In: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. APS Press.
- Campbell, C. L., & Madden, L. V. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York: John Wiley & Sons. 532 p.
- Campos, P., Castro, M., Pereyra, S., Quincke, M., Milisich, H., Giéco, L., López, J., Germán, S.E. 2015. Re-emergence of stem rust at epidemic levels in Argentina and Uruguay in 2014. [Online] In: McIntosh RA (Eds.). Proceedings 2015 Technical Workshop Borlaug Global Rust Initiative, Sydney, Australia. [Online] <https://www.cabdirect.org/cabdirect/FullTextPDF/2017/20173038268.pdf> (accessed 10 January 2018).

- Castro, M., Germán, S.E., Pereyra, S.A. 2019. Caracterización sanitaria de cultivares de trigo y cebada. [Online]. <http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20La%20Estanzuela/Actividades%202019/caracterizaci%C3%B3n%20sanitaria%202018%2023%20abril.pdf> (accessed 10 March 2019).
- Castro, M., Germán, S.E., Pereyra, S.A. 2015. Caracterización sanitaria de cultivares de trigo y cebada. [Online]. [http://www.inia.uy/Documentos/Privados/INIA%20La%20Estanzuela/caracterizaci%C3%B3n\\_sanitaria\\_cultivares\\_trigo\\_cebada.pdf](http://www.inia.uy/Documentos/Privados/INIA%20La%20Estanzuela/caracterizaci%C3%B3n_sanitaria_cultivares_trigo_cebada.pdf) (accessed 12 January 2018).
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491), 557-572.
- Dawkins, R., & Krebs, J. R. 1979. Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 205(1161), 489-511.
- Doyle, J. J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Dreisigacker, S., Sehgal D., Reyes Jaimez A.E., Luna Garrido B., Muñoz Zavala S., Núñez Ríos C., Mollins J., Mall S. (Eds.). 2016. CIMMYT Wheat Molecular Genetics: *Laboratory Protocols and Applications to Wheat Breeding*. Mexico, D.F.: CIMMYT. 142 p.
- Ellis, M. H., Bonnett, D. G., & Rebetzke, G. J. 2007. A 192bp allele at the Xgwm261 locus is not always associated with the Rht8 dwarfing gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 157(1-2), 209-214.
- Germán, S., Díaz de Ackermann, M., Silva, P., Quincke, M., Pereyra, S. 2018. Manejo por resistencia a enfermedades de trigo en Uruguay. SEMINARIO

INTERNACIONAL «1914-2014, un siglo de mejoramiento de trigo en La Estanzuela» 27-28-29 de agosto de 2014 INIA La Estanzuela. La Estanzuela: INIA. 241, 148-166.

He, X., Bonnett, D., Singh, P. K., Hyles, J., Spielmeier, W., & Dreisigacker, S. 2015. Advanced wheat breeding lines combining *Fhb1* and *Sr2* in different genetic backgrounds. In: *Proceedings of the 9th International Wheat Conference, Sydney, Australia*. 20-25.

Herrera-Foessel, S. A., Singh, R. P., Lillemo, M., Huerta-Espino, J., Bhavani, S., Singh, S., ... & Lagudah, E. S. 2014. *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(4), 781-789.

Jin, F., Zhang, D., Bockus, W., Baenziger, P. S., Carver, B., & Bai, G. 2013. Fusarium head blight resistance in US winter wheat cultivars and elite breeding lines. *Crop Science*, 53(5), 2006-2013.

Jin, Y., Szabo, L. J., Pretorius, Z. A., Singh, R. P., Ward, R., & Fetch Jr, T. 2008. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease*, 92(6), 923-926.

Liu, S., Pumphrey, M., Gill, B., Trick, H., Zhang, J., Dolezel, J., ... & Anderson, J. 2008. Toward positional cloning of *Fhb1*, a major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. *Cereal Research Communications*, 36 (Supplement 6), 195-201.

Liu, S., Zhang, X., Pumphrey, M. O., Stack, R. W., Gill, B. S., & Anderson, J. A. 2006. Complex microcolinearity among wheat, rice, and barley revealed by fine mapping of the genomic region harboring a major QTL for resistance to Fusarium head blight in wheat. *Functional & Integrative Genomics*, 6(2), 83-89.

Liu, S., & Anderson, J. A. 2003. Marker assisted evaluation of Fusarium head blight resistant wheat germplasm. *Crop Science*, 43(3), 760-766.

- Mago, R., Brown-Guedira, G., Dreisigacker, S., Breen, J., Jin, Y., Singh, R., ... & Spielmeier, W. 2011. An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene Sr2 in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(4), 735-744.
- McIntosh, R.A., Dubcovsky, J., Rogers, W.J., Morris, C., Appels, R., Xia, X.C. 2017 Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 Supplement. *Annual Wheat News* 53:1–20.
- Mesterházy, Á., Bartók, T., Mirocha, C. G., & Komoroczy, R. 1999. Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding*, 118(2), 97-110.
- Miedaner, T., Wilde, F., Steiner, B., Buerstmayr, H., Korzun, V., & Ebmeyer, E. 2006. Stacking quantitative trait loci (QTL) for Fusarium head blight resistance from non-adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(3), 562-569.
- Niwa, S., Kubo, K., Lewis, J., Kikuchi, R., Alagu, M., & Ban, T. 2014. Variations for Fusarium head blight resistance associated with genomic diversity in different sources of the resistant wheat cultivar ‘Sumai 3’. *Breeding Science*, 64(1), 90-96.
- Peterson, R. F., Campbell, A. B., & Hannah, A. E. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Canadian Journal of Research*, 26(5), 496-500.
- Pretorius, Z. A., Singh, R. P., Wagoire, W. W., & Payne, T. S. 2000. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene Sr31 in *Puccinia graminis* f. sp. tritici in Uganda. *Plant Disease*, 84(2), 203-203.
- Pumphrey, M. O., Bernardo, R., & Anderson, J. A. 2007. Validating the Fhb1 QTL for Fusarium head blight resistance in near-isogenic wheat lines developed from breeding populations. *Crop Science*, 47(1), 200-206.

- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.r-project.org/>. Accessed 04 January 2019.
- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., & Ganal, M. W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, *149*(4), 2007-2023.
- Roelfs, A.P., Singh, R.P., Saari, E.E., 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. México D.F.: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 81 p.
- Salameh, A., Buerstmayr, M., Steiner, B., Neumayer, A., Lemmens, M., Buerstmayr, H. 2011. Effects of introgression of two QTL for fusarium head blight resistance from Asian spring wheat by marker-assisted backcrossing into European winter wheat on fusarium head blight resistance, yield and quality traits. *Molecular Breeding*, *28*(4), 485-494.
- Shi, J.R., Xu, D.H., Yang, H.Y., Lu, Q.X., Ban, T. 2008. DNA marker analysis for pyramided of Fusarium head blight (FHB) resistance QTLs from different germplasm. *Genetics*, *133*(1), 77-84.
- Singh, R.P., Hodson, D.P., Jin, Y., Lagudah, E.S., Ayliffe, M.A., Bhavani, S., Basnet, B.R. 2015. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology*, *105*(7), 872-884.
- Singh, S., Singh, R. P., Bhavani, S., Huerta-Espino, J., & Eugenio, L. V. E. 2013. QTL mapping of slow-rusting, adult plant resistance to race Ug99 of stem rust fungus in PBW343/Muu RIL population. *Theoretical and Applied Genetics*, *126*(5), 1367-1375.
- Singh, R. P. 2012. Pros and cons of utilizing major, race-specific resistance genes versus partial resistance in breeding rust resistant wheat. In *Proceedings*,



*Borlaug Global Rust Initiative, 2012 Technical Workshop, September 1-4, Beijing, China: Oral presentations.* (p. 57-65). Borlaug Global Rust Initiative.

Singh, R. P., Hodson, D. P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Njau, P., Wanyera, R., ... & Ward, R. W. 2008. Will stem rust destroy the world's wheat crop?. *Advances in Agronomy*, 98, 271-309.

Singh, R. P., Hodson, D. P., Jin, Y., Huerta-Espino, J., Kinyua, M. G., Wanyera, R., ... & Ward, R. W. 2006. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 1(54), 1-13.

Singh, R. P., Ma, H., & Rajaram, S. 1995. Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Frontana. *Plant Disease*, 79(3), 238-240.

Snijders, C. H. A. 1990b. The inheritance of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Euphytica*, 50(1), 11-18.

Stubbs, R.W., Prescott, J.M., Saari, E.E., Dubin, H.J., 1986. Manual de metodología sobre las enfermedades e los cereales. México D.F.: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 46 p.

van Eeuwijk, F. V., Mesterházy, A., Kling, C. I., Ruckenbauer, P., Saur, L., Buerstmayr, H., ... & Snijders, C. H. A. 1995. Assessing non-specificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with European strains of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. nivale* using a multiplicative model for interaction. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(2), 221-228.

Verges, V. L., Van Sanford, D., & Brown-Guedira, G. 2006. Heritability estimates and response to selection for *Fusarium* head blight resistance in soft red winter wheat. *Crop Science*, 46(4), 1587-1594.

- Waldron, B. L., Moreno-Sevilla, B., Anderson, J. A., Stack, R. W., & Frohberg, R. C. 1999. RFLP mapping of QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. *Crop Science*, 39(3), 805-811.
- Wanyera, R., Kinyua, M. G., Jin, Y., & Singh, R. P. 2006. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on *Sr31* in wheat in Eastern Africa. *Plant Disease*, 90(1), 113-113.
- Wilcoxson, R. D., Busch, R. H., & Ozmon, E. A. 1992. Fusarium head blight resistance in spring wheat cultivars. *Plant Disease (USA)*.
- Yang, Z. P., Gilbert, J., Somers, D. J., Fedak, G., Procunier, J. D., & McKenzie, I. H. 2003. Marker assisted selection of Fusarium head blight resistance genes in two doubled haploid populations of wheat. *Molecular Breeding*, 12(4), 309-317.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6), 415-421.
- Zhang, X., Rouse, M. N., Nava, I. C., Jin, Y., & Anderson, J. A. 2016. Development and verification of wheat germplasm containing both *Sr2* and *Fhb1*. *Molecular Breeding*, 36(7), 85.
- Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Xu, J., ... & Feng, J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *Plos One*, 7(2), e31722.
- Zhou, W., Kolb, F. L., Bai, G., Shaner, G., & Domier, L. L. 2002. Genetic analysis of scab resistance QTL in wheat with microsatellite and AFLP markers. *Genome*, 45(4), 719-727.

### **3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES**

La FE y la RT son dos de las principales enfermedades que afectan el cultivo de trigo en Uruguay. La FE puede causar perjuicios económicos muy importantes, ya sea por su impacto en la reducción del rendimiento y calidad de grano como por la presencia de micotoxinas que afectan la comercialización del trigo (Germán *et al.*, 2018). La RT estuvo bajo control durante décadas, debido al uso de cultivares con buena resistencia genética. Sin embargo, actualmente constituye una amenaza para el cultivo de trigo debido al alto porcentaje de utilización de cultivares susceptibles en gran parte del área sembrada. En 2014, una epidemia generalizada de RT fue observada en Uruguay y Argentina (Campos *et al.*, 2015). Adicionalmente, la amenaza se ve agravada por la posible migración desde África de razas virulentas sobre la mayoría de los cultivares hoy resistentes.

El mejoramiento genético por resistencia a enfermedades ha sido uno de los objetivos principales del PMGT de INIA (Quincke *et al.*, 2018). El mejoramiento por resistencia a FE en general es de progreso lento a causa de su herencia poligénica y de baja heredabilidad y a que es altamente influenciado por el ambiente (Germán *et al.*, 2018). Además, por tratarse de una enfermedad que no ocurre todos los años las oportunidades de selección son relativamente bajas si no se utiliza inoculación artificial y riego por aspersión, lo que se utiliza para líneas avanzadas. El desarrollo de cultivares resistentes es esencial para reducir el riesgo de epidemias de FE. El QTL *Fhb1* es ampliamente utilizado en programas de mejoramiento genético a nivel mundial y es reconocido como el de mayor efecto en reducir la infección de la enfermedad (Buerstmayr *et al.*, 2009). Sin embargo, está presente en muy baja proporción del germoplasma del PMGT de INIA.

Durante los últimos años se ha verificado una pérdida del nivel de resistencia a RT de las variedades del PMGT de INIA, las cuales pasaron de niveles altos de resistencia a niveles intermedios (Quincke *et al.*, 2018). Actualmente, para conseguir niveles duraderos de resistencia a RT los PMGT se están enfocando en desarrollar cultivares que contengan un alto nivel de resistencia conferido por tres vías: i)

piramidización de genes de resistencia mayores, ii) acumulación de varios genes RP juntos, o iii) combinaciones de genes RP con genes R efectivos frente a la población actual de RT (Ayliffe *et al.*, 2008). *Sr2* es el gen menor de resistencia a RT más extensamente utilizado y es efectivo frente a todas las razas conocidas del patógeno. En el PMGT de INIA, *Sr2* ha sido introducido principalmente del germoplasma proveniente de CIMMYT, que ha sido ampliamente utilizado en cruces (Luizzi *et al.*, 2018).

*Fhb1* y *Sr2* están ligados en repulsión, aproximadamente a 3 cM de distancia en el cromosoma 3B (Anderson *et al.*, 2001). Recientemente, se desarrollaron en la Universidad de Minnesota líneas con *Fhb1* y *Sr2* acoplados (Zhang *et al.*, 2016), que fueron cedidas a INIA por el Dr. J. Anderson. Incrementar la frecuencia de *Fhb1* y *Sr2* en acoplamiento en el germoplasma del PMGT de INIA contribuirá a incrementar la resistencia a FE y RT en Uruguay.

La SAM tiene un enorme potencial para mejorar la eficiencia y la precisión del mejoramiento genético, facilitando la introducción de componentes genéticos de interés en el germoplasma local adaptado (Collard y Mackill, 2008). El método de retrocruzamientos asistido por marcadores es utilizado para incorporar uno o varios genes en una variedad adaptada o elite. En la mayoría de los casos, el padre utilizado para las retrocruzas tiene un gran número de atributos deseables, pero es deficiente en alguna característica en particular (Collard y Mackill, 2008).

El primer objetivo de este trabajo fue incorporar *Fhb1* y *Sr2* en genotipos adaptados uruguayos mediante el uso de SAM. Para esto, la línea donante de *Fhb1-Sr2* Sf26 fue cruzada y retrocruzada tres veces con cuatro cultivares INIA con distinto nivel de resistencia a FE y RT (de intermedio a bajo) que no poseen *Fhb1* y *Sr2*: Génesis 2375, Génesis 6.87, INIA Madrugador e INIA Don Alberto. En segundo lugar, se cuantificó el efecto de *Fhb1-Sr2* en reducir la infección de FE y RT en las líneas homocigotas desarrolladas, con y sin los genes de resistencia.

En total, 81 líneas RC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> portadoras de *Fhb1-Sr2* fueron seleccionadas desde familias RC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> para las cuatro poblaciones, utilizando los marcadores moleculares

UMN10 y SNP3BS-8 para *Fhb1* y csSR2 para *Sr2*. La SAM en este trabajo, facilitó la detección de las líneas portadoras de *Fhb1-Sr2*, debido a que la selección fue realizada sobre genes de carácter cuantitativo, los cuales en general son más difíciles de seleccionar fenotípicamente. Por otro lado, también aceleró el proceso de selección, permitiendo seleccionar un carácter que se evalúa en etapa reproductiva como la FE, en el estado vegetativo. Se espera que promediamente las líneas seleccionadas presenten un 93.75 % de recuperación del fondo genético del cultivar utilizado como padre recurrente. El fuerte ligamiento entre *Fhb1* y *Sr2* permitió utilizar solamente el marcador molecular UMN10 para la selección de las plantas heterocigotas durante el proceso de retrocruzamientos. Posteriormente mediante el marcador csSr2 se confirmó la presencia de *Sr2*. En base a estos resultados se pudo confirmar que UMN10 es un marcador confiable para la selección de *Fhb1-Sr2* y aplicable al germoplasma de trigo en Uruguay. El proceso de SAM realizado es un aporte metodológico relevante ya que generó el primer antecedente de SAM para resistencia a FE en el país.

El ANOVA para la resistencia a FE tipo II indicó que los efectos principales *Fhb1* y población fueron significativos a un p-valor < 0.001. La comparación de medias entre los grupos de líneas BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> con y sin *Fhb1* mostró una reducción promedio de la enfermedad de 18.4 % en el grupo portador de *Fhb1*. Esta diferencia fue estadísticamente significativa mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $\alpha \leq 0.01$ . Dentro de cada población, las líneas portadoras de *Fhb1* presentaron un nivel de N\_AUDPC inferior al de las líneas portadoras de *fhb1* y al del padre recurrente en todos los casos. EL N\_AUDPC de los cultivares elite y sus líneas derivadas (Figura 2b) siguió la misma tendencia de resistencia que los cultivares elite evaluados en ensayos de campo (Tabla 1).

Dentro de los trabajos de validación reportados, posiblemente el desarrollado por Pumphrey *et al.* (2007) es el que presentó mayores similitudes en términos de las condiciones en que se evaluó la resistencia. Los autores estudiaron el efecto de *Fhb1* en 19 pares de NILs desarrolladas a partir de líneas de mejoramiento de la Universidad de Minnesota y reportaron que *Fhb1* confirió un incremento de 31 % en la resistencia tipo II. Si bien este resultado es superior al 18.4 % observado en nuestro trabajo, la

diferencia podría estar explicada por el diferente material parental utilizado para el desarrollo de las líneas en ambos trabajos, así como por diferencias en el ambiente que se desarrolló el ensayo y los aislamientos del patógeno utilizados.

Hay varios motivos que dificultan la comparación de los resultados del efecto de *Fhb1* entre los trabajos realizados. En primer lugar, la mayor parte de los trabajos han cuantificado el efecto de *Fhb1* en poblaciones de mapeo (Zhang *et al.* 2012, Anderson *et al.* 2001, Waldron *et al.* 1999), esto es una diferencia importante debido a que el contexto genético de los parentales utilizados en poblaciones de mapeo en general es muy variable y de baja adaptación. En segundo lugar, el efecto de *Fhb1* también puede verse afectado por el ambiente en el que se realicen las mediciones (por ejemplo, campo, invernáculo, cámara de crecimiento), por el método de inoculación utilizado y por el nivel de agresividad los aislamientos del patógeno (Pumphrey *et al.*, 2007). Estas diferencias pueden influenciar diferentes factores genéticos que condicionen la medición de la resistencia. Estos hechos, en parte podrían explicar las diferencias encontradas en relación al efecto de *Fhb1* sobre la disminución de la FE.

En general los estudios previos se han enfocado en analizar el efecto independiente de *Fhb1* o su interacción con otros QTL de importancia (Salameh *et al.* 2011, Shi *et al.* 2008, Buerstmayr *et al.* 2003, Anderson *et al.* 2001). En este trabajo se analizó la relación entre el efecto de *Fhb1* con el nivel de resistencia del fondo genético en el que fue introducido. La no significancia de la interacción entre *Fhb1* y la población en el ANOVA, indicó que no hay una interacción relevante entre el nivel de resistencia del padre recurrente y el efecto de *Fhb1* en reducir la N\_AUDPC. La magnitud de la reducción conferida por *Fhb1* en las cuatro poblaciones, sugiere un efecto similar del QTL sobre la resistencia tipo II a la FE. La complejidad de la base genética de la resistencia a FE así como la influencia del ambiente sobre la expresión de la resistencia, requieren estudios adicionales para comprender mejor la interacción entre los diferentes fondos genéticos y *Fhb1*. El efecto de *Fhb1* fue estimado en condiciones controladas, por lo que sería necesario validarlo en condiciones de campo.

El efecto de *Sr2* sobre RT pudo ser evaluado en dos poblaciones y tendió a ser mayor en la población con mayor nivel de infección. La población Sf26/Génesis 2375\*4 tuvo una infección alta de RT y las líneas portadoras de *Sr2* tuvieron un 50.5 % menor infección de RT. La población Sf26/Génesis 6.87\*4 presentó un nivel de infección intermedio y una menor reducción del nivel de infección causada por *Sr2* (15 %). Las líneas susceptibles para Sf26/Génesis 2375\*4 y Sf26/Génesis 6.87\*4 presentaron un nivel de susceptibilidad similar al del padre recurrente. Hay pocos trabajos que estimen el aporte de *Sr2* a la resistencia a RT. Zhang *et al.* (2016) desarrollaron 59 líneas portadoras de *Sr2* derivadas de dos diferentes cruzamientos, dichas líneas presentaron una reducción de la severidad de RT que varió entre 26 y 53 % en comparación a los padres susceptibles que no portaban *Sr2*. Estos resultados son similares a los encontrados en el presente trabajo.

Este trabajo es un importante aporte tanto al conocimiento sobre la resistencia genética conferida por *Fhb1*, como por el desarrollo de material adaptado a nuestras condiciones productivas con la combinación de *Fhb1* y *Sr2*. Entre los numerosos trabajos que estudiaron el efecto de *Fhb1*, este es el primero que reporta su efecto en acoplamiento con el gen *Sr2* en background genético en uso en el Cono Sur. La introducción de *Fhb1* en germoplasma adaptado permitió ampliar la base genética de la resistencia a FE del PMGT de INIA (originada principalmente de fuentes de resistencia brasileras y japonesas). Además, permitió validar el QTL en un contexto de germoplasma local de uso comercial y de adecuada calidad industrial. Las líneas desarrolladas son progenitores valiosos que estarán disponibles para diseñar estrategias que incrementen la eficiencia de mejoramiento por resistencia a FE y RT en el país. Poder incrementar la resistencia de los cultivares comerciales más resistentes a FE que se dispone a nivel nacional en aproximadamente 18 % a través de la introducción de *Fhb1* es muy relevante. El aumento de resistencia a FE favorecerá la calidad del grano obtenido debido a la reducción de la contaminación por toxinas producidas por el hongo. Disminuir la presencia de la toxina DON permitirá ajustarse con mayor frecuencia al límite establecido en el decreto 533/01 del Ministerio de Salud Pública, por lo que contribuirá a mejorar la posibilidad de comercialización del

producto. Desde el punto de vista industrial, la obtención de materias primas de mejor calidad favorecerá la inocuidad de los productos elaborados para consumo humano y animal.

EL primer objetivo específico (introducir *Fhb1-Sr2* en germoplasma adaptado a Uruguay mediante un protocolo de retrocruzas asistidas por marcadores moleculares utilizando cuatro cultivares elite INIA que no poseen estos genes y que tienen distinto nivel de resistencia a FE y RT) fue cumplido cabalmente, obteniéndose un total de 81 líneas con ambos genes acoplados para las cuatro poblaciones.

El segundo objetivo específico (cuantificar el efecto de *Fhb1-Sr2* en el nivel de resistencia a FE y RT en las líneas generadas de los cruzamientos con los cuatro cultivares elite INIA con diferente nivel de resistencia a estas enfermedades) fue alcanzado para FE y preliminarmente para RT, aunque requiere verificación para ambas enfermedades. El ensayo de FE fue llevado a cabo en condiciones controladas, los resultados deben ser validados bajo condiciones de campo. El material desarrollado permitirá confirmar el efecto de *Fhb1* en la acumulación de DON en futuros estudios. Actualmente se está incrementando semilla de las líneas obtenidas y se repetirán ensayos de RT a campo, con un diseño experimental con repeticiones sembrado en la estación de cultivo, donde se probarán materiales adecuados (líneas con y sin *Fhb1-Sr2* derivadas de la misma familia BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>).



#### 4. **BIBLIOGRAFÍA GENERAL**

- Alvarez CL, Azcarate MP, Pinto VF. 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2): 131-135.
- Andersen AL. 1948. The development of Gibberella-Zeae head blight of wheat. *Phytopathology*, 38(8): 595-611.
- Anderson JA, Stack RW, Liu S, Waldron BL, Fjeld AD, Coyne C, Moreno-Sevilla B, Fetch JM, Song QJ, Cregan PB, Frohberg RC. 2001. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(8): 1164-1168.
- Araus JL, Brown HR, Febrero A, Bort J, Serret MD. 1993. Ear photosynthesis, carbon isotope discrimination and the contribution of respiratory CO<sub>2</sub> to differences in grain mass in durum wheat. *Plant, Cell & Environment*, 16(4): 383-392.
- Ayliffe M, Singh R, Lagudah E. 2008. Durable resistance to wheat stem rust needed. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(2): 187-192.
- Backhouse D, Burgess LW, Summerell BA. 2001. Biogeography of Fusarium. En: *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden P, Burgess LW, eds. St. Paul: The American Phytopathological Society Press. 122-136
- Badea A, Eudes F, Graf RJ, Laroche A, Gaudet DA, Sadasivaiah RS. 2008. Phenotypic and marker-assisted evaluation of spring and winter wheat germplasm for resistance to fusarium head blight. *Euphytica*, 164(3): 803-819.
- Bai G, Shaner G. 1994. Scab of wheat: prospects for control. *Plant Disease*, 78(8): 760-766.

- Bajgain P, Rouse MN, Bulli P, Bhavani S, Gordon T, Wanyera R, Njau PN, Legesse W, Anderson JA, Pumphrey MO. 2015. Association mapping of North American spring wheat breeding germplasm reveals loci conferring resistance to Ug99 and other African stem rust races. *BMC Plant Biology*, 15(1): 249.
- Bansal U, Bariana H, Wong D, Randhawa M, Wicker T, Hayden M, Keller B. 2014. Molecular mapping of an adult plant stem rust resistance gene *Sr56* in winter wheat cultivar Arina. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(6): 1441-1448.
- Bernardo, AN, Ma H, Zhang D, Bai G. 2012. Single nucleotide polymorphism in wheat chromosome region harboring *Fhb1* for Fusarium head blight resistance. *Molecular Breeding*, 29(2): 477-488.
- BGRI (Borlaug Global Rust Initiative). 2018 [En línea]. 16 enero 2018. Disponible en: <https://www.globalrust.org/about-bgri>.
- Box GE, Cox DR. 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 26(2): 211-243.
- Brar GS, Pozniak CJ, Kutcher HR, & Hucl PJ. (2019). Evaluation of Fusarium head blight resistance genes *Fhb1*, *Fhb2*, and *Fhb5* introgressed into elite Canadian hard red spring wheats: effect on agronomic and end-use quality traits and implications for breeding. *Molecular Breeding*, 39(3): 44.
- Brown JK, Hovmøller MS. 2002. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science*, 297(5581): 537-541.
- Buerstmayr H, Ban T, Anderson JA. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding*, 128(1): 1-26.
- Buerstmayr H, Steiner B, Hartl L, Griesser M, Angerer N, Lengauer D, Miedaner T, Schneider T, Lemmens M. 2003. Molecular mapping of QTLs for Fusarium head

- blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(3): 503-508.
- Buerstmayr H, Lemmens M, Hartl L, Doldi L, Steiner B, Stierschneider M, Ruckebauer P. 2002. Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theoretical and Applied Genetics*, 104(1): 84-91.
- Buerstmayr H, Steiner B, Lemmens M, Ruckebauer P. 2000. Resistance to Fusarium head blight in winter wheat: heritability and trait associations. *Crop Science*, 40(4): 1012-1018.
- Burlakoti RR, Mergoum M, Kianian SF, Adhikari TB. 2010. Combining different resistance components enhances resistance to Fusarium head blight in spring wheat. *Euphytica*, 172(2): 197-205.
- Bushnell WR, Hazen BE, Pritsch C, Leonard K. 2003. Histology and physiology of Fusarium head blight. En: Leonard KJ, Bushnell WR. *Fusarium head blight of wheat and barley*. American Phytopathological Society (APS Press). 44-83.
- Cabella D, Eguren E. 2012. Buenas prácticas en la elaboración de alimentos para animales. MGAP. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur. Banco Interamericano de Desarrollo. 40 p.
- Cainong JC, Bockus WW, Feng Y, Chen P, Qi L, Sehgal SK, Danilova TV, Koo DH, Friebe B, Gill BS. 2015. Chromosome engineering, mapping, and transferring of resistance to Fusarium head blight disease from *Elymus tsukushiensis* into wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(6): 1019-1027.
- Campbell CL, Madden LV. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: John Wiley & Sons. 532 p.
- Campos P, Castro M, Pereyra S, Quincke M, Milisich H, Gioco L, López J, Germán SE. 2015. Re-emergence of stem rust at epidemic levels in Argentina and

Uruguay in 2014. En: McIntosh RA (Eds.). Proceedings 2015 Technical Workshop Borlaug Global Rust Initiative, Sydney, Australia [En línea] 10 enero 2018. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/FullTextPDF/2017/20173038268.pdf>.

Castro, M., Germán, S.E., Pereyra, S.A. 2019. Caracterización sanitaria de cultivares de trigo y cebada. [En línea]. 10 marzo 2019. Disponible en: <http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20La%20Estanzuela/Actividades%202019/caracterizaci%C3%B3n%20sanitaria%202018%2023%20abril.pdf>.

Castro, M., Germán, S.E., Pereyra, S.A. 2015. Caracterización sanitaria de cultivares de trigo y cebada [En línea]. 12 enero 2018. Disponible en: [http://www.inia.uy/Documentos/Privados/INIA%20La%20Estanzuela/caracterizaci%C3%B3n\\_sanitaria\\_cultivares\\_trigo\\_cebada.pdf](http://www.inia.uy/Documentos/Privados/INIA%20La%20Estanzuela/caracterizaci%C3%B3n_sanitaria_cultivares_trigo_cebada.pdf).

Champeil A, Doré T, Fourbet JF. 2004. Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. *Plant Science*, 166(6): 1389-1415.

Chantret N, Salse J, Sabot F, Rahman S, Bellec A, Laubin B, Dubois I, Dossat C, Sourdille P, Joudrier P, Gautier MF, Cattolico L, Beckert M, Aubourg S, Weissenbach J, Caboche M, Bernard M, Leroy P, Chalhou B. 2005. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *The Plant Cell*, 17(4): 1033-1045.

Chen PD, Liu DJ. 2000. Transfer of scab resistance from *Leymus racemosus*, *Roegneria ciliaris* and *R. kamoji* into common wheat. In Proceedings of the International Symposium on Wheat Improvement for Scab Resistance. Suzhou y Nanjing, China. 62-67.

- Chrprová J, Šíp V, Sedláček T, Štočková L, Veškrna O, Horčíčka P. 2011. Effectiveness of marker-based selection for Fusarium head blight resistance in spring wheat. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47(Special Issue).
- Collard BC, Mackill DJ. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491): 557-572.
- Collard BC, Jahufer MZ, Brouwer JB, Pang EC. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2): 169-196.
- Dawkins R, Krebs JR. 1979. Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 205(1161): 489-511.
- De Galich MT. 1997. Fusarium head blight in Argentina. *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Mexico: CIMMYT, 19-28.
- Demeke, T., Clear, R. M., Patrick, S. K., & Gaba, D. 2005. Species-specific PCR-based assays for the detection of Fusarium species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3): 271-284.
- Díaz M, Pereyra S. 2011. Fusariosis de la espiga en trigo y cebada. En: Pereyra S, Díaz de Ackermann M, Germán S, Cabrera K. (Eds.). *Seminario Manejo de enfermedades de trigo y cebada*. La Estanzuela: INIA (INIA Serie Técnica) 189: 111-128.
- Díaz M, Pereyra S, Stewart S, Mieres J. 2002. Fusariosis de la espiga en trigo y cebada. *La Estanzuela: INIA. Hoja de Divulgación N° 79*. 4 p.

- Díaz M. 1996. Golpe blanco de la espiga del trigo causado por *Gibberella zeae* (Schw.) Petch: estado perfecto de *Fusarium graminearum* Schw. La Estanzuela: INIA (INIA Serie Técnica) 74. 79-86.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2017. Ministerio de ganadería, agricultura y pesca. República Oriental del Uruguay [En línea]. 10 enero 2018. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-estad%C3%ADstico-de-diea-2017>.
- Dill-Macky R, Jones RK. 2000. The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. *Plant Disease*, 84(1): 71-76.
- Doohan FM, Brennan J, Cooke BM. 2003. Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals. *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi*. Dordrecht: Springer. 755-768.
- Doyle JJ. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- Dreisigacker S, Sehgal D, Reyes Jaimez AE, Luna Garrido B, Muñoz Zavala S, Núñez Ríos C, Mollins J, Mall S. (Eds.). 2016. CIMMYT Wheat Molecular Genetics: Laboratory Protocols and Applications to Wheat Breeding. Mexico, D.F.: CIMMYT. 142 p.
- Dundas IS, Anugrahwati DR, Verlin DC, Park RF, Bariana HS, Mago R, Islam AKMR. 2007. New sources of rust resistance from alien species: meliorating linked defects and discovery. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(6): 545-549.
- Dweba CC, Figlan S, Shimelis HA, Motaung TE, Sydenham S, Mwadzingeni L, Tsilo TJ. 2017. Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, 91: 114-122.

- Eckard JT, Gonzalez-Hernandez JL, Caffè M, Berzonsky W, Bockus WW, Marais GF, Baenziger PS. 2015. Native Fusarium head blight resistance from winter wheat cultivars 'Lyman', 'Overland', 'Ernie' and 'Freedom' mapped and pyramided onto 'Wesley'-*Fhb1* backgrounds. *Molecular Breeding*, 35(1): 6.
- Ellis MH, Bonnett DG, Rebetzke GJ. 2007. A 192bp allele at the Xgwm261 locus is not always associated with the Rht8 dwarfing gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 157(1-2): 209-214.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Wheat production. 2017 [En línea]. 21 abril 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Farokhzadeh S, Alifakheri B. 2014. Marker-assisted selection for disease resistance: applications in breeding (Review). *International Journal of Agriculture and Crop Science*. IJACS/2014/7-14/1392-1405.
- Flor HH. 1956. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics*. Academic Press. 8: 29-54.
- Frohberg RC, Stack RW, Olson T, Miller JD, Mergoum, M. 2006. Registration of 'Alsen' wheat. *Crop science*, 46(5): 2311.
- Gale MD, Youssefian S, Russell GE. 1985. Dwarfing genes in wheat. *Progress in Plant Breeding*, 1: 1-35.
- Germán S, Díaz de Ackermann M, Silva P, Quincke M, Pereyra S. 2018. Manejo por resistencia a enfermedades de trigo en Uruguay. SEMINARIO INTERNACIONAL «1914-2014, un siglo de mejoramiento de trigo en La Estanzuela» 27-28-29 de agosto de 2014 INIA La Estanzuela, La Estanzuela, INIA. 241: 148-166.
- Germán S, Díaz M, Pereyra S. 2011. Royas y oídio de trigo y cebada. Pereyra S, Díaz de Ackermann M, Germán S, Cabrera K, En: Manejo de

- enfermedades en trigo y cebada. La Estanzuela: INIA (INIA Serie Técnica) 189, 200: 159-189.
- Germán S, Barcellos A, Chaves M, Kohli M, Campos P, de Viedma L. 2007. The situation of common wheat rusts in the Southern Cone of America and perspectives for control. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(6): 620-630.
- Germán S, Verges R. 2007. Roya del tallo del trigo: situación en la región y amenazas a nivel global. La Estanzuela: INIA. *Revista INIA Uruguay*, 12: 14-16.
- Gervais L, Dedryver F, Morlais JY, Bodusseau V, Negre S, Bilous M, Groos C, Trottet M. 2003. Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an European winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(6): 961-970.
- Goswami RS, Kistler HC. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5(6): 515-525.
- Graham, S., & Browne, R. A. 2009. Anther extrusion and *Fusarium* head blight resistance in European wheat. *Journal of Phytopathology*, 157(9): 580-582.
- Gunnaiah R, Kushalappa AC, Duggavathi R, Fox S, & Somers DJ. 2012. Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (*Fhb1*) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *Plos One*, 7(7), e40695.
- Guo J, Zhang X, Hou Y, Cai J, Shen X, Zhou T, Xu H, Ohm HW, Wang H, Li A, Han F, Wang H, Kong L. 2015. High-density mapping of the major FHB resistance gene *Fhb7* derived from *Thinopyrum ponticum* and its pyramiding with *Fhb1* by marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(11): 2301-2316.



- Gupta PK, Rustgi S, Mir RR. 2008. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity*, 101(1): 5.
- He Y, Zhang X, Zhang Y, Ahmad D, Wu L, Jiang P, Ma H. 2018. Molecular characterization and expression of PFT, an FHB resistance gene at the *Fhb1* QTL in wheat. *Phytopathology*, 108(6): 730-736.
- He X, Bonnett D, Singh PK, Hyles J, Spielmeier W, Dreisigacker S. 2015. Advanced wheat breeding lines combining *Fhb1* and *Sr2* in different genetic backgrounds. In Proceedings of the 9th International Wheat Conference, Sydney, Australia. 20-25.
- Herrera-Foessel SA, Singh RP, Lillemo M, Huerta-Espino J, Bhavani S, Singh S, Lan C, Calvo-Salazar V, Lagudah ES. 2014. *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(4): 781-789.
- Hilton AJ, Jenkinson P, Hollins TW, Parry DW. 1999. Relationship between cultivar height and severity of Fusarium ear blight in wheat. *Plant Pathology*, 48(2): 202-208.
- Holzapfel J, Voss HH, Miedaner T, Korzun V, Häberle J, Schweizer G, Mohler V, Zimmermann G, Hartl L. 2008. Inheritance of resistance to Fusarium head blight in three European winter wheat populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(7): 1119-1128.
- Hospital F. 2005. Selection in backcross programmes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1459): 1503-1511.
- Hospital F, Charcosset A. 1997 Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics* 147: 1469–1485.
- Ittu M, Saulescu NN, Ittu G, Moldovan M. 2002. Approaches in breeding wheat for resistance to FHB in Romania. *Petria*, 12: 67-72.

- IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium). 2018. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome by the international wheat genome sequencing consortium. *Science*, 361 p.
- Jansen C, Von Wettstein D, Schäfer W, Kogel KH, Felk A, Maier FJ. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46): 16892-16897.
- Jennings P, Coates ME, Walsh K, Turner JA, Nicholson P. 2004. Determination of deoxynivalenol-and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology*, 53(5): 643-652.
- Jiang GL. 2013. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. 45-83.
- Jin F, Zhang D, Bockus W, Baenziger PS, Carver B, Bai G. 2013. *Fusarium* head blight resistance in US winter wheat cultivars and elite breeding lines. *Crop Science*, 53(5): 2006-2013.
- Jin Y, Szabo LJ, Pretorius ZA, Singh RP, Ward R, & Fetch JrT. 2008. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease*, 92(6): 923-926.
- Jin Y, Singh RP. 2006. Resistance in US wheat to recent eastern African isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* with virulence to resistance gene *Sr31*. *Plant Disease*, 90(4): 476-480.
- Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117): 323.
- Khan MR, Doohan FM. 2009. Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain. *Biological Control*, 48(1): 42-47.

- Kim JC, Kang, HJ, Lee DH, Lee YW, Yoshizawa T. 1993. Natural occurrence of Fusarium mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11): 3798-3802.
- Klahr A, Zimmermann G, Wenzel G, Mohler V. 2007. Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on the detection of QTLs for resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat cross. *Euphytica*, 154(1-2): 17-28.
- Kohli MM, Díaz de Ackermann M. 2013. Resistance to Fusarium head blight in South American wheat germplasm. En: *Fusarium Head Blight in Latin America*. Dordrecht: Springer. 263-297.
- Kollers S, Rodemann B, Ling J, Korzun V, Ebmeyer E, Argillier O, Hinze M, Plieske J, Kulosa D, Ganai MW, Röder MS. 2013. Whole genome association mapping of Fusarium head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plos One*, 8(2): e57500.
- Kolmer JA, Garvin DF, Jin Y. 2011. Expression of a Thatcher wheat adult plant stem rust resistance QTL on chromosome arm 2BL is enhanced by *Lr34*. *Crop Science*, 51(2): 526-533.
- Kolmer JA. 2005. Tracking wheat rust on a continental scale. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4): 441-449.
- Kosová K, Chrpová J, Šíp V. 2009. Cereal resistance to Fusarium head blight and possibilities of its improvement through breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 45(3): 87-105.
- Kota R, Spielmeyer W, McIntosh RA, Lagudah ES. 2006. Fine genetic mapping fails to dissociate durable stem rust resistance gene *Sr2* from pseudo-black chaff in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112(3): 492-499.

- Lannou C. 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 50(1): 319-38.
- Lemmens M, Scholz U, Berthiller F, Dall'Asta C, Koutnik A, Schuhmacher R, Adam G, Buerstmayr H, Mesterházy A, Krska R, Ruckebauer P. 2005. The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(12): 1318-1324.
- Liu S, Pumphrey M, Gill B, Trick H, Zhang J, Dolezel J, Chalhoub B, Anderson J. 2008. Toward positional cloning of *Fhb1*, a major QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Cereal Research Communications*, 36(6): 195-201.
- Liu S, Zhang X, Pumphrey MO, Stack RW, Gill BS, Anderson JA. 2006. Complex microcolinearity among wheat, rice, and barley revealed by fine mapping of the genomic region harboring a major QTL for resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Functional & Integrative Genomics*, 6(2): 83-89.
- Liu S, Anderson JA. 2003. Marker assisted evaluation of *Fusarium* head blight resistant wheat germplasm. *Crop Science*, 43(3): 760-766.
- Lu, Q., Lillemo, M., Skinnes, H., He, X., Shi, J., Ji, F., ... & Bjørnstad, Å. 2013. Anther extrusion and plant height are associated with Type I resistance to *Fusarium* head blight in bread wheat line 'Shanghai-3/Catbird'. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(2): 317-334.
- Luizzi D, Quincke M, Condón F, Abadie T, Gatti I, Germán S. 2018. Uso del germoplasma en el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo. En: Germán S, Luizzi D. 100 años de mejoramiento de trigo en INIA La Estanzuela. Montevideo: INIA. 17-36.
- Mackill DJ, Ni J. 2001. Molecular mapping and marker-assisted selection for major-gene traits in rice. *Rice Genetics IV*. 137-151.

- Mago R, Brown-Guedira G, Dreisigacker S, Breen J, Jin Y, Singh R, Appels R, Lagudah ES, Ellis J, Dolezel J, Spielmeier, W. 2011. An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene *Sr2* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(4): 735-744.
- Matsuoka Y. 2011. Evolution of polyploid Triticum wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant and Cell Physiology*, 52(5): 750-764.
- McCartney CA, Somers DJ, Fedak G, DePauw RM, Thomas JB, Fox SL, Humphreys DG, Lukow OM, Savard ME, McCallum BD, Gilbert J, Cao W. 2007. The evaluation of FHB resistance QTLs introgressed into elite Canadian spring wheat germplasm. *Molecular Breeding*, 20(3): 209-221.
- McFadden ES. 1930. A successful transfer of emmer characters to Vulgare wheat. *Agronomy Journal*, 22(12): 1020-1034.
- McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Appels R, Xia XC. 2017. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 Supplement. *Annual Wheat Newsletter*, 53:1–20.
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF. 1995. *Wheat rusts: an atlas of resistance genes*. Clayton, Australia: CSIRO Publishing. 200 p.
- McMullen M, Bergstrom G, De Wolf E, Dill-Macky R, Hershman D, Shaner G, Van Sanford D. 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. *Plant Disease*, 96(12): 1712-1728.
- Meneely, J. P., Ricci, F., van Egmond, H. P., & Elliott, C. T. 2011. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(2): 192-203.

- Mesterházy Á. 2003. Breeding wheat for Fusarium head blight resistance in Europe. Leonard, K & Bushnell W. En: Fusarium Head Blight of Wheat and Barley. St. Paul: American Phytopathological Society. 512: 211-240.
- Mesterházy Á. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to Fusarium head blight. In Mycotoxins in Plant Disease. Dordrecht: Springer. 675-684.
- Mesterházy Á, Bartók T, Mirocha CG, Komoroczy R. 1999. Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. Plant Breeding, 118(2): 97-110.
- Miedaner T, Würschum T, Maurer HP, Korzun V, Ebmeyer E, & Reif, J. C. 2011. Association mapping for Fusarium head blight resistance in European soft winter wheat. Molecular Breeding, 28(4): 647-655.
- Miedaner T, Voss HH. 2008. Effect of dwarfing *Rht* genes on Fusarium head blight resistance in two sets of near-isogenic lines of wheat and check cultivars. Crop Science, 48(6): 2115-2122.
- Miedaner T, Wilde F, Steiner B, Buerstmayr H, Korzun V, Ebmeyer E. 2006. Stacking quantitative trait loci (QTL) for Fusarium head blight resistance from non-adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. Theoretical and Applied Genetics, 112(3): 562-569.
- Miedaner T. 1997. Breeding wheat and rye for resistance to Fusarium diseases. Plant Breeding, 116(3): 201-220.
- Miller D, Arnison PG. 1986. Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the Fusarium head blight resistant wheat cultivar Frontana. Canadian Journal of Plant Pathology, 8(2): 147-150.

- Mohler V, Singrün C. 2004. General considerations: marker-assisted selection. En: Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement, Heidelberg: Springer. 305-317.
- Moreau L, Charcosset A, Gallais A. 2004. Experimental evaluation of several cycles of marker-assisted selection in maize. *Euphytica*, 137(1): 111-118.
- Narasimhulu R, Varadarajula NN, Mallapuram SP, Govardhan G, Reddy RK, Kondreddy HR. 2013. Marker assisted selection in disease resistance breeding. *Journal of Plant Breeding and Genetics*, 1(2): 90-109.
- Niks RE, Ellis PR, Parlevliet JE. 1993. Resistance to parasites. *Plant Breeding*. 422-447.
- Niwa S, Kubo K, Lewis J, Kikuchi R, Alagu M, Ban T. 2014. Variations for Fusarium head blight resistance associated with genomic diversity in different sources of the resistant wheat cultivar ‘Sumai 3’. *Breeding science*, 64(1): 90-96.
- Njau PN, Bhavani S, Huerta-Espino J, Keller B, Singh RP. 2013. Identification of QTL associated with durable adult plant resistance to stem rust race Ug99 in wheat cultivar ‘Pavon 76’. *Euphytica*, 190(1): 33-44.
- O’Donnell, K., Ward, T. J., Aberra, D., Kistler, H. C., Aoki, T., Orwig, N., ... & Klemsdal, S. S. 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology*, 45(11): 1514-1522.
- Omrani A. 2018. Race analysis of *Puccinia graminis* f. sp. tritici led to identification of the new race TTKTK, affecting *Sr31* and *SrTmp*, in Iran [En línea] 21 enero 2019. Technical Workshop Borlaug Global Rust Initiative, Marrakech, Morocco. Disponible en: <http://www.globalrust.org/content/race-analysis-puccinia-graminis-f-sp-tritici-led-identification-new-race-ttktk-affecting>.

- Otto CD, Kianian SF, Elias EM, Stack RW, Joppa LR. 2002 Genetic dissection of a major FHB QTL in tetraploid wheat. *Plant Molecular Biology*. 48: 625–632
- Paillard S, Schnurbusch T, Tiwari R, Messmer M, Winzeler M, Keller B, Schachermayr G. 2004 QTL analysis of resistance to FHB in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109: 323–333.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*, 58(3): 409-424.
- Parlevliet JE. 1975. Partial resistance of barley to leafrust, *Puccinia hordei*. I. Effect of cultivar and development stage on latent period. *Euphytica*, 24(1): 21-27.
- Pereyra SA, Dill-Macky R. 2008. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to Fusarium head blight inoculum. *Plant Disease*. 92: 800-807.
- Pereyra SA, Vero S, Garmendia G, Cabrera M, Pianzolla MJ. 2006. Diversity of fungal populations associated with Fusarium head blight in Uruguay. En: *The Global Fusarium Initiative for International Collaboration: A Strategic Planning Workshop held at CIMMYT, El Batán, Mexico*. 35-41.
- Peterson RF, Campbell AB, Hannah AE. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Canadian Journal of Research*, 26(5): 496-500.
- Pretorius ZA, Singh RP, Wagoire WW, Payne TS. 2000. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis*. f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Disease*, 84(2): 203-203.
- Pritsch C, Muehlbauer GJ, Bushnell WR, Somers, DA, Vance, C. P. 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of



- wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2): 159-169.
- Pritsch C. 1995. Variabilidad patogénica en *Fusarium* spp. agente causal del golpe blanco del trigo. FPTA-INIA. Montevideo: INIA. Informe final 79 p.
- Pumphrey MO, Bernardo R., Anderson JA. 2007. Validating the *Fhb1* QTL for Fusarium head blight resistance in near-isogenic wheat lines developed from breeding populations. *Crop Science*, 47(1): 200-206.
- Qi LL, Pumphrey MO, Friebe B, Chen PD, Gill BS. 2008. Molecular cytogenetic characterization of alien introgressions with gene *Fhb3* for resistance to Fusarium head blight disease of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(7): 1155-1166.
- Quincke M, Pereyra S, Vázquez S, Silva P, Germán S. 2018. Hitos y perspectivas del mejoramiento genético de trigo en Uruguay. SEMINARIO INTERNACIONAL «1914-2014, un siglo de mejoramiento de trigo en La Estanzuela» 27-28-29 de agosto de 2014 INIA La Estanzuela. La Estanzuela: INIA. 241: 2-11.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponible en: <http://www.r-project.org>
- Rawat N, Pumphrey MO, Liu S, Zhang X, Tiwari VK, Ando K, Trick HN, Bockus WW, Akhunov E, Anderson JA, Gill BS. 2016. Wheat *Fhb1* encodes a chimeric lectin with agglutinin domains and a pore-forming toxin-like domain conferring resistance to Fusarium head blight. *Nature Genetics*, 48(12): 1576.
- Reis EM. 1988. Doenças do trigo III. *Giberela*. Segunda edição. Sao Paulo: EMBRAPA. 12p.
- Ribaut JM, Betrán J. 1999. Single large-scale marker-assisted selection (SLS-MAS). *Molecular Breeding*, 5(6): 531-541.

- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4): 2007-2023.
- Roelfs AP, Singh RP, Saari EE, 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. México D. F.; Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 81 p.
- Roelfs AP. 1985. Wheat and rye stem rust. En: Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control. Academic Press. 3-37.
- Rudd JC, Horsley RD, McKendry AL, Elias EM. 2001. Host plant resistance genes for Fusarium head blight. *Crop Science*, 41(3): 620-627.
- Salameh A, Buerstmayr M, Steiner B, Neumayer A, Lemmens M, Buerstmayr H. 2011. Effects of introgression of two QTL for fusarium head blight resistance from Asian spring wheat by marker-assisted backcrossing into European winter wheat on fusarium head blight resistance, yield and quality traits. *Molecular Breeding*, 28(4): 485-494.
- Sampietro DA, Díaz CG, González V, Vattuone MA, Ploper LD, Catalán CAN, Ward TJ. 2011. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1): 359-364.
- Sartori JF. 1982. Giberella. Trigo no Brasil. Campinas: Fundação Cargill. 1: 537-541.
- Sarver BA, Ward TJ, Gale LR, Broz K, Kistler HC, Aoki T, Nicholson P, Carter J, O'Donnell K. 2011. Novel Fusarium head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology*, 48(12): 1096-1107.
- Schlegel R, Korzun V. 1997. About the origin of 1RS. 1BL wheat-rye chromosome translocations from Germany. *Plant Breeding*, 116(6): 537-540.

- Schmolke M, Zimmermann G, Buerstmayr H, Schweizer G, Miedaner T, Korzun V, Ebmeyer E, Hartl, L. 2005. Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(4): 747-756.
- Schroeder HW, Christensen JJ. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53(7, 1): 831-838.
- Schweiger W, Steiner B, Vautrin S, Nussbaumer T, Siegwart G, Zamini M, Jungreithmeier F, Gratl V, Lemmens M, Mayer KFX, Bérghès H, Adam G, Buerstmayr H. 2016. Suppressed recombination and unique candidate genes in the divergent haplotype encoding *Fhb1*, a major Fusarium head blight resistance locus in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(8): 1607-1623.
- Shanti ML, George MLC, Cruz CV, Bernardo MA, Nelson RJ, Leung H, Reddy N, Sridhar R. 2001. Identification of resistance genes effective against rice bacterial blight pathogen in eastern India. *Plant Disease*, 85(5): 506-512.
- Sharp PJ, Johnston S, Brown G, McIntosh RA, Pallotta M, Carter M, Bariana HS, Katkar S, Lagudah ES, Singh RP, Khairallah MM, Potter R, Jones GK. (2001). Validation of molecular markers for wheat breeding. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52(12): 1357-1366.
- Sheen SJ, Ebeltoft DC, Smith GS. 1968. Association and Inheritance of "Black Chaff" and Stem Rust Reactions in Conley Wheat Crosses 1. *Crop Science*, 8(4): 477-480.
- Shen X, Ohm H. 2006. Fusarium head blight resistance derived from *Lophopyrum elongatum* chromosome 7E and its augmentation with *Fhb1* in wheat. *Plant Breeding*, 125(5): 424-429.
- Shen X, Zhou M, Lu W, Ohm H. 2003. Detection of Fusarium head blight resistance QTL in a wheat population using bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(6): 1041-1047.

- Shi JR, Xu DH, Yang HY, Lu QX, Ban T. 2008. DNA marker analysis for pyramided of Fusarium head blight (FHB) resistance QTLs from different germplasm. *Genetics*, 133(1): 77-84.
- Singh RP, Hodson DP, Jin Y, Lagudah ES, Ayliffe MA, Bhavani S, Basnet BR. 2015. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology*, 105(7): 872-884.
- Singh S, Singh RP, Bhavani S, Huerta-Espino J, Eugenio LVE. 2013. QTL mapping of slow-rusting, adult plant resistance to race Ug99 of stem rust fungus in PBW343/Muu RIL population. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(5): 1367-1375.
- Singh RP. 2012. Pros and cons of utilizing major, race-specific resistance genes versus partial resistance in breeding rust resistant wheat. In *Proceedings, Borlaug Global Rust Initiative, 2012 Technical Workshop, September 1-4, Beijing, China: Oral presentations. Borlaug Global Rust Initiative.* 57-65.
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Bhavani S, Njau P, Herrera-Foessel S, Singh PK, Singh S, Govindan V. 2011. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annual review of phytopathology*, 49: 465-481.
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Njau P, Wanyera R, Herrera-Foessel SA, Ward RW. 2008. Will stem rust destroy the world's wheat crop? *Advances in Agronomy*, 98: 271-309.
- Singh RP, Hodson DP, Jin Y, Huerta-Espino J, Kinyua MG, Wanyera R, Njau P, Ward RW. 2006. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. *CAB reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources*, 1(54): 1-13.

- Singh RP, Huerta-Espino J, Williams HM. 2005. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29(2): 121-127.
- Singh S, Sidhu JS, Huang N, Vikal Y, Li Z, Brar DS, Dhaliwal HS, Khush GS. 2001. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(6-7): 1011-1015.
- Singh RP, Ma H, Rajaram S. 1995. Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Frontana. *Plant Disease*, 79(3): 238-240.
- Skinnes, H., Semagn, K., Tarkegne, Y., Marøy, A. G., & Bjørnstad, Å. 2010. The inheritance of anther extrusion in hexaploid wheat and its relationship to *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol content. *Plant Breeding*, 129(2): 149-155.
- Snijders CHA. 1990a. Genetic variation for resistance to *Fusarium* head blight in bread wheat. *Euphytica*, 50(2): 171-179.
- Snijders CHA. 1990b. The inheritance of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Euphytica*, 50(1): 11-18.
- Somers DJ, Kirkpatrick R, Moniwa M, Walsh A. 2003. Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome*, 46(3): 431-437.
- Spielmeyer W, Sharp PJ, Lagudah ES. 2003. Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Science*, 43(1): 333-336.
- Srinivasachary N, Gosman N, Steed A, Simmonds J, Leverington-Waite M, Wang Y, Snape J, Nicholson P. 2008. Susceptibility to *Fusarium* head blight is associated with the *Rht-D1b* semi-dwarfing allele in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(8): 1145-1153.

- Starkey, D. E., Ward, T. J., Aoki, T., Gale, L. R., Kistler, H. C., Geiser, D. M., ... & O'Donnell, K. (2007). Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 44(11): 1191-1204.
- Steiner B, Lemmens M, Griesser M, Scholz U, Schondelmaier J, Buerstmayr H. 2004. Molecular mapping of resistance to *Fusarium* head blight in the spring wheat cultivar Frontana. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(1): 215-224.
- Stubbs RW, Prescott JM, Saari EE, Dubin HJ, 1986. Manual de metodología sobre las enfermedades e los cereales. Méxoco D. F.: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 46 p.
- Su, Z., Bernardo, A., Tian, B., Chen, H., Wang, S., Ma, H., ... & Trick, H. 2019. A deletion mutation in TaHRC confers *Fhb1* resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Nature Genetics*, 1 p.
- Su, Z., Jin, S., Zhang, D., & Bai, G. 2018. Development and validation of diagnostic markers for *Fhb1* region, a major QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(11): 2371-2380.
- Talas F, Longin F, Miedaner, T. 2011. Sources of resistance to *Fusarium* head blight within Syrian durum wheat landraces. *Plant Breeding*, 130(3): 398-400.
- Turkington TK, Petran A, Yonow T, Kriticos DJ. 2014. *Fusarium graminearum*. HarvestChoice Pest Geography. St. Paul, MN: InSTePP-Harvest Choice. 7 p.
- Umpiérrez-Failache M, Garmendia G, Pereyra S, Rodríguez-Haralambides A, Ward TJ, Vero S. 2013. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1): 135-140.

- van der Lee, T., Zhang, H., van Diepeningen, A., & Waalwijk, C. 2015. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review. Food Additives & Contaminants: Part A, 32(4): 453-460.
- van Eeuwijk FV, Mesterházy A, Kling CI, Ruckebauer P, Saur L, Buerstmayr H, Lemmens M, Keizer LC, Maurin N, Snijders, CHA. 1995. Assessing non-specificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with European strains of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. nivale* using a multiplicative model for interaction. Theoretical and Applied Genetics, 90(2): 221-228.
- van Ginkel MV, Schaar WVD, Zhuping Y, Rajaram, S. 1996. Inheritance of resistance to scab in two wheat cultivars from Brazil and China. Plant Disease, 80(8): 863-867.
- Vanderplank JE. 1968. Disease Resistance in Plants. Academic Press. New York, London. Plett JM, Kempainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011. A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. Current Biology, 21: 1197-1203.
- Verges VL, Van Sanford D, Brown-Guedira G. 2006. Heritability estimates and response to selection for *Fusarium* head blight resistance in soft red winter wheat. Crop science, 46(4): 1587-1594.
- Voss HH, Holzapfel J, Hartl L, Korzun V, Rabenstein F, Ebmeyer E, Coester H, Kempf H, Miedaner T. 2008. Effect of the *Rht-D1* dwarfing locus on *Fusarium* head blight rating in three segregating populations of winter wheat. Plant Breeding, 127(4): 333-339.
- Waldron BL, Moreno-Sevilla B, Anderson JA, Stack RW, Frohberg RC. 1999. RFLP mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. Crop Science, 39(3): 805-811.

- Walker D, Boerma HR, All J, Parrott W. 2002. Combining cry1Ac with QTL alleles from PI 229358 to improve soybean resistance to lepidopteran pests. *Molecular Breeding*, 9(1): 43-51.
- Wanyera R, Kinyua MG, Jin Y, Singh RP. 2006. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on *Sr31* in wheat in Eastern Africa. *Plant Disease*, 90(1): 113-113.
- Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E, Clear RM, Rooney AP, O'Donnell K, Gaba D, Patrick S, Starkey DE, Gilbert J, Geiser DM, Nowicki TW. 2008. An adaptive evolutionary shift in fusarium head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 473-484.
- Watson, A., Ghosh, S., Williams, M. J., Cuddy, W. S., Simmonds, J., Rey, M. D., ... & Adamski, N. M. 2018. Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nature Plants*, 4(1): 23.
- West JS, Holdgate S, Townsend JA, Edwards SG, Jennings P, Fitt BD. 2012. Impacts of changing climate and agronomic factors on fusarium ear blight of wheat in the UK. *Fungal Ecology*, 5(1): 53-61.
- Wilcoxson RD, Busch RH, Ozmon EA. 1992. Fusarium head blight resistance in spring wheat cultivars. *Plant Disease (USA)*.76: 658-661.
- Xiao J, Jin X, Jia X, Wang H, Cao A, Zhao W, Pei H, Xue Z, He L, Chen Q, Wang X. 2013. Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to resistance against Fusarium head blight in wheat landrace Wangshuibai. *BMC Genomics*, 14(1): 197.
- Xu Y. 2010. *Molecular Plant Breeding*. Wallingford: CABI. 734 p.
- Xu X, Nicholson P. 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 83-103.



- Xu X. 2003. Effects of environmental conditions on the development of Fusarium ear blight. En: Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi. Dordrecht: Springer. 683-689.
- Xue S, Xu F, Tang M, Zhou Y, Li G, An X, Lin F, Xu H, Jia H, Zhang L, Kong Z, Ma Z, Kong Z. 2011. Precise mapping *Fhb5*, a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics, 123(6): 1055-1063.
- Xue S, Li G, Jia H, Lin F, Cao Y, Xu F, Tang M, Wang Y, Wu X, Zhang Z, Zhang L, Kong Z, Ma Z. 2010. Marker-assisted development and evaluation of near-isogenic lines for scab resistance QTLs of wheat. Molecular Breeding, 25(3): 397-405.
- Yang Z, Gilbert J, Fedak G, Somers DJ. 2005. Genetic characterization of QTL associated with resistance to Fusarium head blight in a doubled-haploid spring wheat population. Genome, 48(2): 187-196.
- Yang ZP, Gilbert J, Somers DJ, Fedak G, Procinier JD, McKenzie IH. 2003. Marker assisted selection of Fusarium head blight resistance genes in two doubled haploid populations of wheat. Molecular Breeding, 12(4): 309-317.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T. J., Aoki, T., Kistler, H. C., & O'Donnell, K. (2009). A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. Mycologia, 101(6): 841-852.
- Yuen GY, Schoneweis SD. 2007. Strategies for managing Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. International Journal of Food Microbiology, 119(1-2): 126-130.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research, 14(6): 415-421.

- Zeller FJ. 1973. 1B/1R wheat-rye chromosome substitutions and translocations. En: Proceedings of the fourth international wheat genetics symposium. Alien genetic material. Missouri: University of Missouri. 209-221.
- Zhang X, Rouse MN, Nava IC, Jin Y, Anderson JA. 2016. Development and verification of wheat germplasm containing both *Sr2* and *Fhb1*. *Molecular Breeding*, 36(7): 85.
- Zhang H, Van der Lee T, Waalwijk C, Chen W, Xu J, Xu J, Zhang H, Feng J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *Plos One*, 7(2): e31722.
- Zhang JB, Li HP, Dang FJ, Qu B, Xu YB, Zhao CS, Liao YC. 2007. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycological Research*, 111(8): 967-975.
- Zhou WC, Kolb FL, Bai GH, Domier LL, Boze LK, Smith NJ. 2003. Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breeding*, 122(1): 40-46.
- Zhou W, Kolb FL, Bai G, Shaner G, Domier LL. 2002. Genetic analysis of scab resistance QTL in wheat with microsatellite and AFLP markers. *Genome*, 45(4): 719-727.