

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desenvolvimento de marcadores moleculares para uso em  
melhoramento genético assistido por marcadores visando aumentar a  
resistência à ferrugem foliar no trigo duro de inverno dos Estados Unidos**

**Kênderson Gabriel Gonçalves dos Reis**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte  
dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo pela Escola Superior de Agricultura "Luiz  
de Queiroz" (ESALQ-USP)

**Piracicaba**  
**2025**



**Kênderson Gabriel Gonçalves dos Reis**

**Desenvolvimento de marcadores moleculares para uso em melhoramento genético assistido por marcadores visando aumentar a resistência à ferrugem foliar no trigo duro de inverno dos Estados Unidos**

Orientadoras:

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **GIOVANA GHISLENI RIBAS**

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **MERIEM AOUN**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP)

**Piracicaba  
2025**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha mãe, Lucilene Ferreira Gonçalves, por sua força, dedicação e coragem ao criar quatro filhos exercendo, simultaneamente, os papéis de mãe e pai. Sua resiliência e amor incondicional foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Estendo meus agradecimentos aos meus avós, Ivanir e Lázaro, que, apesar das dificuldades de criarem sete filhos, ainda encontraram, na velhice, disposição, carinho e paciência para participar ativamente da minha formação e crescimento.

Manifesto minha profunda gratidão à minha orientadora, Dra. Giovana Ribas, por seu acolhimento, ensinamentos, confiança e constante inspiração ao longo desta trajetória. Agradeço também à Dra. Meriem Aoun e a toda a sua equipe de pós-graduação, pelo suporte, pela troca de conhecimentos e pela receptividade em seu laboratório na Oklahoma State University, onde pude desenvolver este projeto com muito aprendizado.

As minhas amigas Cassielle, Patricia, Gabriely, Nicolle, Sabrina e Débora, deixo meu sincero agradecimento pelo companheirismo e apoio durante minha jornada para o desenvolvimento desse projeto. Expresso, ainda, uma gratidão especial à minha colega e amiga de graduação, Ellen Grous, cuja presença tornou essa caminhada mais leve e enriquecedora, além de ter contribuído, mesmo que de longe, para o desenvolvimento do meu trabalho.

Por fim, agradeço de maneira especial à Casa do Estudante Universitário (CEU), que me proporcionou moradia, estrutura e suporte essencial ao longo da minha graduação. Sem essa instituição, a concretização de ter um diploma não seria possível.

*Kenderson Gabriel Gonçalves dos Reis*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Importância econômica e alimentar do trigo.....	11
2.2 fatores bióticos e abióticos que limitam a produção de trigo nos EUA.....	12
2.3 ferrugem da folha.....	13
2.4 Melhoramento genético para resistência à ferrugem da folha.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Avaliações fenotípicas para determinação de fontes resistentes à ferrugem da folha.....	17
4.1.1. Seleção de genótipos de trigo de inverno duro e plantio.....	17
4.1.2. Inoculação da ferrugem da folha e avaliação.....	17
4.2 Desenvolvimento e validação de marcadores KASP para uso no melhoramento de resistência à ferrugem da folha.....	19
4.2.1 Desenho de marcadores KASP.....	19
4.2.2 Extração de DNA.....	22
4.2.3 Reações de PCR e condições para marcadores KASP.....	24
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Avaliações fenotípicas identificaram genótipos resistentes à ferrugem da folha.....	27
5.2. Desenvolvimento do marcador KASP para aumentar a resistência à ferrugem foliar.....	27
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS.....	33

## RESUMO

### **Desenvolvimento de marcadores moleculares para uso em melhoramento genético assistido por marcadores visando aumentar a resistência à ferrugem foliar no trigo duro de inverno dos EUA**

A ferrugem da folha é uma das principais doenças do trigo, reduzindo a produtividade ao comprometer a capacidade fotossintética da planta. O desenvolvimento de cultivares resistentes, especialmente por meio do melhoramento assistido por marcadores, representa uma alternativa eficiente e precisa para o controle da ferrugem da folha. Este estudo teve como objetivo: 1) identificar linhagens e cultivares resistentes à ferrugem da folha na fase de plântula frente à raça do patógeno MJBIG e 2) desenvolver e validar marcadores Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) de fácil uso por melhoristas, a partir de dois marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), *SID\_6975458* e *S3B\_767502837*, previamente identificados como associados à resistência à ferrugem da folha em trigo duro de inverno. Para o objetivo 1, um total de 619 genótipos de trigo duro de inverno foram avaliados quanto às suas reações de plântula contra a raça MJBIG do patógeno da ferrugem da folha sob condições controladas de casa de vegetação. A fenotipagem mostrou que 25%, 27% e 48% dos genótipos foram resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis à raça MJBIG, respectivamente. Para o objetivo 2, os marcadores KASP desenvolvidos para os SNPs *SID\_6975458* e *S3B\_767502837* diferenciaram de forma clara os genótipos resistentes e suscetíveis, demonstrando seu potencial de uso no melhoramento. Nossos resultados reforçam a aplicabilidade de marcadores KASP para apoiar o melhoramento genético do trigo e o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças.

**Palavras-chave:** Genotipagem; Fenotipagem; Melhoramento; Marcadores KASP.

## ABSTRACT

### **Development of molecular markers for use in marker-assisted breeding to enhance leaf rust resistance in U.S. hard winter wheat**

Leaf rust is one of the major wheat diseases, reducing yield by compromising the photosynthetic ability of the plant. The development of resistant cultivars, particularly through marker-assisted breeding, represents an efficient and precise alternative for leaf rust control. This study aimed to 1) identify resistant lines and cultivars to leaf rust at the seedling stage against the pathogen race MJBIG and 2) develop and validate breeder-friendly Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) markers from two single nucleotide polymorphism (SNP) markers, *S1D\_6975458* and *S3B\_767502837*, which were previously identified to be associated with leaf rust resistance in hard winter wheat. For objective 1, a total of 619 hard winter wheat genotypes were evaluated for their seedling reactions against the leaf rust pathogen race MJBIG under controlled greenhouse conditions. The phenotyping showed that 25%, 27%, and 48% of the genotypes were resistant, moderately resistant, and susceptible to race MJBIG, respectively. For objective 2, the designed KASP markers for the SNPs *S1D\_6975458* and *S3B\_767502837* clearly differentiated between resistant and susceptible genotypes, demonstrating their potential use in breeding. Our results reinforce the applicability of KASP markers to support wheat genetic improvement and the development of cultivars that are disease resistant.

**Keywords:** Phenotyping, Genotyping; Breeding; KASP markers.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos cereais mais amplamente cultivados e consumidos no mundo, desempenhando um papel estratégico na segurança alimentar global. Sua ampla adaptabilidade e importância na dieta humana o tornam essencial tanto em países em desenvolvimento quanto em economias agrícolas consolidadas. Nos Estados Unidos, o trigo ocupa uma posição relevante dentro do sistema de produção de cereais, servindo como uma importante fonte de renda para agricultores e para o setor industrial. Entretanto, apesar dos avanços significativos nas últimas décadas, a produção de trigo não acompanhou o ritmo do aumento da demanda. A produtividade do trigo é reduzida devido a diversos estresses bióticos e abióticos. Entre os fatores bióticos, as doenças fúngicas estão entre as principais limitações para a produção. A ferrugem da folha, causada pelo fungo *Puccinia triticina*, destaca-se por sua ampla distribuição geográfica (KOLMER, 2013), pela alta variabilidade patogênica e pela capacidade de reduzir severamente a produtividade. O ciclo de vida do patógeno, caracterizado por alta capacidade de reinfeção e pela dispersão de urediniosporos pelo vento, torna o controle químico desafiador e aumenta a dependência de cultivares resistentes como principal estratégia de mitigação.

O melhoramento genético de plantas é, portanto, essencial para reduzir perdas e garantir a sustentabilidade da produção de trigo (PAUX, 2022). A seleção assistida por marcadores (MAS) acelera o processo de melhoramento ao identificar alelos resistentes, aumentando a precisão da seleção e reduzindo custos. Com os avanços nos estudos de mapeamento genético, diversos marcadores SNP foram identificados como associados à resistência à ferrugem da folha. No entanto, marcadores SNP não podem ser utilizados diretamente na seleção assistida por marcadores e precisam ser convertidos em marcadores baseados em PCR, como os marcadores KASP, amplamente empregados em programas de melhoramento.

Nesse contexto, o presente projeto se justifica pelo impacto da ferrugem da folha na produtividade e pela crescente demanda por ferramentas capazes de superar as limitações dos métodos convencionais de melhoramento. O desenvolvimento e a validação de marcadores KASP associados à resistência permitirão maior precisão no processo seletivo, aprimorando estratégias de manejo integrado e impulsionando o desenvolvimento de cultivares com resistência mais duradoura. Além disso, ao integrar dados genotípicos e fenotípicos, este estudo contribui para o avanço do melhoramento visando à resistência à ferrugem da folha.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância econômica e alimentar do trigo

O trigo (*Triticum aestivum L.*) é um componente fundamental da nutrição humana em escala global, considerando a crescente demanda alimentar da população, e está presente em uma ampla variedade de produtos alimentícios. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) relatou que o consumo global médio anual de trigo per capita é de aproximadamente 67,6 kg, representando cerca de 45,3% do consumo total de cereais (FAO, 2025). Embora apresente menor concentração de proteínas em comparação com outros cereais, o grão de trigo desempenha um papel importante na nutrição humana e animal, especialmente em países menos desenvolvidos, onde pão e massas estão entre os principais elementos da dieta (SHEWRY, 2009). Segundo Erenstein et al. (2022), o trigo é uma importante fonte de fibras alimentares, minerais, vitamina B e outros micronutrientes, além de ser uma excelente fonte de proteína vegetal. O trigo também apresenta ampla adaptabilidade a diferentes condições de cultivo e elevada demanda, reforçando seu papel central nos sistemas de produção agrícola.

Nos Estados Unidos (EUA), o trigo é uma das principais culturas agrícolas. Existem diversas classes de trigo adaptadas a diferentes condições climáticas e finalidades econômicas. Na safra 2024/25, os produtores norte-americanos colheram cerca de 2 bilhões de bushels de trigo, incluindo trigo de inverno, trigo durum e trigo de primavera, provenientes de uma área de aproximadamente 38,5 milhões de acres (USDA – Economic Research Service, 2025). Embora o trigo seja uma cultura importante nos EUA, tem ocorrido uma redução progressiva na área cultivada no país nos últimos anos (Figura 1). Esse declínio tem sido causado por diversos fatores, incluindo a rentabilidade da cultura em comparação com outras amplamente plantadas no país, como soja e milho. Enquanto os Estados Unidos vêm enfrentando uma queda na produção de trigo, outros países têm apresentado um aumento significativo na produção, como China, Índia, Rússia e a União Europeia.

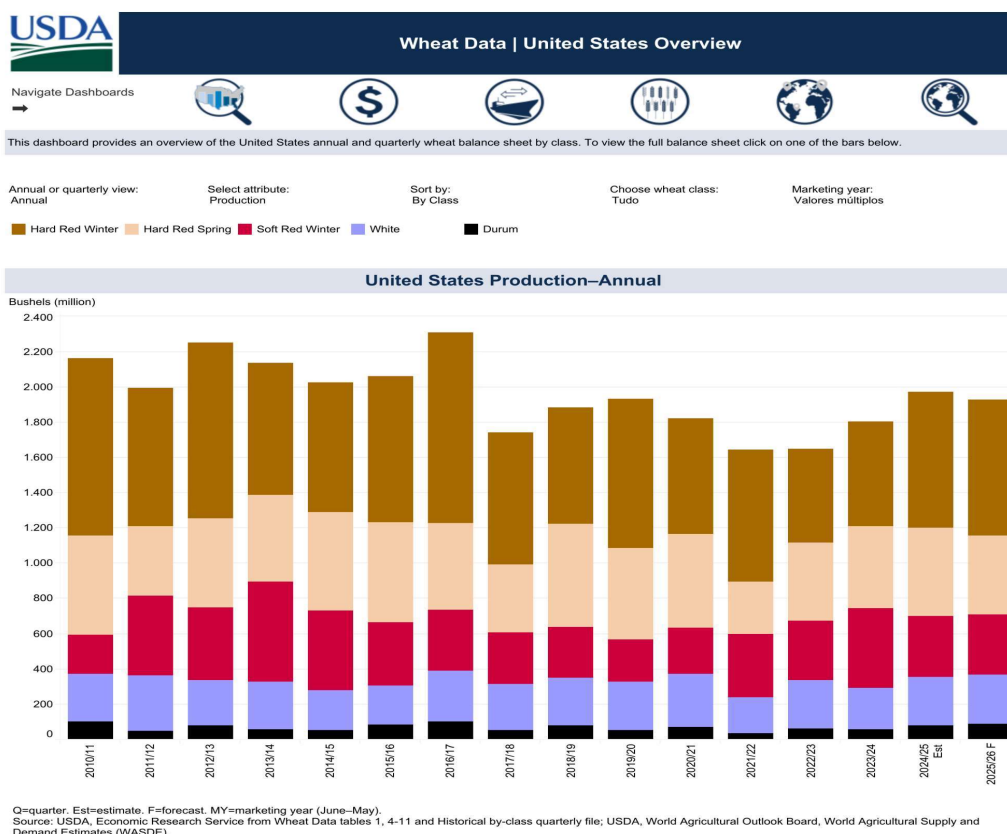


Figura 1. Produção de trigo nos Estados Unidos nos últimos 15 anos.

Fonte: USDA (2025)

## 2.2 fatores bióticos e abióticos que limitam a produção de trigo nos EUA

A seca e o calor são os principais fatores abióticos que limitam a produção de trigo nos Estados Unidos. Variações na precipitação e períodos de estiagem podem reduzir os rendimentos, especialmente nas regiões do Meio-Oeste e das Great Plains, que são historicamente vulneráveis ao estresse hídrico. De acordo com o USDA (2025), mudanças climáticas, como o aumento da temperatura média e a irregularidade das chuvas, podem afetar diretamente a produtividade agrícola ao alterar a disponibilidade de água para as plantas, além de modificar a pressão de pragas e doenças. Além disso, o relatório Wheat Outlook do USDA (2025) indicou que aproximadamente 24% da produção de trigo de inverno estava em áreas afetadas pela seca, reforçando o impacto negativo da variabilidade climática sobre a produtividade da cultura. Ademais, quando o trigo é submetido a cerca de 40% de estresse hídrico, ocorre uma perda de aproximadamente 20% de sua capacidade produtiva (DARYANTO et al., 2016). Zhao et al. (2022) também relataram que ventos secos exercem um efeito altamente negativo sobre as plantas de trigo, pois danificam estruturas

responsáveis pelo transporte de nutrientes às espigas, resultando em flores estéreis e, conseqüentemente, menor produtividade.

Outros fatores que têm tido grande impacto sobre o trigo nos Estados Unidos são os fatores bióticos, como pragas, patógenos e plantas daninhas, que influenciam diretamente o desenvolvimento e a produtividade da cultura. Esses organismos interagem com as plantas, competindo por recursos ou causando danos. As doenças podem reduzir a produção de grãos em até 18%, enquanto, com as estratégias de manejo atualmente utilizadas, as perdas reais são próximas de 13% (OERKE, 2006). De acordo com o estudo de Kauppi et al. (2021), doenças fúngicas podem reduzir a produtividade do trigo em cerca de 500 kg ha<sup>-1</sup>, o que representa perdas anuais significativas para a cultura.

O uso de variedades de trigo resistentes tem reduzido significativamente os danos causados por pragas e doenças, contribuindo para maiores rendimentos e menor dependência de pesticidas (SHARMA et al., 2024). O desenvolvimento e a adoção de estratégias integradas de manejo de pragas e doenças, especialmente aquelas baseadas em resistência genética, são essenciais para mitigar perdas e garantir a estabilidade da produção de trigo.

### **2.3 ferrugem da folha**

A ferrugem da folha (Figura 2), causada por *Puccinia triticina*, é uma das doenças fúngicas mais comuns e economicamente significativas que afetam o trigo em escala global (HUERTA-ESPINO, 2011). Ela reduz a área fotossintética funcional da planta, comprometendo o desenvolvimento vegetal e a produtividade de grãos. Nos Estados Unidos, as perdas devido à ferrugem da folha geralmente variam entre 1-5% (USDA, 2025). A *Puccinia triticina* pode ser amplamente disseminada por grandes áreas geográficas por meio do vento e apresenta elevada diversidade de virulência (KOLMER, 2013).



**Figura 2.** Uredínios da ferrugem foliar em folhas de trigo.

Foto de Kenderson Reis (2025).

A *Puccinia triticina* é um fungo heterotrófico e macrocíclico, que requer dois hospedeiros distintos para completar seu ciclo de vida e possui cinco estágios de esporos. O hospedeiro primário é o trigo (ciclo assexual) e o hospedeiro alternativo é *Thalictrum* spp. (ciclo sexual) (KOLMER, 2013). No entanto, *Thalictrum* spp. na América do Norte é resistente à ferrugem da folha, de modo que o fungo se reproduz apenas de forma assexual.

O fungo é mantido quase exclusivamente por urediniósporos dicarióticos, que reinfectam continuamente as plantas de trigo ao longo da safra, completando seu ciclo apenas por meio de infecções repetidas no hospedeiro primário, o trigo. Nos Estados Unidos, os urediniósporos são disseminados pelos ventos do sul (conhecidos como *Puccinia* pathway) e podem contaminar grandes áreas geográficas, desde o Texas até Montana (ROELFS, 1989; BOLTON et al., 2008). No final da safra, teliósporos (esporos de resistência) são formados nos tecidos senescentes do trigo.

#### **2.4 Melhoramento genético para resistência à ferrugem da folha**

Perante essa ameaça constante, o melhoramento genético, tem se consolidado como uma estratégia que visa eficiência, viabilidade econômica e a sustentabilidade para mitigar danos, proporcionando cultivares resistentes e reduzindo a dependência de fungicidas.

Dentre os vários métodos de melhoramento genético, destaca-se a seleção assistida por marcadores (Marker-Assisted Selection - MAS), a qual possibilita identificar alelos de interesse diretamente a nível do Ácido Desoxirribonucleico (DNA). A seleção assistida por marcadores apresenta maior eficiência temporal, possibilitando a identificação precisa de genes de resistência, ao contrário dos métodos convencionais de melhoramento, que demoram anos (WANG; LI, 2024). A relevância da MAS para resistência à ferrugem também é evidenciada em estudos recentes que identificaram marcadores SNP fortemente ligados a genes de resistência, como o Lr16 (KASSA et al., 2017), e avaliaram a eficácia de diferentes estratégias de seleção, comparando MAS com seleção genômica em populações híbridas (BEUKERT et al., 2020). Além disso, a piramidização de genes de resistência, por meio de MAS, tem sido usada com sucesso para combinar múltiplos genes Lr, visando aumentar a durabilidade da resistência (PLANT SCIENCE JOURNAL, 2023).

Outro estudo recente que evidencia essa eficiência, é o de Lakkakula *et al.* (2025) onde pode-se identificar 59 SNPs fortemente associados à resposta à ferrugem da folha em trigo “*hard winter*”, por meio de mapeamento por associação genômica (GWAS), sendo 20 deles provavelmente correspondentes a novos loci de resistência. Portanto, o melhoramento genético, em particular a seleção assistida por marcadores, constitui uma abordagem estratégica e eficiente para o desenvolvimento de cultivares de trigo com resistência às ferrugens. Essa estratégia promove a sustentabilidade da produção agrícola ao reduzir a dependência de fungicidas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Esse projeto tem por objetivo desenvolver e validar marcadores moleculares do tipo KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) a partir de SNPs previamente identificados por estudos de associação genômica ampla (GWAS), visando à seleção assistida para resistência à ferrugem da folha (*Puccinia triticina*) em genótipos de trigo.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Identificar fontes de resistência à ferrugem da folha em genótipos de trigo de inverno duro por meio de avaliação fenotípica.
2. Desenvolver e validar marcadores KASP (PCR Alélica Competitiva Específica) derivados de SNPs associados à resistência à ferrugem da folha para possível uso em seleção assistida por marcador.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório “*Small Grains Pathology Laboratory*” do Departamento de Entomologia e Fitopatologia da Universidade Estadual de Oklahoma (OSU), em Stillwater, Oklahoma, Estados Unidos, entre Agosto e Dezembro de 2025.

### 4.1. Avaliações fenotípicas para determinação de fontes resistentes à ferrugem da folha

#### 4.1.1. Seleção de genótipos de trigo de inverno duro e plantio

Um total de 619 genótipos foram utilizados, compostos por 565 linhas de melhoramento do programa de trigo da OSU e um painel histórico de 54 cultivares dos programas de melhoramento de trigo da OSU e da Kansas State University. Esses materiais foram semeados em bandejas (Figura 3a) contendo substrato comercial ‘Ready-Earth’ (Sun Gro) (Figura 3b), suplementado com o fertilizante de liberação lenta Osmocote (Figura 3c). Aproximadamente 4 a 5 sementes por genótipo foram colocadas em cada célula das bandejas de 72 células, e cada posição foi individualmente rotulada com o número do genótipo correspondente.

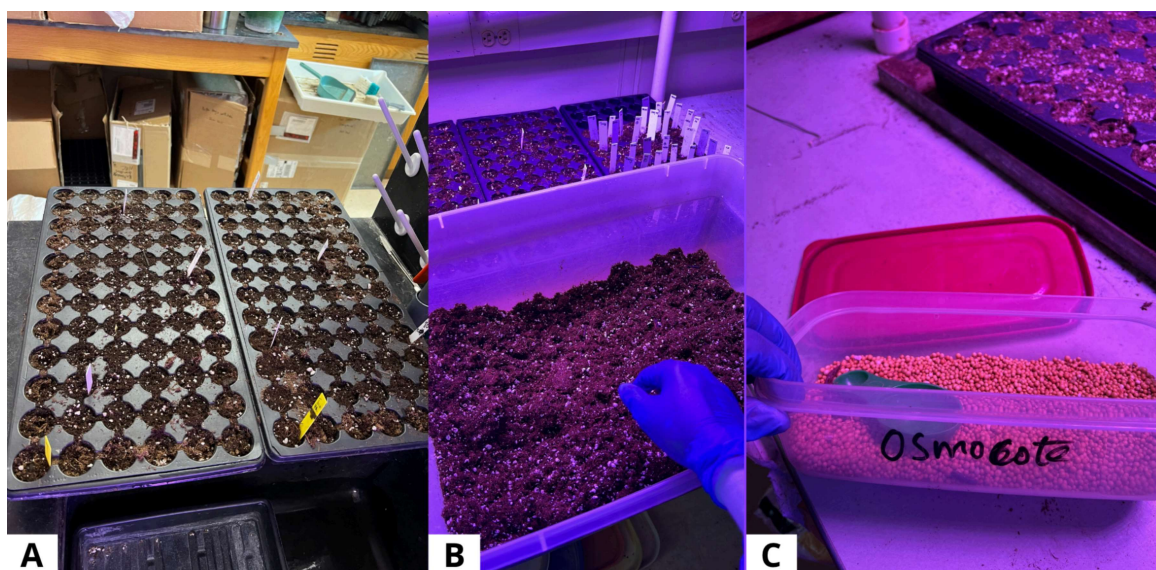


Figura 3. (a) Bandejas utilizadas para semear os genótipos selecionados; (b) Substrato comercial ‘Ready-Earth’ utilizado para o plantio; (c) Fertilizante de liberação lenta Osmocote adicionado ao solo.

#### 4.1.2. Inoculação da ferrugem da folha e avaliação

As plantas foram mantidas na estufa a uma temperatura de 20°C com fotoperíodo de 16 horas. As mudas receberam semanalmente fertilização com Jack’s Classic All-Purpose (20-20-20). Quando as plantas atingiram o estágio da primeira folha, cerca de 9 a 11 dias

após a semeadura, foram inoculadas com urediniósporos do patógeno da ferrugem da folha diluídos em óleo mineral Soltrol 170, na concentração de 0,01 g/mL. O inóculo foi aplicado utilizando um sistema de bomba de ar pressurizado, conforme descrito por Aoun et al. (2016) e Lakkakula et al. (2025). Após a inoculação, as plantas foram deixadas para secar por aproximadamente 30 minutos e, em seguida, colocadas em uma câmara de umidade no escuro durante a noite.

Posteriormente, as plantas foram retornadas à estufa e mantidas com irrigação diária até o dia da avaliação da ferrugem da folha. A pontuação da doença foi realizada de 10 a 12 dias após a inoculação (Figura 4a), sendo que cada planta foi cuidadosamente avaliada segundo uma escala de 0 a 4 descrita por Stakman et al. (1962). Esta escala classifica os tipos de infecção pela ferrugem da folha de “0” a “4”, onde “0” representa ausência de sintomas visíveis e “4” indica a presença de grandes uredínias sem necrose ou clorose, refletindo a maior severidade da doença e, conseqüentemente, plantas suscetíveis (Figura 4b, c).

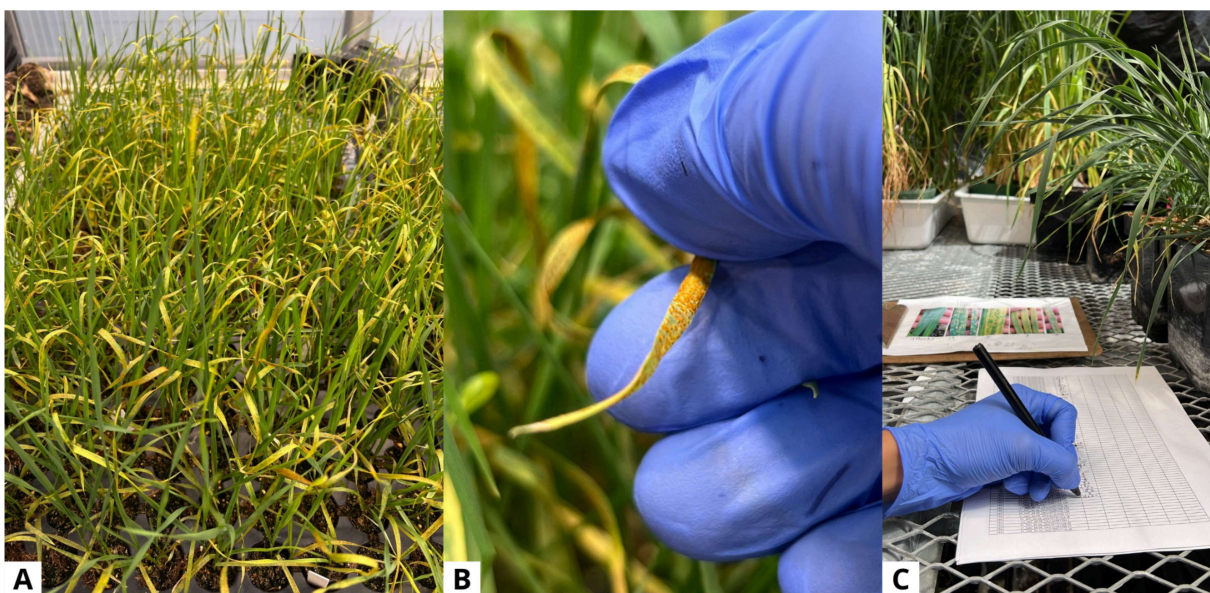


Figura 4. (a) Plantas exibindo sintomas de ferrugem da folha; (b) Grandes uredínias observadas em folhas infectadas; e (c) registro das reações da doença.

Plantas com pontuação da doença maior ou igual a 3 ( $\geq 3$ ) foram classificadas como suscetíveis. Plantas com pontuação igual a 2 foram classificadas como moderadamente resistentes, enquanto aquelas com pontuação inferior a 2 foram consideradas altamente resistentes. Além disso, plantas que apresentaram qualquer variação visual no tamanho das uredínias foram anotadas com um “+” ou “-” ao lado da pontuação atribuída, conforme proposto por Kolmer (2013) (Figura 5). Para a análise dos dados, a escala de 0-4 foi convertida para uma escala linearizada de 0-9, conforme descrito por Zhang et al. (2014),

sendo que pontuações de 0-3 foram classificadas como altamente resistentes, 4-6 como moderadamente resistentes e 7-9 como suscetíveis.



Figura 5. Representação da escala de ferrugem da folha. Foto de James A. Kolmer, USDA-ARS.

## 4.2 Desenvolvimento e validação de marcadores KASP para uso no melhoramento de resistência à ferrugem da folha

### 4.2.1 Desenho de marcadores KASP

Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) utilizados neste estudo foram previamente identificados e selecionados com base no Estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS) para resistência à ferrugem da folha em trigo de inverno duro, realizado no “*Small Grains Pathology Laboratory*” da OSU. Entre os SNPs significativos, *SID\_6975458* e *S3B\_767502837* foram selecionados para o desenvolvimento de marcadores KASP.

A plataforma Persephone (PersephoneSoft) foi utilizada para obter as sequências flanqueadoras dos SNPs, com base no genoma referência Wheat Chinese Spring IWGSC RefSeq v2.1 (Zhu et al., 2021). As sequências flanqueadoras dos SNPs foram extraídas considerando uma janela de 200 pares de bases antes e depois do SNP alvo. Essas informações são essenciais para o desenvolvimento subsequente dos marcadores, pois permitem a identificação dos nucleotídeos adjacentes para a elaboração de primers específicos para o locus (Figura 6).

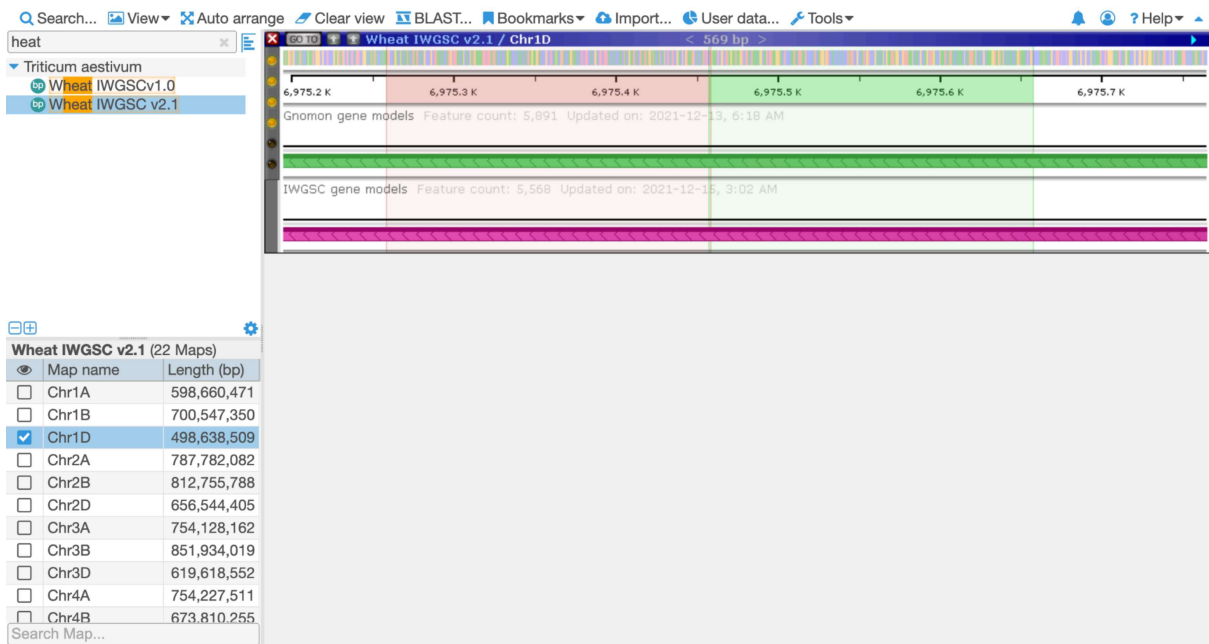


Figura 6. Interface da plataforma Persephone (*PersephoneSoft*) utilizada para obter as seqüências flanqueadoras do SNP alvo.

Subsequentemente, as seqüências obtidas foram alinhadas ao genoma referência do trigo utilizando a ferramenta BLAST do GrainGenes (Figura 7), empregando parâmetros padrão e considerando apenas alinhamentos com alta similaridade (valor  $E < 1e-05$ ). Com base nos resultados obtidos, foi identificado um polimorfismo consistente (deleção, inserção ou polimorfismo de nucleotídeo único) específico para o locus (denominado aqui como ponto âncora). Uma vez identificado, esse ponto foi selecionado para o desenho dos primers na plataforma OligoAnalyzer, fornecida pela IDT - Integrated DNA Technologies.

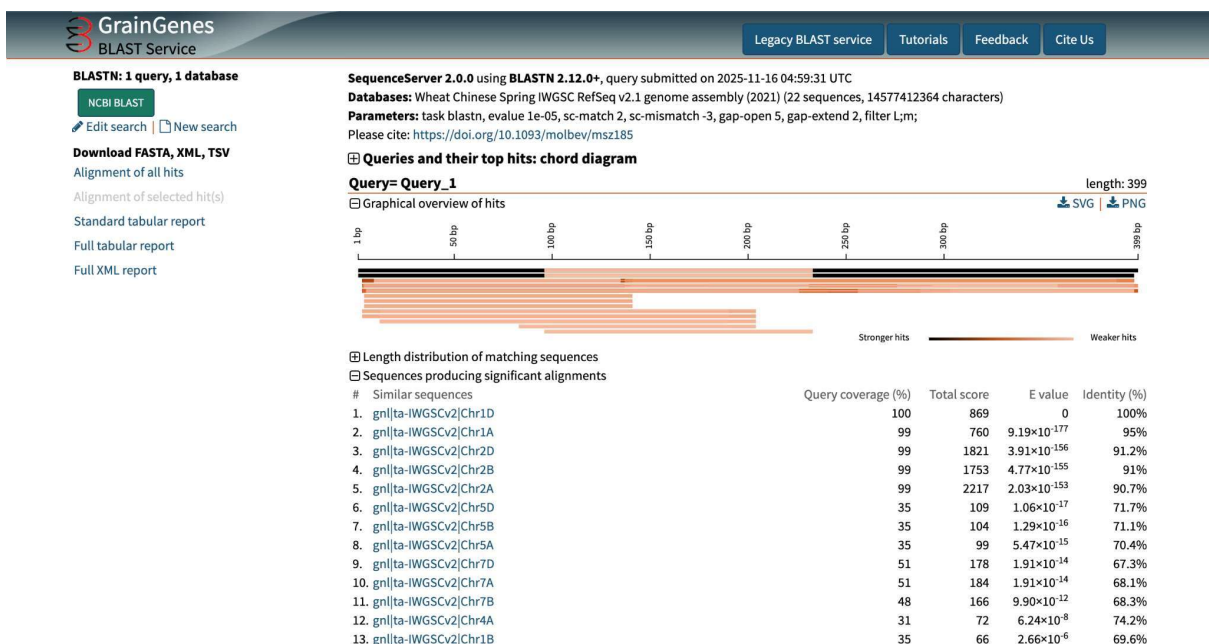


Figura 7. Exemplo de BLAST realizado na plataforma GrainGenes, em que a sequência flanqueadora do SNP obtida foi alinhada ao genoma referência do trigo.

A sequência contendo o ponto âncora (18 e 23 pb) foi inserida na plataforma OligoAnalyzer (IDT – Integrated DNA Technologies) para avaliação de seus parâmetros. A ferramenta fornece informações essenciais para o desenho dos primers, incluindo temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) e conteúdo de GC (Figura 8). Os primers KASP foram projetados de acordo com alguns critérios: temperatura de fusão entre 63 °C e 67 °C, os primers do marcador devem apresentar valores de T<sub>m</sub> semelhantes, localização do ponto âncora a uma distância máxima de 70 pb do SNP alvo e conteúdo de GC mantido entre 40% e 60%. Esses parâmetros garantiram a seleção de primers adequados e compatíveis com a metodologia KASP.

## OligoAnalyzer

The screenshot displays the OligoAnalyzer interface. On the left, the 'Sequence' field contains 'CAT CCG CCG CGT CAT CAT T' with a 'Bases 19' indicator and a 'CLEAR SEQUENCE' button. Below it is a button that says 'Try the new batch mode here'. To the right, the 'Parameter sets' section includes a dropdown for 'qPCR (Default)', 'Target type' set to 'DNA', and input fields for 'Oligo Conc' (0.2 μM), 'Na<sup>+</sup> Conc' (50 mM), 'Mg<sup>++</sup> Conc' (3 mM), and 'dNTPs Conc' (0.8 mM). On the far right, a vertical menu contains buttons for 'ANALYZE', 'HAIRPIN', 'SELF-DIMER', 'HETERO-DIMER', 'NCBI BLAST', 'TM MISMATCH', and 'ADD TO ORDER'. Below the interface, a 'Results' table is shown with two tabs: 'RESUSPENSION' and 'DILUTION'.

SEQUENCE	5'- CAT CCG CCG CGT CAT CAT T -3'
COMPLEMENT	5'- AAT GAT GAC GCG GCC GAT G -3'
LENGTH	19
GC CONTENT	57.9%
MELT TEMP	65.1 °C
MOLECULAR WEIGHT	5739.8 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	171400 L/(mole-cm)
nmole/OD <sub>260</sub>	5.83

Figura 8. Análise dos primers KASP na plataforma OligoAnalyzer (IDT), mostrando os principais parâmetros para o desenho dos primers, incluindo comprimento, conteúdo de GC e temperatura de fusão (T<sub>m</sub>).

A estratégia de desenvolvimento de marcadores KASP envolve o desenho de dois primers específicos para cada alelo, cada um marcado com uma cauda fluorescente padrão FAM ou HEX, com o alelo de resistência ou suscetibilidade posicionado na extremidade 3', além de um primer comum específico para o locus contendo o ponto âncora (Tabela 1).

Para o SNP *SID\_6975458*, a cauda HEX foi adicionada na extremidade 5' do primer forward (CACATGGTACGCCGTCTCC) com o alelo do SNP (C), associado à suscetibilidade, e a cauda FAM foi adicionada na extremidade 5' do primer forward (CACATGGTACGCCGTCTCT) com o alelo do SNP (T), associado à resistência. A sequência do primer reverso comum foi CATCGGCCGCGTCATCATT (Tabela 1).

No caso do SNP *S3B\_767502837*, a cauda HEX foi adicionada na extremidade 5' do primer forward (CTAAAAGTGTTCTTGTAATCG) contendo o alelo do SNP associado à suscetibilidade (G), e a cauda FAM foi adicionada na extremidade 5' do primer forward (CTAAAAGTGTTCTTGTAATCA) com a base associada à resistência (A). A sequência do primer reverso comum foi GAAGGCAAACCTGTAATAATAC (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos primers dos marcadores KASP projetados.

Marcadores	Primers*	Sequências (5'-3')
<b><i>SID_6975458</i></b>	Primer forward específico para o alelo 1	CACATGGTACGCCGTCTCC
	Primer forward específico para o alelo 2	CACATGGTACGCCGTCTCT
	Reverso	CATCGGCCGCGTCATCATT
<b><i>S3B_767502837</i></b>	Primer forward específico para o alelo 1	CTAAAAGTGTTCTTGTAATCG
	Primer forward específico para o alelo 2	CTAAAAGTGTTCTTGTAATCA
	Reverso	GAAGGCAAACCTGTAATAATAC

\*Os primers forward específicos para os alelos 1 e 2 foram marcados com cauda HEX (5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3') e cauda FAM (5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3'), respectivamente.

#### 4.2.2 Extração de DNA

Para validar os marcadores KASP projetados, foram selecionados controles positivos e negativos a partir do painel GWAS do qual os marcadores SNP foram obtidos. Os controles

positivos consistiram em linhas portadoras do alelo favorável (resistente) do SNP e que apresentaram resistência à ferrugem da folha com base no fenótipo. Por outro lado, os controles negativos consistiram em linhas com o alelo alternativo associado à suscetibilidade e que também apresentaram suscetibilidade à ferrugem da folha com base no fenótipo.

O DNA foi extraído a partir de tecidos jovens de folhas dos genótipos selecionados como controles positivos e negativos. O tecido foliar foi coletado em uma placa de 96 poços de plantas com duas semanas de idade. Folhas saudáveis foram cortadas e mantidas em congelador a -80 °C. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando uma abordagem modificada de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) adaptada para placa de 96 poços. Pequenas esferas de metal foram adicionadas a cada poço da placa para facilitar a trituração do tecido. A placa foi selada com uma tampa de borracha e o tecido vegetal congelado foi triturado utilizando o dispositivo GenoGrinder (Figura 9a) em dois ciclos de 1,15 minutos cada, a 750 golpes por minuto. Em seguida, a placa foi centrifugada a 3.700 rpm por 2 minutos (Figura 9b). Após a centrifugação, o selo de borracha foi cuidadosamente removido e 600 µL do tampão de extração CTAB pré-aquecido foram adicionados a cada poço, seguido de homogeneização por pipetagem (Figura 9c). O tampão de extração CTAB utilizado foi preparado com 2% de CTAB, 20 mL de Tris-HCl 1 M (pH 8,0), 4 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0), 28 mL de NaCl 5 M e β-mercaptoetanol (200 µL adicionados imediatamente antes do uso), com o volume final ajustado para 100 mL utilizando água ultrapura.

A placa foi novamente selada e incubada a 65 °C por 30 minutos, com agitação a cada 5-10 minutos para favorecer a lise celular. Sob capela, foram adicionados 600 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1) em cada poço, e as amostras foram misturadas vigorosamente até obter uma emulsão homogênea. Após novo selamento, a placa foi centrifugada por 25 minutos a 3.700 rpm à temperatura ambiente. A fase aquosa superior (aproximadamente 500-550 µL) foi cuidadosamente transferida para uma placa de 96 poços quadrados.

Para precipitar o DNA, foram adicionados 40 µL de acetato de sódio 3 M (pH 5,2), seguidos por 240 µL de isopropanol gelado (0,6× o volume da amostra). A placa foi selada e mantida a -20 °C por aproximadamente 3 horas. Após breve equilíbrio à temperatura ambiente, a placa foi centrifugada por 25 minutos; o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado. Os passos de centrifugação e lavagem foram repetidos para garantir a remoção completa de impurezas. As placas foram deixadas para secar durante a noite sob fluxo laminar, permitindo a evaporação completa do etanol residual. No dia seguinte, o pellet de DNA foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE contendo RNase

(0,1%) e mantido a 4 °C por algumas horas antes do uso, garantindo a solubilização completa do DNA.

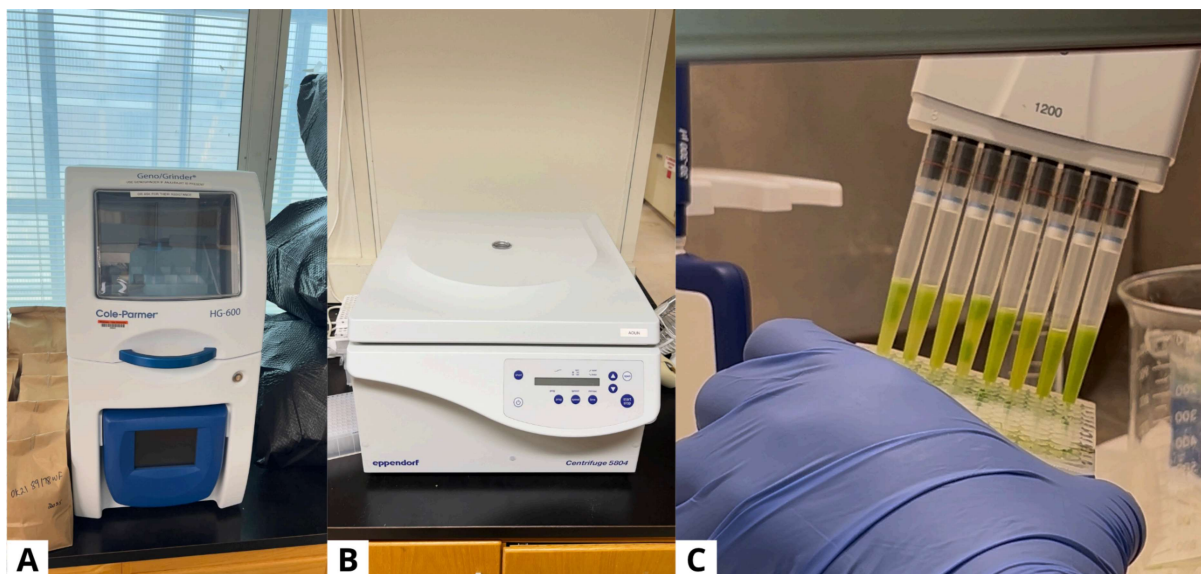


Figura 9. (a) Equipamento GenoGrinder utilizado para trituração do tecido foliar; (b) centrífuga; (c) homogeneização das amostras por pipetagem.

#### 4.2.3 Reações de PCR e condições para marcadores KASP

O mix de primers foi inicialmente preparado misturando 12  $\mu\text{L}$  dos primers FAM e HEX em um tubo Eppendorf, 30  $\mu\text{L}$  do primer comum e 46  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, resultando em 100  $\mu\text{L}$  de Primer Mix (PM) a ser utilizado nas reações subsequentes.

No segundo passo, um KASP Mix (KM) foi preparado da seguinte forma: 5  $\mu\text{L}$  de KASP Master Mix (KBS-1050-102; LGC Biosearch Technologies, Hoddesdon, Reino Unido), 0,14  $\mu\text{L}$  do Primer Mix (PM) previamente preparado e 1,86  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, totalizando 7  $\mu\text{L}$ . É importante observar que esses volumes correspondem a uma única amostra e devem ser multiplicados de acordo com o número de amostras.

Finalmente, a mistura foi distribuída em uma placa de 96 poços. Cada poço recebeu 7  $\mu\text{L}$  do KM e 3  $\mu\text{L}$  de DNA diluído (30 ng/ $\mu\text{L}$ ) das amostras de controle positivo ou negativo. A placa foi selada com filme e colocada no equipamento de PCR (Figura 10).

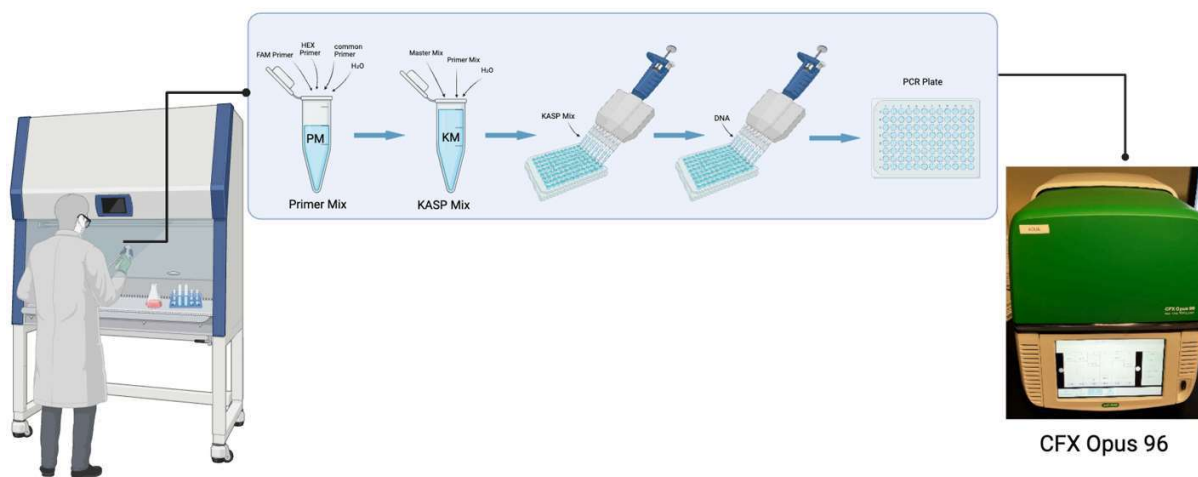


Figura 10. Ilustração mostrando as etapas envolvidas na preparação do ensaio de PCR KASP.

O PCR foi realizado em um sistema de PCR em tempo real Bio-Rad CFX-96 Opus (Bio-Rad, Hercules, CA) com o seguinte perfil: hot start a 94 °C por 15 minutos, seguido de 10 ciclos touchdown a 94 °C por 20 s e 65 °C por 60 s, com diminuição de 0,8 °C a cada ciclo, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 20 s e 57 °C por 60 s, com etapa final de leitura da placa a 37 °C. A fluorescência de endpoint e o agrupamento genotípico foram realizados no software Bio-Rad CFX Maestro 2.3.

Foram realizados de um a três ciclos adicionais de reciclagem caso os grupos genotípicos não estivessem claramente diferenciados após o PCR inicial. A etapa de reciclagem consistiu em três ciclos adicionais de PCR a 94 °C por 20 s e 57 °C por 60 s. Cada marcador KASP foi validado com base nos controles positivos e negativos.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliações fenotípicas identificaram genótipos resistentes à ferrugem da folha.

As avaliações fenotípicas de 619 genótipos de trigo duro de inverno contra a raça MBBJG do patógeno da ferrugem da folha, no estágio de plântula, mostraram que cerca de metade dos genótipos foram suscetíveis. Verificou-se que 25%, 27% e 48% dos genótipos foram classificados como resistentes (nota de doença 0-3), moderadamente resistentes (nota 4-6) e suscetíveis (nota 7-9) à raça MBBJG, respectivamente (Figura 11).

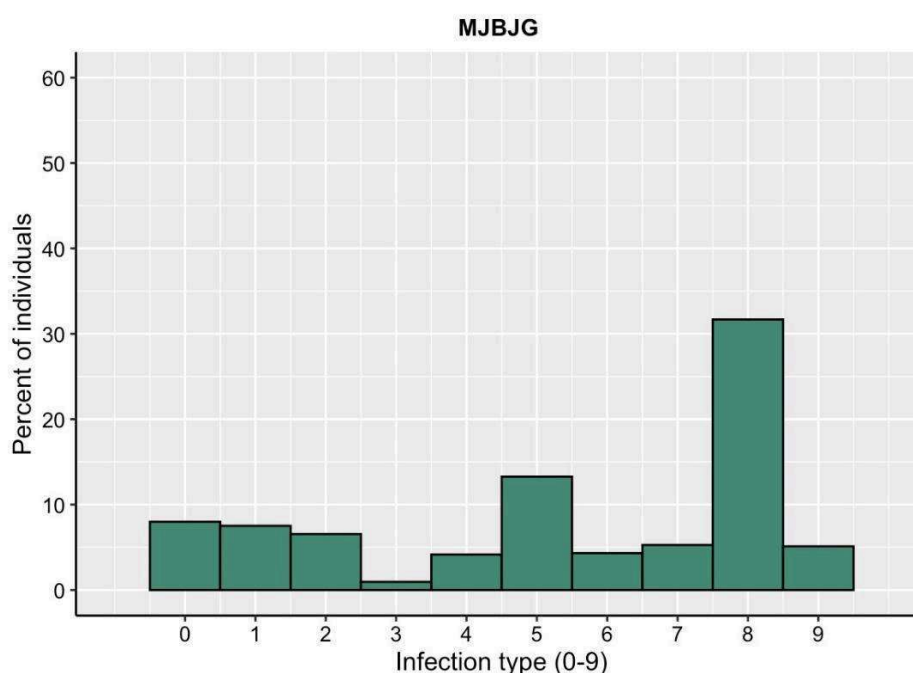


Figura 11. Distribuição dos tipos de infecção pela raça MBBJG em 619 genótipos de trigo duro de inverno.

### 5.2. Desenvolvimento do marcador KASP para aumentar a resistência à ferrugem foliar

O gráfico de discriminação alélica para o marcador *SID\_6975458* (Figura 12) e *S3B\_767502837* (Figura 13) mostrou uma separação clara e bem definida dos genótipos avaliados. O agrupamento de pontos azuis observado na região superior esquerda representou genótipos homocigotos suscetíveis. O agrupamento de pontos laranja, localizado na extremidade direita do gráfico, indicou indivíduos homocigotos resistentes. A distinção entre os alelos HEX e FAM demonstra que o marcador separou de forma eficiente os alelos associados à resistência e à suscetibilidade, identificando com precisão genótipos contrastantes com base em suas reações à ferrugem da folha. Os pontos verdes nos gráficos de dispersão correspondem a genótipos heterocigotos. Os pontos pretos na região inferior

esquerda dos gráficos representam o controle sem template (sem DNA), indicando ausência de contaminação. Um único ponto exibido como um “X” vermelho na Figura 12 corresponde a uma amostra em que a PCR falhou, provavelmente devido a um erro técnico.

Em resumo, ambos os marcadores, *SID\_6975458* e *S3B\_767502837*, distinguiram de forma eficiente os genótipos resistentes e suscetíveis. A clareza dos agrupamentos confirmou a eficiência dos primers desenvolvidos e a confiabilidade dos ensaios KASP realizados neste estudo.

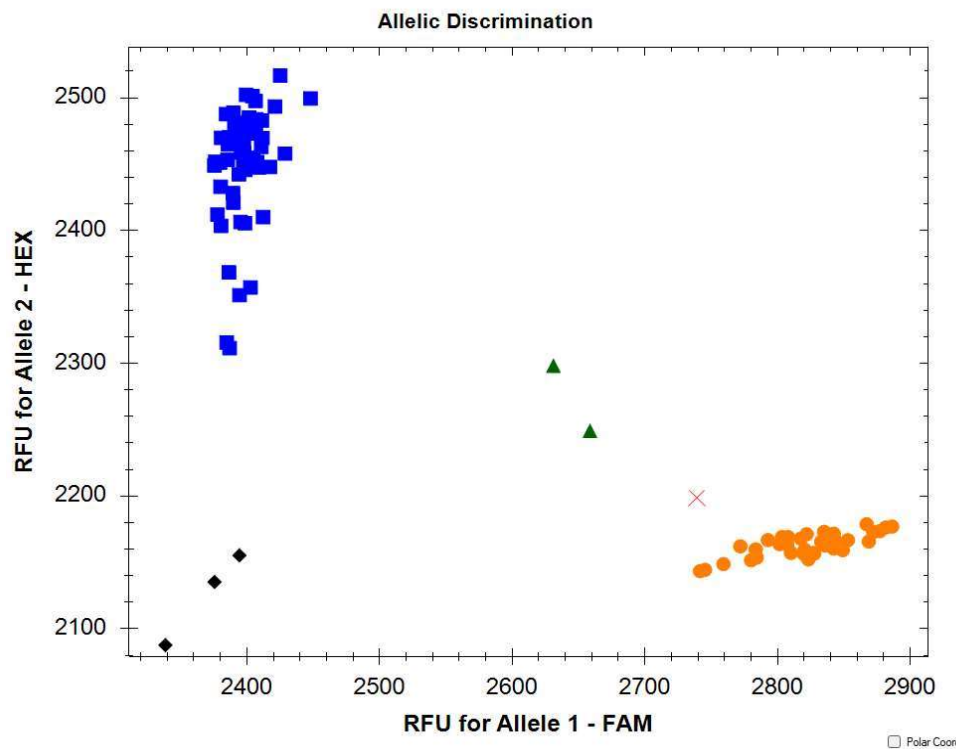


Figura 12. Discriminação alélica para o marcador KASP *SID\_6975458*, mostrando grupos de genótipos resistentes (em laranja) e suscetíveis (em azul).

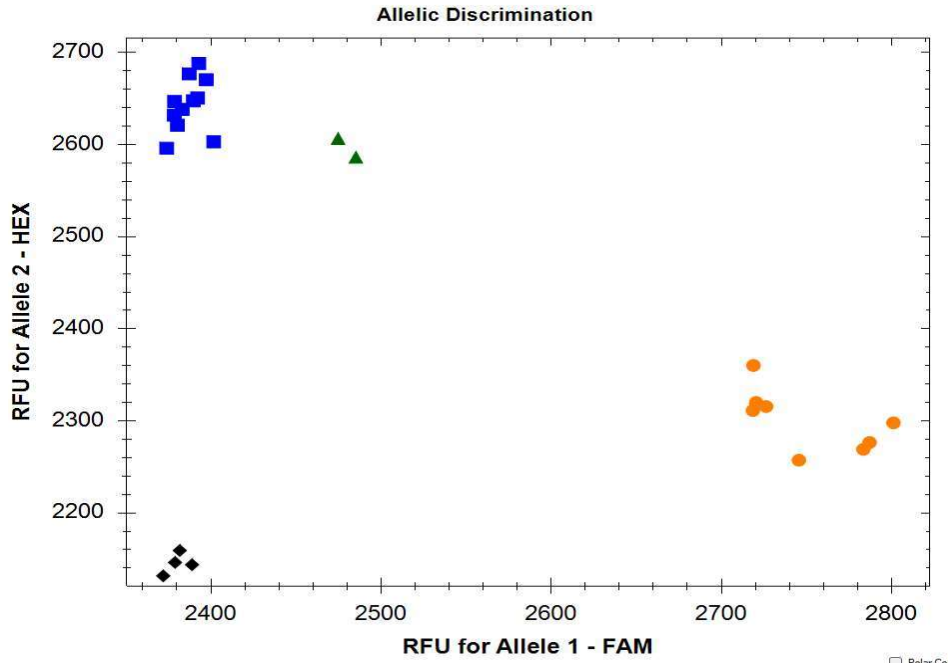


Figura 13. Discriminação alélica para o marcador KASP *S3B\_767502837*, mostrando os agrupamentos de genótipos resistentes (em laranja) e suscetíveis (em azul).

Para o marcador *SID\_6975458*, os dados de ferrugem da folha de 619 genótipos de trigo duro de inverno coletados em ensaios de campo em Stillwater (STW) nos anos de 2023, 2024 e 2025 (dados de um estudo anterior realizado no “Small Grains Pathology Lab” da OSU) mostraram um padrão consistente na diferenciação entre genótipos classificados como resistentes (T) e suscetíveis (C). Em todos os anos avaliados, os genótipos portadores do alelo associado à resistência apresentaram valores de severidade de doença significativamente menores (Figura 14). Com base no teste t, a diferença entre o grupo resistente e o grupo suscetível foi estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

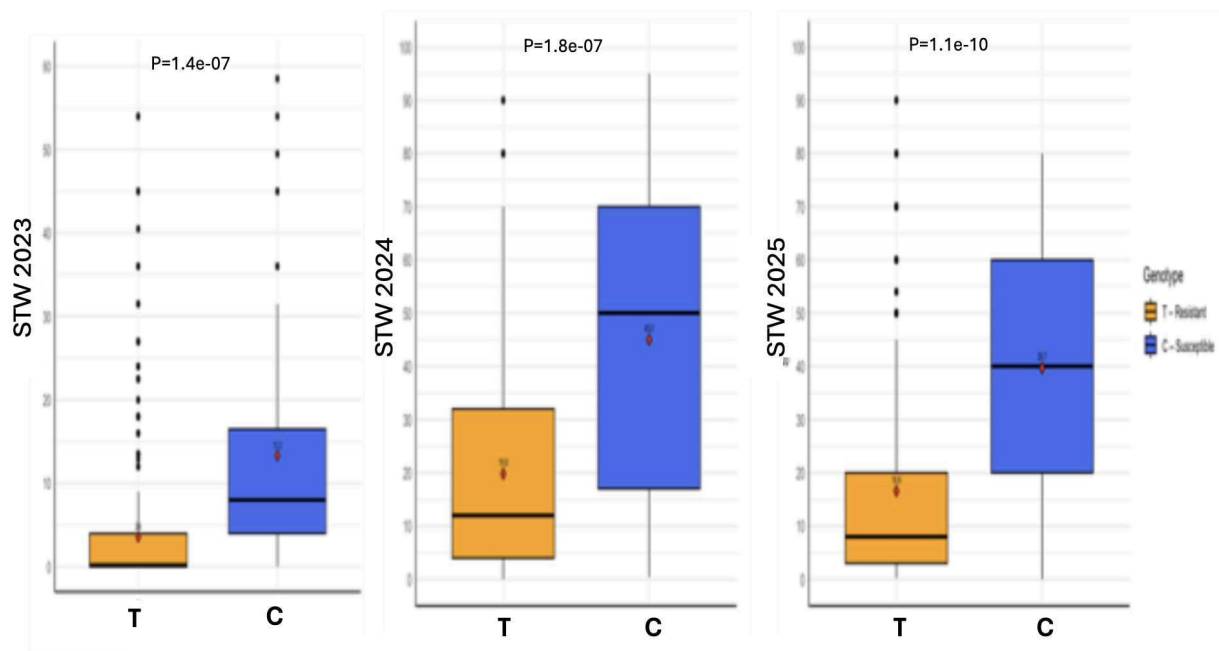


Figura 14. Severidade da ferrugem da folha para os grupos resistentes (laranja) e suscetíveis (azul) com base no marcador KASP *S1D\_6975458*, avaliada ao longo de três safras de campo em Stillwater (2023–2025).

O marcador *S3B\_767502837* também diferenciou claramente os genótipos resistentes (A) e suscetíveis (G), com base na resposta de plântulas de 619 genótipos à raça TNBJS (dados de um estudo anterior realizado no Small Grains Pathology Lab da OSU). Os genótipos suscetíveis com base no alelo (G) apresentaram maiores escores de doença contra a raça TNBJS, enquanto os genótipos resistentes com base no alelo (A) tiveram níveis de doença substancialmente menores. O valor de  $p < 2e-16$  do teste t indicou diferença significativa entre os dois grupos (Figura 15).

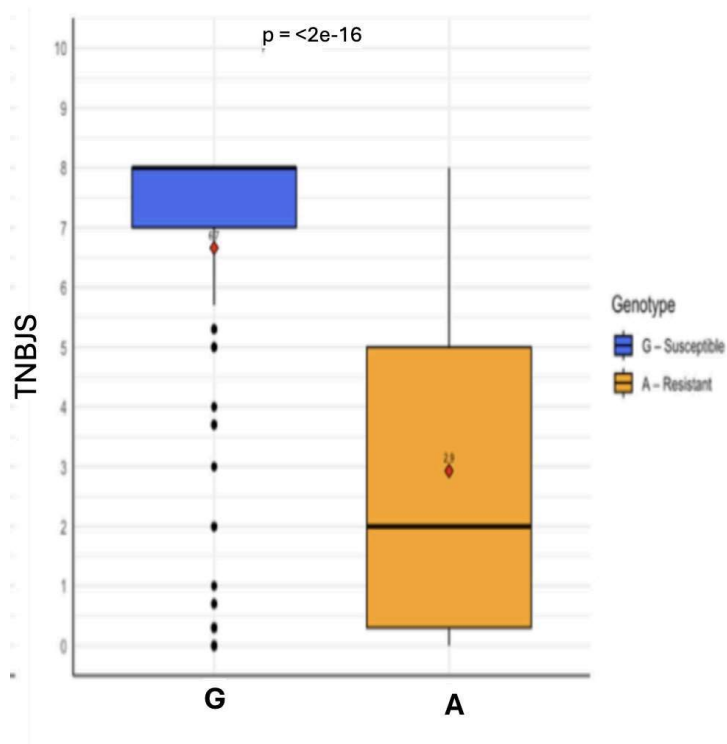


Figura 15. Severidade da ferrugem da folha para os agrupamentos resistentes (laranja) e suscetíveis (azul) com base no marcador *S3B\_767502837*.

Ambos os marcadores demonstraram uma associação forte e consistente com a resposta à resistência à ferrugem da folha, podendo, portanto, ser utilizados em seleção assistida por marcadores (MAS) com o objetivo de desenvolver cultivares de trigo com resistência durável à ferrugem da folha.

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram investigados 619 genótipos de trigo de inverno, cuja fenotipagem evidenciou que aproximadamente 25 % dos genótipos apresentaram reação resistente à raça de *Puccinia triticina* avaliada (escore 0-3), correspondendo a 155 linhagens. Além disso, 27 % dos genótipos foram classificados como moderadamente resistentes (escore 4-6), enquanto 48 % foram considerados suscetíveis (escore 7-9). Em comparação, Lakkakula et al. (2025) avaliaram 459 linhagens de trigo de inverno no estágio de plântula contra cinco raças de *P. triticina*, observando que entre 43 % e 60 % das linhagens apresentaram reações suscetíveis ( $\geq 7$ ), enquanto 37 genótipos exibiram respostas altamente resistentes ( $\leq 3$ ) a todas as raças, equivalente a 8%, e 55 linhagens demonstraram resistência moderada (entre 4 e 6) frente a todas as raças testadas. Além disso, Bagwell et al. (2025) relataram ampla

variabilidade fenotípica para resistência à ferrugem da folha em plântulas de trigo “*soft red winter wheat*”, ao avaliarem 263 genótipos inoculados sob condições controladas.

De forma análoga, Delfan et al. (2023) empregaram a mesma metodologia para avaliar resistência em 320 genótipos de “*bread wheat*”, observando que a maioria dos genótipos apresentaram-se suscetível no estágio de plântula e em campo, enquanto uma minoria apresentou resistência, cerca de 5%, evidenciando variabilidade genética significativa para o traço. Ademais, Malysheva et al. (2023) utilizou germoplasma proveniente de diferentes centros de pesquisa, como CIMMYT e ICARDA, observando respostas fenotípicas divergentes entre as linhagens testadas, uma vez que, apenas 18,6% dos genótipos testados apresentaram resistência.

O conjunto dessas evidências demonstra que a fenotipagem constitui uma abordagem confiável para detectar variabilidade na resistência ao patógeno em diferentes classes comerciais de trigo, destacando a importância do uso de painéis amplos de germoplasma. Ademais, esses estudos corroboram a eficácia da metodologia empregada no presente trabalho, uma vez que entre os artigos citados nenhum deles obtiveram resultados com porcentagem superior ao apresentado neste estudo, validando a eficiência da abordagem adotada para fenotipagem na avaliação de resistência à ferrugem da folha em genótipos de trigo de inverno.

No âmbito da genotipagem, diversos estudos que empregaram metodologias semelhantes também reportaram resultados consistentes e de elevada confiabilidade. Sharma et al. (2023) investigaram a resistência conferida pelo gene *Lr32* e observaram uma co-segregação robusta entre esse gene e múltiplos marcadores KASP, evidenciando uma forte concordância entre os perfis genotípicos e as respostas fenotípicas nas populações analisadas. Estudo semelhante foi realizado por Kassa et al. (2017) onde demonstrou seis marcadores KASP localizados próximos ao gene *Lr16* que apresentaram alta co-segregação com o fenótipo de resistência à ferrugem da folha, evidenciando que SNPs associados a genes de resistência podem ser convertidos em marcadores moleculares de alta eficiência.

Em adição, em uma população RIL de trigo comum, Wang et al. (2025) identificou cinco loci de traço quantitativo (QTLs) de resistência à ferrugem da folha e converteram marcadores associados em marcadores KASP eficientes, com co-segregação consistente entre alelos favoráveis e menor severidade da doença. Além disso, Singh et al., (2024) e Bansal et al., (2021) também demonstram que esse padrão de associação genótipo-fenótipo detectada em populações mapeadas pode ser traduzida em ferramentas de seleção assistida, o que confirma a validade da abordagem aplicada neste estudo.

Diante do exposto, evidencia-se a robustez da metodologia de desenvolvimento e validação de marcadores KASP aplicada neste estudo, indicando que os marcadores *SID\_6975458* e *S3B\_767502837* apresentam elevada precisão na identificação de genótipos resistentes à ferrugem da folha, reforçando seu potencial para aplicação em programas de seleção assistida de trigo de inverno.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu identificar, por meio da fenotipagem, ampla variabilidade na resposta à ferrugem da folha entre 619 genótipos de trigo de inverno, evidenciando diferentes níveis de resistência frente à raça de *Puccinia triticina* avaliada. Os resultados obtidos reforçam o potencial do uso integrado de fenotipagem e marcadores KASP como estratégia para acelerar a identificação e a seleção de genótipos resistentes à ferrugem da folha.

A etapa de genotipagem permitiu o desenvolvimento e a validação de dois marcadores KASP (*SID\_6975458* e *S3B\_767502837*), ambos demonstrando elevada capacidade discriminatória entre genótipos resistentes e suscetíveis. Os resultados obtidos foram prósperos, o que permite a identificação de linhagens que possam ser estudadas no programa de melhoramento para seleção de outras características, como a de produtividade, visando se tornar cultivares comerciais.

Diante do exposto, fica evidente que a combinação entre avaliação fenotípica e ferramentas moleculares oferecem uma das melhores abordagens para o avanço do melhoramento genético do trigo. A validação dos marcadores desenvolvidos confirma sua utilidade como instrumentos de triagem precoce, possibilitando maior precisão na escolha das plantas. Assim, este trabalho contribui para o fortalecimento das estratégias voltadas ao desenvolvimento de genótipos com maior resistência à ferrugem da folha e com potencial para integrar futuros programas de melhoramento.

## 8. REFERÊNCIAS

AOUN, Meriem et al. Inheritance and bulked segregant analysis of leaf rust and stem rust resistance in durum wheat genotypes. *Phytopathology*, v. 107, n. 12, p. 1496-1506, 2017.

AOUN, M. et al. Genome-wide association mapping of leaf rust response in a durum wheat worldwide germplasm collection. *The plant genome*, v. 9, n. 3, p. plantgenome2016.01.0008, 2016. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2016.01.0008>.

BAGWELL, John W. et al. Discovering leaf and stripe rust resistance in soft red winter wheat through genome-wide association studies. **The Plant Genome**, v. 18, n. 2, p. e70055, 2025.

BANSAL, Mitaly et al. A robust KASP marker for selection of four pairs of linked leaf rust and stripe rust resistance genes introgressed on chromosome arm 5DS from different wheat genomes. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 6, p. 5209-5216, 2021.

BEUKERT, Ulrike et al. Comparing the potential of marker-assisted selection and genomic prediction for improving rust resistance in hybrid wheat. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 594113, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.594113>.

BOLTON, M. D.; KOLMER, J. A.; GARVIN, D. F.. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 563–575, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x>.

DARYANTO, Stefani; WANG, Lixin; JACINTHE, Pierre-André. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0156362, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156362>.

DELFAN, Saba et al. Exploring genomic regions involved in bread wheat resistance to leaf rust at seedling/adult stages by using GWAS analysis. **BMC genomics**, v. 24, n. 1, p. 83, 2023.

DIPTA, Bhawna et al. KASP: a high-throughput genotyping system and its applications in major crop plants for biotic and abiotic stress tolerance. **Molecular Biology Reports**, v. 51, n. 1, p. 508, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09455-z>.

ERENSTEIN, Olaf et al. Global trends in wheat production, consumption and trade. In: **Wheat improvement: food security in a changing climate**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 47-66. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-90673-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-90673-3_4).

FAO. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2024*. Rome: FAO, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cd1158en>. Acesso em: 13 nov. 2025.

HUERTA-ESPINO, J. et al. **Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina***. *Euphytica*, v. 179, n. 1, p. 143-160, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x>.

KASSA, Muluaem T. et al. Highly predictive SNP markers for efficient selection of the wheat leaf rust resistance gene Lr16. **BMC plant biology**, v. 17, n. 1, p. 45, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0993-7>.

KAUPPI, Katja et al. Impact of pests on cereal grain and nutrient yield in boreal growing conditions. *Agronomy*, v. 11, n. 3, p. 592, 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030592>.

KOLMER, James. Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. **Forests**, v. 4, n. 1, p. 70-84, 2013. <https://doi.org/10.3390/f4010070>.

LAKKAKULA, Indira Priyadarshini. *Validation of SNP markers for resistance to leaf and stripe rust in wheat using KASP assays*. 2024. Thesis (MSc in Plant and Soil Sciences) — Oklahoma State University, Stillwater, 2024. p. 87–110.

LAKKAKULA, Indira Priyadarshini et al. Identification of leaf rust resistance loci in hard winter wheat using genome-wide association mapping. **The Plant Genome**, v. 18, n. 1, p. e20546, 2025. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20546>.

LI, Guoliang et al. Research progress on marker-assisted selection pyramiding breeding of disease resistance genes in wheat. **Journal of Plant Science and Phytopathology**, v. 6, n. 3, p. 167-169, 2022. <https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001093>.

MALYSHEVA, Angelina et al. Phenotyping and identification of molecular markers associated with leaf rust resistance in the wheat germplasm from Kazakhstan, CIMMYT and ICARDA. **Plants**, v. 12, n. 15, p. 2786, 2023.

OERKE, E.-C. Crop losses to pests. **The Journal of agricultural science**, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>.

PAUX, Etienne et al. Breeding for economically and environmentally sustainable wheat varieties: an integrated approach from genomics to selection. **Biology**, v. 11, n. 1, p. 149, 2022. <https://doi.org/10.3390/biology11010149>.

ROELFS, A. P. Epidemiology of the cereal rusts in North America. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 86-90, 1989. <https://doi.org/10.1080/07060668909501153>.

SHARMA, J. S. et al. Fine mapping and marker development for the wheat leaf rust resistance gene Lr32. **G3**, v. 13, n. 2, p. jkac274, 2023.

SHARMA, Anamika; MENDU, Venugopal; REDDY, Gadi VP. Host plant resistance to insect pests in wheat. In: **Plant Resistance to Insects in Major Field Crops**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 123-140. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-7520-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-99-7520-4_5).

SHEWRY, Peter R. Wheat. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 6, p. 1537-1553, 2009. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>.

SINGH, Davinder et al. Mapping of Leaf Rust Resistance Loci in Two Kenyan Wheats and Development of Linked Markers. **Genes**, v. 15, n. 5, p. 583, 2024.

SEMAGN, Kassa et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. **Molecular breeding**, v. 33, n. 1, p. 1-14, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>.

**UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – Economic Research Service.**

Wheat. Washington, D.C.: USDA Economic Research Service, updated Jan. 27 2025.

Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/wheat>. Acesso em: 12 nov. 2025.

**UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – Climate Hubs.**

Vulnerabilities in agriculture and forestry. [S.l.], [s.d.]. Disponível em:

<https://www.climatehubs.usda.gov/vulnerabilities-agriculture-and-forestry>. Acesso em: 15 nov. 2025.

**UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – Economic Research Service.**

*Wheat Outlook: April 2025 (WHS-25d)*. Washington: USDA ERS, 14 abr. 2025. Disponível em:

<https://esmis.nal.usda.gov/sites/default/release-files/cz30ps64c/n296zw07p/6w926787j/WHS-25d.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2025.

**UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** Wheat Leaf Rust in the United States in 2022. St. Paul: USDA–ARS Cereal Disease Laboratory, 2022. Disponível em: [https://www.ars.usda.gov/ARSTUserFiles/50620500/Cerealrusts/2022%20WLR%20survey/Report%20of%20Wheat%20Leaf%20Rust%20in%20the%20United%20States%20in%202022.pdf?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.ars.usda.gov/ARSTUserFiles/50620500/Cerealrusts/2022%20WLR%20survey/Report%20of%20Wheat%20Leaf%20Rust%20in%20the%20United%20States%20in%202022.pdf?utm_source=chatgpt.com). Acesso em: 17 nov. 2025.

WANG, Hongpeng; Li, Huamin. Application of molecular marker assisted selection in wheat stress resistance breeding. **Triticeae Genomics and Genetics**, v. 15, 2024.

WANG, Y. et al. QTL Mapping for Leaf Rust Resistance in a Common Wheat Recombinant Inbred Line Population of Doumai/Shi4185. **Plants**, v. 14, n. 19, p. 3113, 2025.

ZHU, Tingting et al. Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring genome assembly. **The Plant Journal**, v. 107, n. 1, p. 303-314, 2021.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.15289>.

ZHAO, Haidong et al. US winter wheat yield loss attributed to compound hot-dry-windy events. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 7233, 2022.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34947-6>.