

**SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**  
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2022 roku

**A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania: **Analiza molekularna genów warunkujących odporność poziomą u pszenicy (*Triticum aestivum* L.) na porażenie przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Puccinia* sp.**

Numer zadania: **5** (w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa Dz. U. z 2015 r. poz. 1170 oraz Dz. U. z 2016 r. poz. 1614)

Planowany okres realizacji zadania: 01 stycznia 2022 r. – 31 grudnia 2022 r.

Planowane nakłady w zł: **391 488,00**

**B. DANE WNIOSKODAWCY**

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, (tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax)

**Kierownik Jednostki** – prof. dr hab. Piotr Goliński – Prorektor ds. Nauki i Współpracy Międzynarodowej

**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań

tel. 61 848 7006, fax 61 848 7007

## C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

### 1. Zespół badawczy

<b>kierownik zadania</b>		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Michał Kwiatek	Prof. UPP dr hab.	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
<b>wykonawcy zadania</b>		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Agnieszka Tomkowiak	Prof. UPP dr hab.	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Łukasz Wolko	Prof. UPP dr hab.	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Biochemii i Biotechnologii
Danuta Kurasiak-Popowska	Prof. UPP dr hab.	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Sylwia Mikołajczyk	Dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Roksana Skowrońska	Dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Aleksandra Noweiska	Mgr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Julia Spychała	Mgr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Anna Jagieniak	Pracownik techniczny	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

## 2. Kierownik zadania

**Prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek**  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań  
tel. 61 848 77 60  
e-mail: [michal.kwiatek@up.poznan.pl](mailto:michal.kwiatek@up.poznan.pl)

Osoba do kontaktu w razie nieobecności kierownika:

**Prof. UPP dr hab. Janetta Niemann**  
**Kierownik Katedry Genetyki i Hodowli Roślin**  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań  
tel. 61 848 77 20  
e-mail: [janetta.niemann@up.poznan.pl](mailto:janetta.niemann@up.poznan.pl)

## D. OPIS ZADANIA

### 1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie <sup>1</sup> /częściowo <sup>1</sup> )
1.	Analiza molekularna 1500 prób pobranych z 30 kombinacji krzyżowań pszenicy zwyczajnej, posiadających geny typu „slow rusting”, w celu identyfikacji markerów genów <i>Lr34</i> , <i>Lr46</i> , <i>Lr67</i> i <i>Lr68</i> a także genów głównych odporności odporności.	częściowo*
2.	Analizy 150 prób pobranych z pięciu genotypów kombinacji krzyżowań (fitotron) w celu określenia ekspresji genów typu „slow rust”.	częściowo*

\*- Zaplanowane cele nr 1 i 2 nie zostały w pełni zrealizowane stan na (7.12.2021r.). W grudniu 2022 r. przeanalizowane zostaną wyniki sekwencjonowania DArT seq oraz ddPCR oraz wykonana zostanie analiza statystyczna wszystkich danych uzyskanych w ramach tematu badawczego nr 2.

### 2. Harmonogram realizacji zadania

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Analiza molekularna 1500 prób pobranych z 30 kombinacji krzyżowań pszenicy zwyczajnej, w celu identyfikacji markerów genów typu odporności poziomej („slow rusting”) oraz pionowej.	1 – 12	148 944 zł
2	Analizy 150 prób pobranych z pięciu genotypów kombinacji krzyżowań (fitotron) w celu określenia ekspresji genów typu „slow rust”.	1 – 12	250 944 zł
Razem			399 888 zł

<sup>1</sup> Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

### 3. Opis tematów badawczych

#### 3. 1. Temat badawczy 1

**Analiza molekularna 1500 prób pobranych z 30 kombinacji krzyżowań pszenicy zwyczajnej, w celu identyfikacji markerów genów typu odporności poziomej („slow rusting”) oraz pionowej.**

#### Cel tematu badawczego 1

Celem tematu badawczego 1 jest analiza molekularna 1500 prób pobranych z 30 kombinacji krzyżowań pszenicy zwyczajnej, posiadających geny typu „slow rusting”, w celu identyfikacji markerów genów *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* i *Lr68* a także genów głównych odporności.

### MATERIAŁ I METODY (Temat badawczy 1)

#### Material roślinny (Temat badawczy 1)

Na cele realizacji tematu pierwszego (oraz drugiego) uzyskano materiał roślinny w postaci mieszańców pszenicy zwyczajnej zawierających geny odporności poziomej na rdzę brunatną, które otrzymano w wyniku krzyżowań przeprowadzonych w ramach usługi badawczej wykonanej przez następujące firmy: Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR; Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR; firmę Małopolska Hodowla Roślin (MHR) Sp. z o.o. oraz Poznańska Hodowla Roślin (PHR) Sp. z o.o. W pierwszym etapie projektu (rok 2021) na podstawie analiz molekularnych oraz wyników ekspresji genów a także obserwacji porażenia wybrano genotypy posiadające zarówno poszukiwane geny odporności typu „slow rusting”, jak i odpowiedni poziom ekspresji tych genów. Były to: Glenlea (p. jara), NP846 (p. jara), A99AR (p. jara), TX89D6435 (p. ozima) oraz Purdue (p. ozima). Wybrane genotypy użyto do krzyżowań z polskimi odmianami/liniami hodowlanymi pszenicy w bieżącym roku. W tabeli nr 1 zaprezentowano liczbę otrzymanych genotypów mieszańcowych oraz liczbę genotypów ozimych, które po wysiewach skiełkowały a ich tkanka liściowa została pobrana do analiz (wartość liczbowa w nawiasach). Łącznie do analiz zebrano materiał roślinny dla 300 genotypów ozimych, w tym 190 genotypów, których formą rodzicielską był genotyp TX89D6435 (*Lr34+Lr46*) oraz 110 genotypów, które wywodziły się od genotypu Purdue (*Lr46+Lr67+Lr68*). Materiał roślinny został pobrany w dwóch powtórzeniach ( $300 \times 2 = 600$ ). Z każdego powtórzenia wydzielono trzy próby. Dwie na cele reakcji PCR z pojedynczym markerem ( $600 \times 2 = 1200$  prób). Trzecia dla celów reakcji multiplex PCR (300 prób). Łącznie wyizolowano oraz przeanalizowano **1500 prób DNA** ( $1200 + 300 = 1500$  prób).

**Tabela 1.** Kombinacje krzyżówkowe wprowadzone na cele realizacji tematu badawczego nr 1.

Genotypy akceptorowe (firma, forma uprawna)	Genotypy donorowe, posiadające skumulowane geny odporności poziomej („slow rusting”)					Suma
	Glenlea (jara) <i>Lr34+Lr46+Lr68</i>	NP846 (jara) <i>Lr34+Lr46+Lr68</i>	A99AR (jara) <i>Lr34+Lr46+Lr68</i>	TX89D6435 (ozima) <i>Lr34+Lr46</i>	Purdue (ozima) <i>Lr46+Lr67+Lr68</i>	
	Liczba otrzymanych genotypów F <sub>1</sub> (Liczba genotypów poddanych analizie molekularnej w 2022 r.)					
Itaka (Danko HR, pszenica jara)	60	0	0			
Bataja (Danko HR, p. ozima)				73 (58)	0	
Kariatyda (Danko HR, p. ozima)				33 (12)	0	
Merkawa (HR Smolice, p. jara)	24	12	54			
Symetria (HR Smolice, p. ozima)				188 (57)	124 (37)	

Aura (HR Strzelce, p.jara)	166	183	183			
Euforia (HR Strzelce, p. ozima)				138 (63)	155 (73)	
Harenda (MHR p. jara)	37	33	25			
Jutrzenka (MHR p. jara)	10	31	6			
Błyskawica (MHR p. ozima)				0	3	
Lokata (MHR p. ozima)				0	5	
NAD 5620 PHR p. ozima)				8	24	
AND 6921(PHR p. ozima)				2	3	
AND 6721 (PHR p. ozima)				0	1	
NAD 6321 (PHR p. ozima)				2	0	
KWS Carusum (p. jara)	4	20	0			
Rantum (p. ozima)				7	0	
<b>Suma</b>				(190)	(110)	<b>1396</b>

## Metody (Temat badawczy 1)

### *Izolacja genomowego DNA do analiz molekularnych*

Materiał do izolacji genomowego DNA stanowiła tkanka liściowa każdego z genotypów mieszańcowych oraz form rodzicielskich pszenicy ozimej. Z każdego genotypu pobierano dwie próby. Materiał do analiz molekularnych zbierano w fazie drugiego liścia (BBCH 12). Liście pobierano bezpośrednio z pola lub szklarni do probówek typu eppendorf i transportowano w lodówce przenośnej w temperaturze -9°C a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do momentu izolacji DNA. Genomowe DNA izolowano z każdej próby w trzech powtórzeniach za pomocą zestawu GnenMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit firmy EURX® sp. z o.o. (kat. Nr E3595; wersja zestawu 6.0). W pierwszym etapie procedury aktywowano minikolumny ze złożem z użyciem buforu aktywującego (Buffer P). Homogenizację tkanki wykonano przy użyciu moździerza oraz ciekłego azotu. Zhomogenizowaną tkankę zawieszono w 400µl buforu do lizy komórek (Lyse P) z 3µl Rnazy oraz 10µl proteinazy K. Próby inkubowano w temperaturze 70°C przez 30 minut. Po tym czasie dodawano bufor AC. Inkubację prób przeprowadzono w bloku chłodzącym (temp. 0°C) przez okres 5 minut. Następnie próby wirowano przez 10 minut z prędkością 15 tys. Obrótów na minutę (obr./min.). W następnym kroku odseparowano supernatant w objętości 400µl i przeniesiono go do nowej probówki typu Eppendorf (1ml) i dodano 350µl buforu Sol P oraz 250µl 96% etanolu. Próby ponownie wirowano z prędkością 15 obr./min. Przez minutę. Całą zawartość przeniesiono na kolumny, które następnie dwukrotnie płukano buforem Wash PX Na koniec na złożu nakrapiano bufor Elution (Tris-EDTA), w temperaturze 80°C. Wyizolowane DNA genomowe (100ul/próba), przechowywano w kriopudełkach umieszczonych w temperaturze 4°C lub składowane w temperaturze -20°C.

### *Analizy z wykorzystaniem PCR*

Badania w ramach zadania nr 1 polegały na identyfikacji *loci* genów *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* i *Lr68* za pomocą markerów molekularnych typu SSR (ang. Simple Sequence Repeats – proste sekwencje powtórzone) oraz CAPS (ang. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence – polimorfizm sekwencji powielonej i pociętej). Do analizy markerów SSR (Short Simple Repeats) i CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) zastosowano startery zsyntetyzowane przez firmę MERCK (tabela 2.) zakupione w ramach zaplanowanych kosztów projektu.

**Tabela 2.** Sekwencje starterów markerów genów warunkujących odporność typu slow rust oraz genów głównych odporności na rdzę brunatną Lr19 i Lr24. T.a. – temperatura annealingu.

Lp	Gen	Marker	Typ markera	Sekwencje starterów (5' – 3')		T. a. [°C]	Źródło
				Forward	Reverse		
Markery molekularne genów typu „slow rusting”							
1.	<i>Lr34</i>	<i>csLV34</i>	SSR	GTT GGT TAA GAC TGG TGA TGG	TGC TTG CTA TTG CTG AAT AGT	55	MAS Wheat
2.	<i>Lr46</i>	<i>csLV46G22</i>	CAPS	Sekwencje oraz warunki reakcji otrzymane dzięki współpracy z Prof. E. Lagudah'em Poufne do momentu publikacji wyników			
3.	<i>Lr67</i>	<i>Xcfd71</i>	SSR	CAA TAA GTA GGC CGG GAC AA	TGT GCC AGT TGA GTT TGC TC	60	MAS Wheat
4.		<i>Xcfd23</i>	SSR	TAG CAG TAG CAG CAG CAG GA	GCA AGG AAG AGT GTT CAG CC	60	
5.	<i>Lr68</i>	<i>csGS</i>	SSR	AAG ATT GTT CAC AGA TCC ATG TCA	GAG TAT TCC GGC TCA AAA AGG	60	
6.		<i>cs7BLNLR R</i>	CAPS	GAA GGA GTG CTT CCT CCA CTG	CTT GGT TCT CCT GTT CTT CCC	60	
Markery molekularne genów typu „slow rusting”							
7.	<i>Lr19</i>	<i>Xwmc221</i>	SSR	ACG ATA ATG CAG CGG GGA AT	GCT GGG ATC AAG GGA TCA AT	55	MAS Wheat
8.	<i>Lr24</i>	<i>sr24#12</i>	SSR	CAC CCG TGA CAT GCT CGT A	AAC AGG AAA TGA GCA ACG ATG T	63	

Mieszanię reakcyjną dla reakcji PCR stanowiły:

- 2x PCR TaqNovaHS (Blirt Sp. z o.o.) – bufor w którego skład wchodzi: termostabilną polimerazę typu hot-start (TaqNovaHS), 4mM MgCl<sub>2</sub>; 0,4mM dATP, 0,4mM dCTP, 0,4mM dGTP, 0,4mM dTTP oraz 0,1U/μl polimerazy DNA
- Specyficzne startery (Merck, tabela 2.) o stężeniu 100μM
- Całkowite genomowe DNA badanych mieszańców, o stężeniu 100ng/μl
- Woda do PCR (blirt)

Amplifikację fragmentów DNA przeprowadzono za pomocą termocyklera Sensoquest LabCycler lub BIO-RAD T-100. Warunki amplifikacji zamieszczono w tabeli nr 3. Amplifikacja powtarzano 2-3 krotnie dla każdej próby, aby w dalszej analizie otrzymanych elektroforogramów uwzględnić wyłącznie powtarzalne analizy. Dla markerów CAPS *csLV46G22* (*Lr46*) oraz *cs7BLNLR* (*Lr68*) uzyskane produkty reakcji PCR trawiono enzymami restrykcyjnymi, odpowiednio: BspEI oraz HaeIII. Trawienie przebiegało w obecności 10μl buforu restrykcyjnego (TANGO) i 8 μl sterylnej wody, w kontrolowanych warunkach (termocykler) w temp. 60 st. C przez 1 godzinę.

**Tabela 3.** Profil reakcji PCR dla markerów typu SSR

Warunki reakcji PCR			
Lp.	Temperatura	Czas	Cykle
1	95°C	5min	
2	95°C	30s	35
3	T.a. (Tab. 2)	30s	
4	72°C	1min	
5	72°C	5min	
6	4°C	∞	

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR prowadzono w 1,5% żelu agarozowym (High Resolution Plus; Lab Empire) przez 1 godzinę i 30 minut w urządzeniu (Bio-Rad Wide Mini-Sub Cell GT) o napięciu 100V. Żel agarozowy przygotowano w oparciu o bufor 1xTBE (Lab Empire). Do każdej próby dodawano 1µl barwnika Midori Green Direct (Nippon genetics). Markerem wielkości używanym do reakcji PCR był M50pz DNA Ladder (Blirt). Wizualizację oraz analizę oraz dokumentację elektroforogramów wykonano przy pomocy systemu EZ Gel Doc oraz programu Image Lab 5.2 (Bio-Rad).

#### *Identyfikacja cechy nekrozy końców liści flagowych (Ltn – leaf tip necrosis)*

Cecha nekrozy końców liści flagowych (*Ltn* – leaf tip necrosis) jest charakterystyczna i sprzężona z wszystkimi analizowanymi genami typu slow rusting (Huerta-Espino i in. 2020). Jest to cecha ujawniająca się po kwitnieniu. W celu analizy występowania tej cechy w analizowanej puli 73 genotypów donorowych pszenicy w warunkach polowych (Rolnicze Gospodarstwo Doświadczalne Dłóż) pobierano dziesięć liści z każdego genotypu i poddano analizie wizualnej oraz dokumentacji fotograficznej.



## WYNIKI (temat badawczy 1)

Badania w ramach tematu badawczego nr 1 polegały na identyfikacji *loci czterech genów typu „slow rusting”*: *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* i *Lr68*, u roślin mieszańcowych pszenicy ozimej pokolenia F<sub>1</sub> za pomocą sześciu markerów molekularnych wyselekcjonowanych na bazie wyników w roku 2021 (Załącznik nr 1).

Ponadto genotypy pokolenia F<sub>1</sub> poddane zostaną analizom w celu identyfikacji **dwóch głównych genów** *Lr19* i *Lr24* warunkujących odporność na porażenie przez grzyby z rodzaju *Puccinia*. Analizy przeprowadzone będą w grudniu 2022 r.

Zgodnie z harmonogramem opracowano protokoły reakcji multiplex PCR, które pozwalają jednorazowo zidentyfikować różne kombinacje badanych genów odporności poziomej (*Lr34*, *Lr68*) i dwóch głównych genów odporności (*Lr19* i *Lr24*).

Kontynuowano także analizę występowania cechy nekrozy końców liści (*Ltn*), tj. markera morfologicznego sprzężonego z genami odporności typu „slow rusting”.

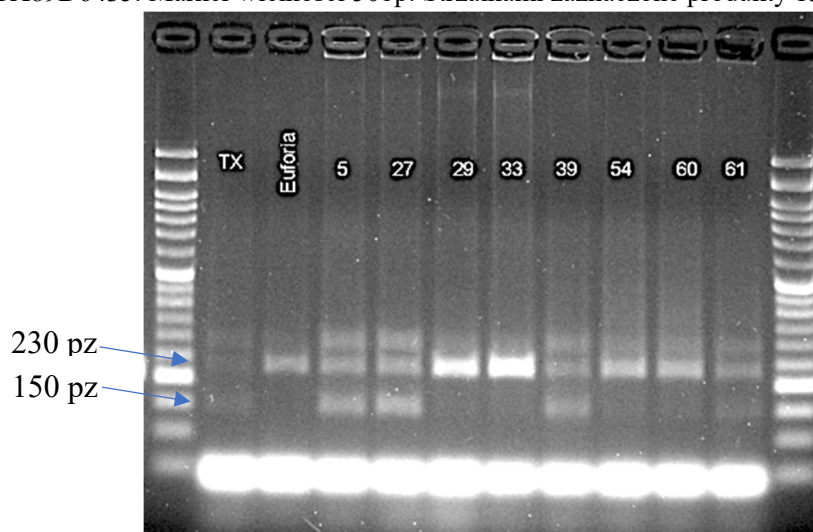
### **1. Identyfikacja loci czterech genów typu „slow rusting” – reakcje z jednym markerem (simplex)**

#### 1.1. Identyfikacja genu *Lr34*

W celu zidentyfikowania *locus* genu *Lr34* wykorzystano marker *csLV34*. Wariant markera *csLV34* (wg. literatury najbardziej efektywny ze względu na bliskie sprzężenie) powiązany z allelem *Lr34res* (warunkującym odporność na porażenie przez grzyby z rodzaju *Puccinia* sp.) charakteryzował się wielkością 150 pz. Z kolei produkt o wielkości ok. 230 pz jest charakterystyczny dla genotypów wrażliwych (*Lr34sus*) (fot. 1). Dla kombinacji Euforia x TX89D6435 przeanalizowano 63 genotypy w dwóch powtórzeniach, z których 47 charakteryzowało się heterozygotycznym układem allelicznym, tj. występowały dwa produkty: 150 pz (odziedziczony od TX89D6435) oraz 230 pz (pochodzący od odmiany Euforia). W pozostałych szesnastu genotypach obserwowano wyłącznie produkt o wielkości 230 pz., co świadczy o braku allelu *Lr34res* warunkującego odporność. Z kolei dla kombinacji Symetria x TX89D6435 przebadano 57 genotypów, spośród których 42 posiadały produkt 150 pz. Krzyżowania odmian Bataja i Karnityda zaowocowały uzyskaniem form mieszańcowych jedynie z komponentem TX89D6435. W przypadku kombinacji Bataja x TX89D6435 uzyskano 58 roślin, z czego u 55 genotypów zidentyfikowano produkt o wielkości 150 pz. Allel ten był także zdiagnozowany u wszystkich roślin (12) kombinacji TX89D6435 x Karnityda.

W grudniu 2022 roku dokończone zostaną analizy dla genotypów z kombinacji: Euforia x Purdue oraz Symetria x TX89D6535.

**Fot. 1.** Przykładowy elektroforogram przedstawiający produkty reakcji PCR z markerem *csLV34* sprzężonego z genem *Lr34*, przeprowadzonej dla wybranych genotypów F<sub>1</sub> kombinacji Euforia x TX89D6435. Marker wielkości 50bp. Strzałkami zaznaczone produkty 150 pz oraz 230 pz.

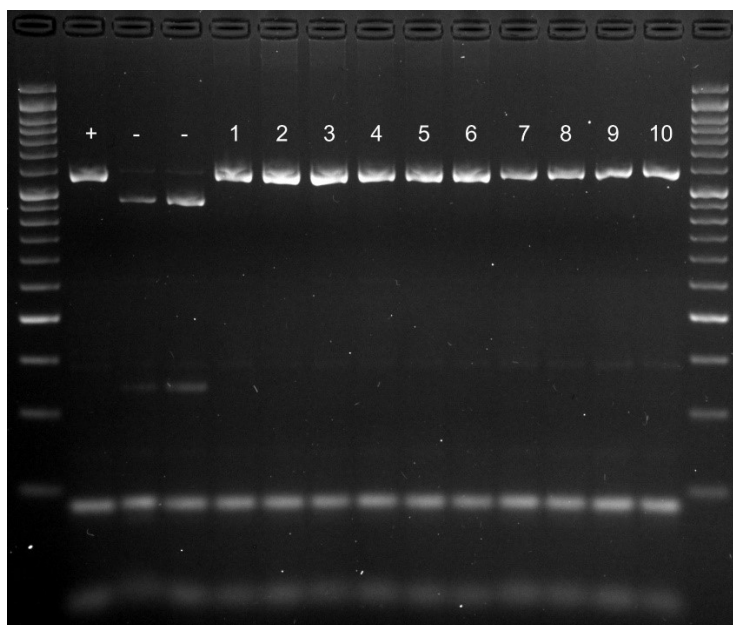


### 1.2. Identyfikacja locus *Lr46*

Dla celów identyfikacji genu *Lr46* markera CAPS *csLV46G22*. W wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym produktu reakcji PCR obserwowano dwa produkty, charakterystyczne dla form posiadających allel *Lr46sus* (podaatny). Brak cięcia, spowodowany polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (SNP – ang. *single nucleotide polymorphism*) w miejscu cięcia enzymu restrykcyjnego skutkuje brakiem fragmentacji produktu reakcji PCR – tj. obecnością jednego prążka. Wszystkie 63 genotypy kombinacji Euforia x TX89D6435 wykazały obecność tylko jednego produktu o wielkości (fot. 2). Świadczy to o braku heterozygotyczności tego locus co jest charakterystyczne dla form mieszańcowych. Wyniki potwierdziły wstępną analizę form akceptorowych i wskazały, że odmiana Euforia jest nosicielem genu *Lr46*. Analogicznie, w analizach dla 70 genotypów mieszańcowych kombinacji Euforia x Purdue obserwowano tylko jeden produkt dla markera *csLV46G22*, co świadczy o obecności allelu *Lr46res* w układzie homozygotycznym. Allel *Lr46res* obecny był także wśród 57 genotypów kombinacji Bataja x TX89D6435, oraz wszystkich genotypów kombinacji Karnityda x TX89D6435.

W grudniu 2022 dokończone będą analizy dla kombinacji Symetria x TX89D6435 oraz Symetria x Purdue.

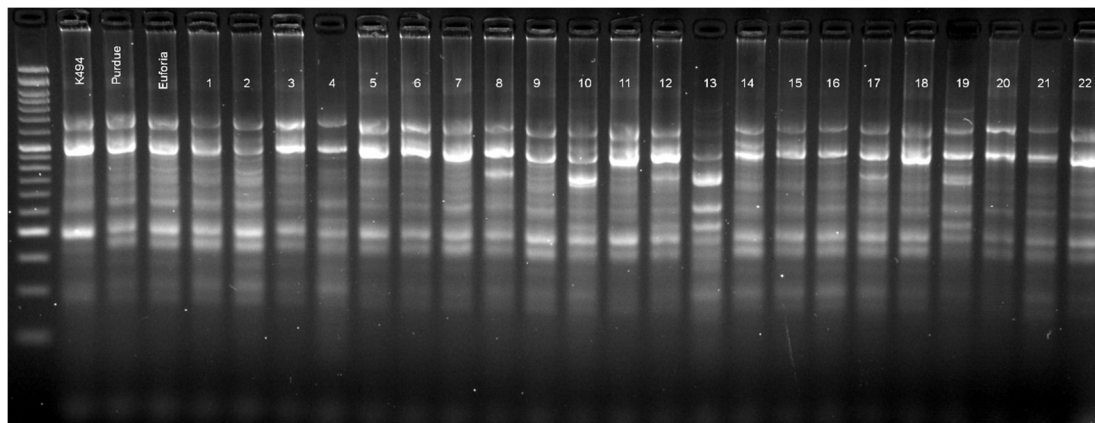
**Fot. 2.** Produkty reakcji PCR z markerem typu CAPS - *csLV46G22* po trawieniu enzymem restrykcyjnym *BspEI*. + - kontrola pozytywna - Pavon76; - kontrola negatywna – Artigast oraz Thatcher. 1-10 - analizowane genotypy kombinacji Euforia x TX89D6435.



### 1.3. Identyfikacja locus *Lr67*

Identyfikacja locus genu *Lr67* została wykonana przy użyciu dwóch markerów flankujących typu SSR: *Xcfd71* oraz *Xcfd23* (fot. 3). W 70 genotypach kombinacji Euforia x Purdue zidentyfikowano produkty reakcji PCR dla obu markerów, które są charakterystyczne zarówno dla allelu *Lr67res*, jak i *Lr67sus*, co świadczy o heterozygotycznym układzie allelicznym, charakterystycznym dla form mieszańcowych. Co warte podkreślenia, taki sam układ obserwowano u odmiany rodzicielskiej Euforia. W grudniu 2022 roku dokończone zostaną analizy dla pozostałych kombinacji.

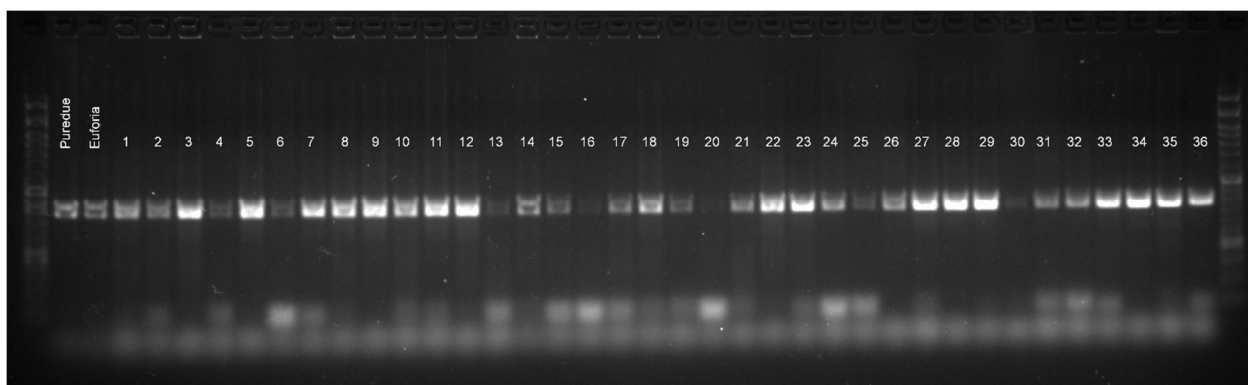
**Fot. 3.** Elektroforogram przedstawiający produkty reakcji PCR dla markera *Xcfd23* u genotypów kombinacji Euforia x TX89D6435



#### 1.4. Identyfikacja *locus Lr68*

W celu identyfikacji allelu *Lr68res*, warunkującego odporność typu slow-rusting, użyto jednego markera typu SSR (*csGS*) oraz jednego markera typu CAPS (*cs7BLNLRR*) (fot. 4). Analizy PCR z wykorzystaniem markera *csGS* wykazały, że wariant genu, który warunkuje odporność znajdował się u wszystkich 70 badanych genotypów mieszańcowych kombinacji Euforia x Purdue. Podobne wyniki uzyskano stosując marker typu CAPS. W tym przypadku także wszystkie genotypy wykazały obecność wariantu *Lr68res*. W grudniu 2022 roku dokończone zostaną analizy dla pozostałych kombinacji.

**Fot. 4.** Elektroforogram przedstawiający produkty reakcji PCR dla markerów *csGS Xcfd23* u genotypów kombinacji Euforia x TX89D6435



#### 1.5. Obserwacje nekrozy końcówek liści (LTN)

Dodatkowo przeprowadzono obserwacje nekrozy końcówek liści (LTN), cechy sprzężonej z genami odporności typu slow rusting, a dokładniej z genami: *Lr34 (Ltn1)*, *Lr46 (Ltn2)*, *Lr67 (Ltn3)* oraz *Lr68 (Ltn4)*. W puli 73 genotypów donorowych pszenicy w warunkach polowych (Rolnicze Gospodarstwo Doświadczalne Dłóż) pobierano dziesięć liści z każdego genotypu i poddano analizie wizualnej oraz dokumentacji fotograficznej. Wyniki były tożsame z rezultatami obserwacji w roku ubiegłym. Charakterystyczne nekrozy końcówek liści obserwowano u 48 badanych genotypów (fot. 5., tab. 4).

**Fot. 5.** Nekroza końca liścia flagowego (*Ltn*) w analizowanych genotypach pszenicy ozimej



**Tabela 4.** Występowanie nekrozy końcówek liści flagowcy dla 10 losowo wybranych roślin z 73 genotypów donorowych pszenicy w roku 2022 w porównaniu do roku 2021.

Nr	Odmiana/Genotyp	Numer referencyjny	LTN 2021	LTN 2022									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Ceruga-4	PI 560118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	San Martin	PI 116314	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	H 51	PI 191925	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	Artigas	PI 192535	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.	Larranaga	PI 191713	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	ProINTA Imperial NIL Glu-B3i_BuckManant.	PI 674008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7.	NP 818	PI 422294	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8.	Buck Manantial	PI 344455	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.	Janz	PI 591910	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10.	7536K-51A4	PI 553001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	7531-V3D	PI 552994	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12.	Jacui	PI 520498	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.	P8802-C1*3A2C16	PI 596351	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14.	P8802-C1*3A2A2U	PI 596350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.	HD 2329	PI 648391	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

16.	K494	PI 250413	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.	Glenlea	Cltr 17272	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18.	Artigas	PI 73046	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19.	Amurskaya 90	PI 592036	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20.	Lerma Rojo	Cltr 13651	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21.	363-11	PI 527696	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22.	256-3	PI 527695	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23.	NP 846	PI 322263	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24.	75M-505-001-001	PI 556464	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25.	7531-AP5A	PI 552997	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26.	7531-AG5B	PI 552996	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27.	7531-AG5A	PI 552995	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28.	CM 46725-3P-1P-3P-2P	PI 520562	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29.	Cook	PI 442900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30.	PAT 7219	PI 422416	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31.	HI 617	PI 422283	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32.	Oxley	PI 386167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33.	NP 718	PI 322236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34.	San Martin	PI 104137	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35.	A99AR	PI 600923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36.	Klein San Martin	PI 191884	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37.	H 51	PI 184512	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38.	San Martin	PI 117500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39.	San Martin	Cltr 8437	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40.	Record	Cltr 8399	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

41.	Frontana	Cltr 12470	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42.	Chris	Cltr 13751	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43.	ROD	PI 191772	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44.	Frontana 3671	PI 193932	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45.	Frontana LF 320	PI193933	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46.	Frontana LF 321	PI193934	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47.	Fronthatch-1	PI 290745	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48.	Fronthatch-2	PI 297014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49.	Fronthatch-3	PI 299419	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50.	Toropi	PI 344200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51.	Frontaleza	PI 351779	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52.	Sparrow	PI 519725	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53.	Pavon F76	PI 519847	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
54.	Pavon 76	PI 520003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55.	Pavon	PI 520054	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56.	Pavon	PI 520172	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57.	Myna	PI 520340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
58.	Junco	PI 519947	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
59.	Tanager	PI 519878	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60.	Parula	PI 520340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
61.	Rayon 89	PI 591786	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62.	Cumpas 88	PI 591786	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
63.	Mochis 88	PI 591791	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

64.	P8901-AP	PI 613175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65.	P8901-AQ	PI 613176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66.	Tlaxcala F2000	PI 619634	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67.	Lr34	GSTR 433	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68.	IWA8608696	PI 624623	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69.	Anza	PI 638742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70.	UC1110	PI 671999	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
71.	Kern	PI 672001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
72.	TX89D6435	PI 584759	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
73.	Purdue	Cltr 13227	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## 2. Opracowanie multiplex PCR

Celem badań było opracowanie warunków reakcji multiplex PCR do detekcji genów odporności poziomej typu „slow rusting” *Lr34* i *Lr68* oraz genów głównych, warunkujących odporność typu pionowego warunkowanej genami *Lr19* oraz *Lr24* a także dodatkowo *Lr26* i *Lr38* w pszenicy (załącznik 3). W wyniku badań opracowano warunki reakcji multiplex PCR dla trzynastu wariantów symultanicznej detekcji genów typu „slow rusting” oraz genów głównych (tab. 5).

**Tabela 5.** Warianty symultanicznej detekcji genów typu „slow rusting” oraz genów głównych

No	Combination	Concentrations [ $\mu$ M] of each pair of primers	Annealing temperature
C1	<i>Lr19</i> + <i>Lr34</i>	0.8 + 0.8	55 °C
C2	<i>Lr24</i> + <i>Lr34</i>	0.8 + 0.8	
C3	<i>Lr19</i> + <i>Lr24</i> + <i>Lr34</i>	0.96 + 0.48 + 0.96	
C5	<i>Lr19</i> + <i>Lr34</i> + <i>Lr68</i>	0.67 + 0.67 + 0.67	
C6	<i>Lr19</i> + <i>Lr24</i> + <i>Lr34</i> + <i>Lr68</i>	0.67 + 0.4 + 1.12 + 0.67	
C7	<i>Lr19</i> + <i>Lr26</i>	0.8 + 0.8	
C8	<i>Lr24</i> + <i>Lr26</i>	0.8 + 0.8	
C9	<i>Lr19</i> + <i>Lr24</i> + <i>Lr26</i>	0.8 + 0.8 + 0.8	
C10	<i>Lr19</i> + <i>Lr26</i> + <i>Lr38</i>	0.8 + 0.8 + 0.8	
C11	<i>Lr24</i> + <i>Lr26</i> + <i>Lr38</i>	0.56 + 1.04 + 0.8	
C12	<i>Lr19</i> + <i>Lr24</i> + <i>Lr26</i> + <i>Lr38</i>	0.8 + 0.48 + 1.12 + 0.8	
C13	<i>Lr19</i> + <i>Lr24</i> + <i>Lr26</i> + <i>Lr34</i> + <i>Lr68</i>	0.8 + 0.48 + 1.12 + 1.12 + 0.8	



Optymalizacja metody PCR w celu zaprojektowania reakcji multipleksowego PCR składała się z trzech faz: 1) selekcji efektywnych, dostępnych markerów molekularnych dla *Lr19*, *Lr24*, *Lr34* i *Lr68*, których rozmiary ampliconów pozwalają na rozróżnienie poszczególnych alleli w multipleksie analiza; 2) dopasowanie wspólnych temperatur przyłączania za pomocą gradientowego PCR; oraz 3) manipulowanie stężeniami starterów w celu uzyskania łatwego do interpretacji wzoru prążkowania na żelu.

#### 1) Wybór starterów

Analizie poddano wszystkie markery analizowane w ramach projektu. Testy Multiplex PCR obejmują dużą liczbę starterów; stąd konieczne jest, aby projektowany starter miał odpowiednią długość co warunkuje specyficzność i unikalność. W badaniach zastosowano startery o długości w zakresie 18-22 zasad (tab. 6). Wybrano zestawy starterów, które w reakcji PCR generują amplicony o odpowiedniej wielkości produktu, które można łatwo rozróżnić za pomocą standardowej elektroforezy w żelu agarozowym.

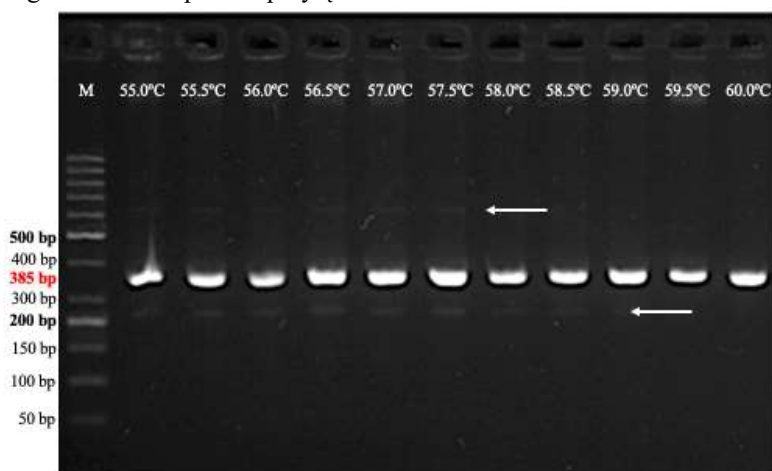
**Tabela 6.** Startery użyte do symultanicznej detekcji genów typu „slow rusting” oraz genów głównych

<b>Gene – Marker</b>	<b>Primers sequences</b>	<b>Annealing temperature*</b>	<b>Product amplified</b>
<i>Lr19 – Xwmc221</i>	F: ACGATAATGCAGCGGGGAAT R: GCTGGGATCAAGGGATCAAT	61°C	200 bp (+) 220 bp (-)
<i>Lr24 – Sr24#12</i>	F: CACCCGTGACATGCTCGTAR: AACAGGAAATGAGCAACGATGT	65°C	500 bp (+)
<i>Lr26 – P6M12</i>	F: GTACTAGTATCCAGAGGTCACAAG R: CAGACAAACAGAGTACGGGC	57°C	260/360 bp (+)
<i>Lr38 – Xwmc773</i>	F: GAGGCTTGCATGTGCTTGA R: GCCAACTGCAACCGGTACTCT	61°C	140/160 bp (+)
<i>Lr34 – csLv34</i>	F: GTTGGTTAAGACTGG TGA TGG R: TGCTTGCTATTGCTGAATAGT	55°C	150 bp (+) 230 bp (-)
<i>Lr68 - csGs</i>	F: AAG ATT GTT CAC AGA TCC ATG TCA R: GAG TAT TCC GGC TCA AAA AGG	60°C	385 bp (+)

## 2) Temperatura przyłączania starterów

Kolejnym krokiem była analiza interakcji między zestawami starterów w przebiegu multipleksowej reakcji PCR. Stosowano startery o podobnej temperaturze topnienia ( $T_m$ ), pomiędzy 55°C-65°C (tab. 6). W związku z tym przeprowadzono dalsze podejścia w celu przetestowania odpowiednich temperatur przyłączania starterów za pomocą gradientu termicznego (fot. 6). Zmienność  $T_m$  między 5°-10°C była dopuszczalna dla starterów stosowanych w puli, stąd zastosowaliśmy najniższą temperaturę hybrydyzacji (55°C) dla wszystkich kombinacji (tab. 5). Jednak niższe temperatury hybrydyzacji dały pewne niespecyficzne produkty (fot. 6), które zostały wyeliminowane przez modyfikację stężeń starterów w następnym etapie. Wspólna temperatura przyłączania starterów pozwoliła na opracowanie sześciu kombinacji markerów, które pozwalają na symultaniczną detekcję ww. genów.

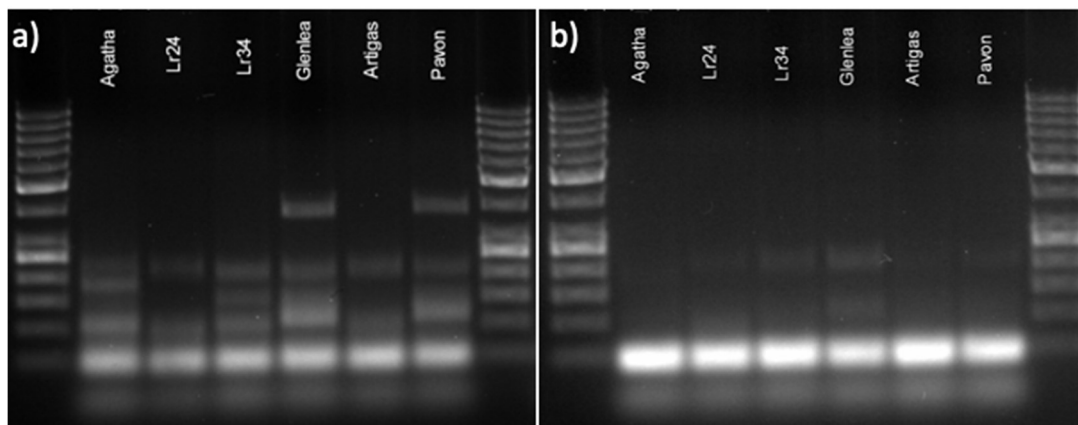
Fot. 6. Reakcja PCR w gradiencie temperatur przyłączania starterów.



## 3) Rozmiar produktów PCR

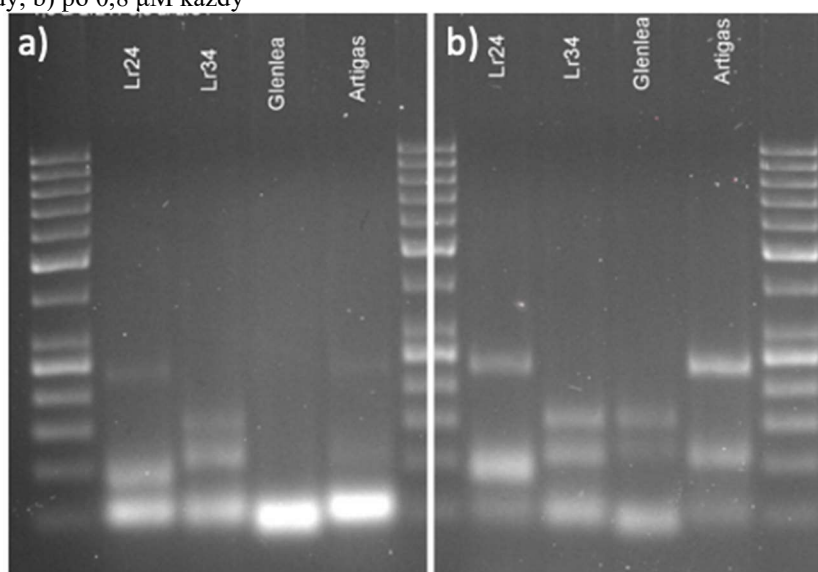
Istotnym aspektem projektowania reakcji typu multipleks PCR jest specyficzność starterów do sekwencji docelowych biorąc pod uwagę, iż współzawodnictwo istnieje, gdy wiele sekwencji docelowych znajduje się w jednym naczyniu reakcyjnym. Najpierw przeprowadzono reakcje multipleksowe, dodając startery w równomolowych stężeniach - 1  $\mu$ M każdy. Wyniki sugerowały, że poszczególne stężenia starterów wymagają dalszych modyfikacji. W przypadku loci *Lr24* proces dostosowania testu multipleksowego zainicjowano markerem *Xbarc71*, który daje produkty o wielkości 103 lub 85 pz, połączone odpowiednio z opornymi lub wrażliwymi allelami. Jednak startery *Xbarc71* wraz ze starterami innych markerów zapewniły fałszywe amplikony lub interakcje starter-amplikon (ryc. 7a) lub fałszywą amplifikację z powodu dimerów starterów (ryc. 7b).

**Fot. 7.** Elektroforogram multipleksowej reakcji PCR dla markerów *Xbarc71* (*Lr24*) i *csLv34* (*Lr34*) prezentujący: a) fałszywe amplikony lub interakcje starter-amplikon; b) fałszywą amplifikację z powodu dimerów starterów. GeneRuler 50bp DNA Ladder został użyty jako wzorzec/drabinka DNA do porównania różnych wzorów prążków.

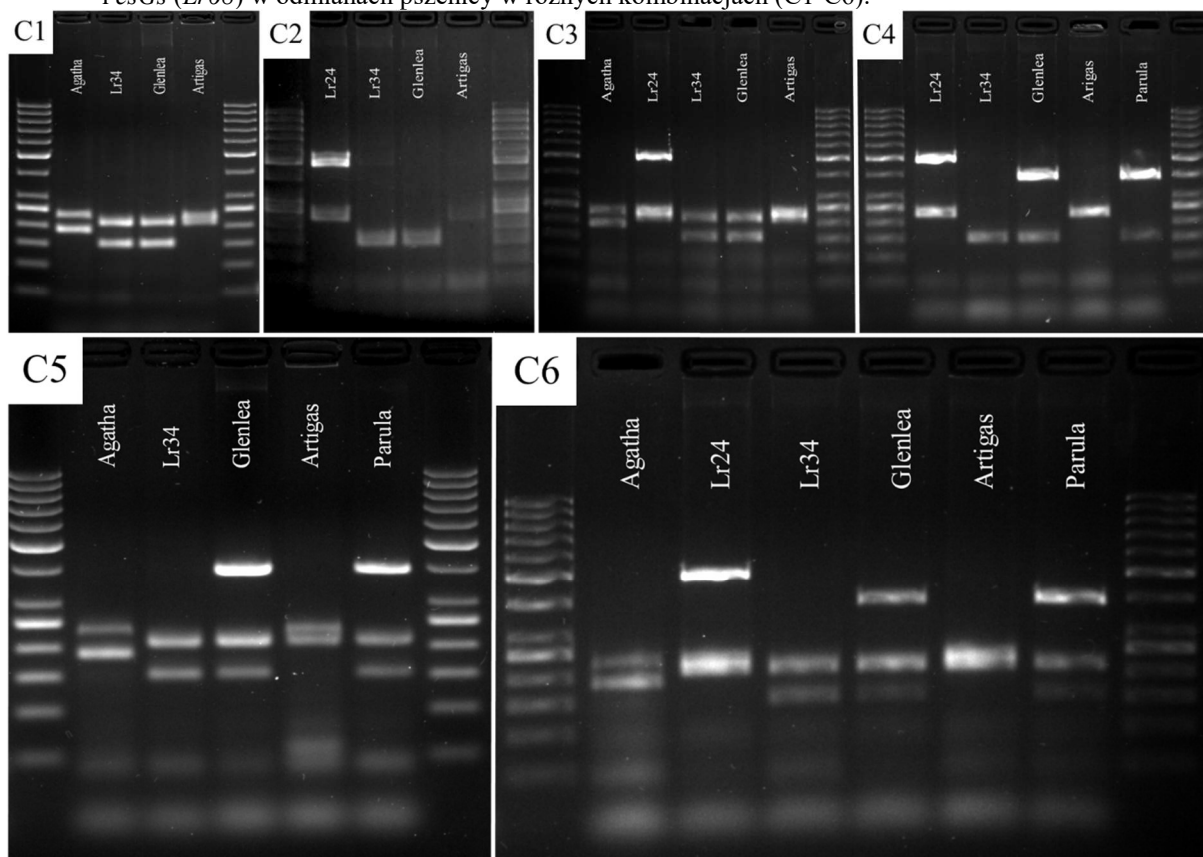


Wszystkie podejścia zawiodły, więc do identyfikacji loci *Lr24* wybrano inny marker, *Sr24#12*. Jednak reakcje PCR z więcej niż dwoma zestawami starterów skutkowały nierównomierną amplifikacją, z niektórymi produktami słabo widocznymi lub nawet nieobecnymi (fot. 8). Aby pokonać te przeszkody, przeprowadziliśmy zestaw eksperymentów PCR z różnymi proporcjami starterów w reakcji. Końcowe stężenie starterów mieściło się w zakresie 0,4 – 1,5  $\mu\text{M}$ . Ogólnie modyfikacja mieszaniny PCR polegała na zwiększeniu stężenia starterów dla sygnałów skąpych prążków lub zmniejszeniu stężenia starterów dla silnych prążków (ryc. 7a, b). Powyższe warianty protokołu PCR pozwoliły na wykonanie łatwych do interpretacji wyników multipleksowych reakcji PCR dla sześciu kombinacji starterów (fot. 9 -11).

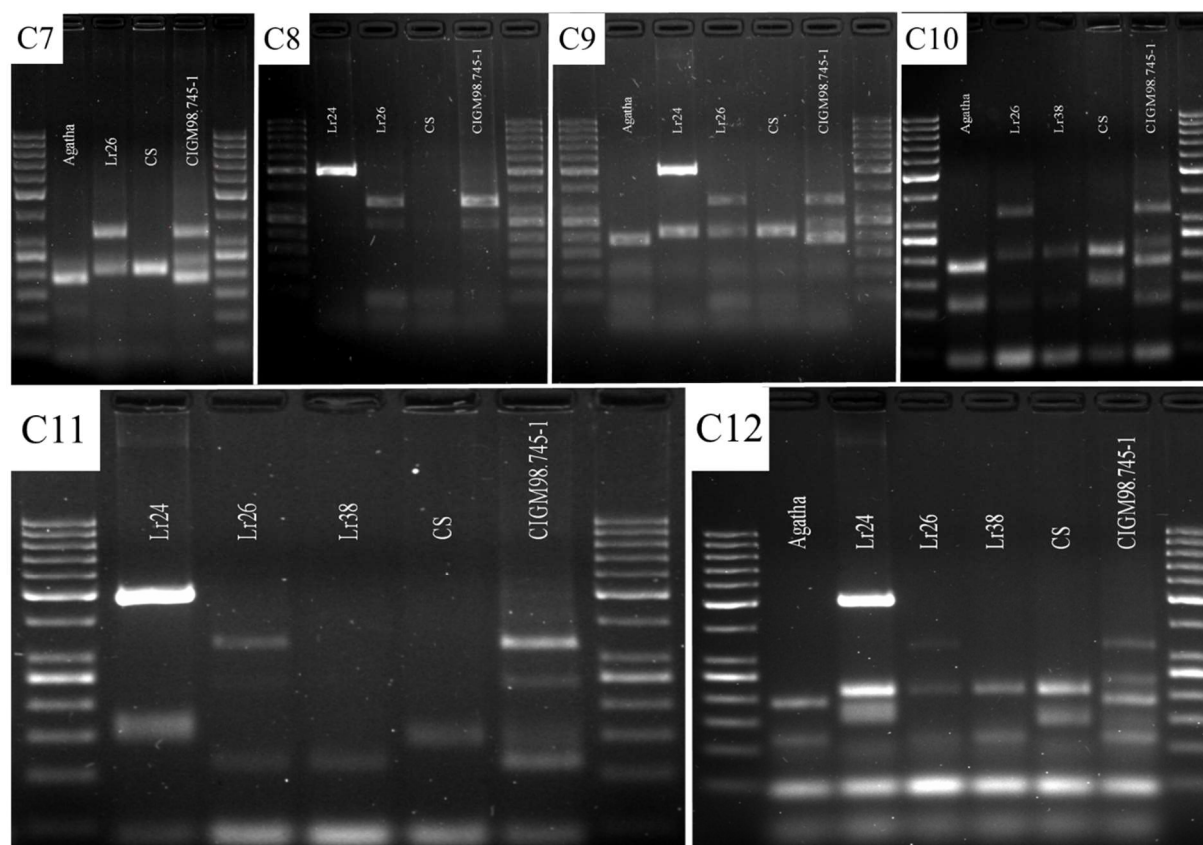
**Fot. 8.** Modyfikacja stężenia starterów dla *Xbarc71* (*Lr24*) i *csLv34* (*Lr34*). a) początkowe stężenia starterów po 1  $\mu\text{M}$  każdy; b) po 0,8  $\mu\text{M}$  każdy



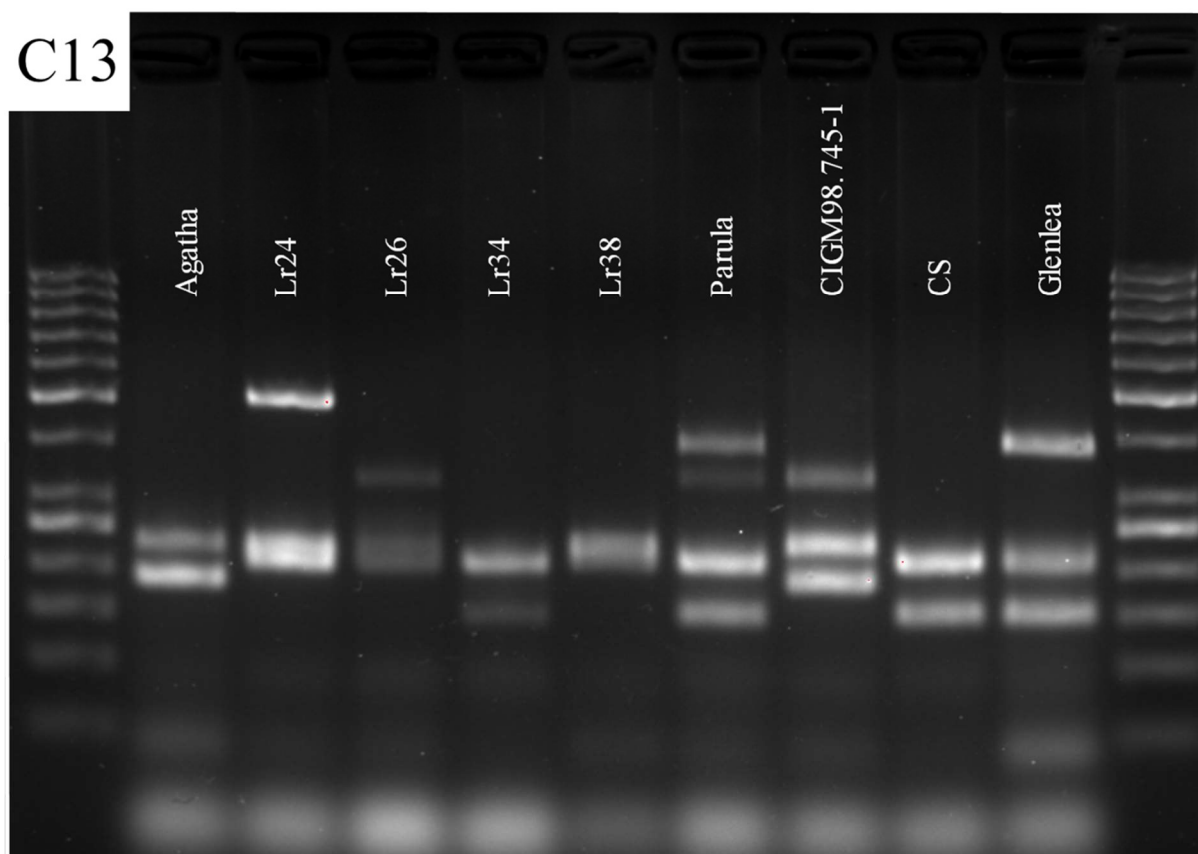
**Fot. 9.** Elektroforogram przedstawiający obecność markerów: *Xwmc221* (dla *Lr19*), *Sr24#12* (*Lr24*), *csLv34* (*Lr34*) i *csGs* (*Lr68*) w odmianach pszenicy w różnych kombinacjach (C1-C6).



**Fot. 10.** Elektroforogram przedstawiający obecność markerów: *Xwmc221* (dla *Lr19*), *Sr24#12* (*Lr24*), *P6M12* (*Lr26*) i *Xwmc773* (*Lr38*) w odmianach pszenicy w różnych kombinacjach (C7-C12).



**Fot. 11.** Elektroforogram przedstawiający obecność markerów: *Xwmc221* (dla *Lr19*), *Sr24#12* (*Lr24*), *P6MI2* (*Lr26*), *csLv34* (*Lr34*) i *csGs* (*Lr68*) w odmianach pszenicy w kombinacji C13.



## DYSKUSJA (Temat badawczy 1)

Analizy simplex PCR, tj. analizy PCR z użyciem pojedynczych markerów pozwoliły określić obecność badanych alleli genów odporności typu „slow rusting” w otrzymanych genotypach mieszańcowych. Co ciekawe, jeden z genotypów akceptorowych, w postaci odmiany Euforia, charakteryzował się obecnością genów *Lr46*, *Lr67* oraz *Lr68*. Wyjaśnia to ponadprzeciętną trwałość odporności tej odmiany, obserwowanej w ostatnich latach. Jednakże odmiana Euforia nie posiada genu *Lr34*, który jest do tej pory najlepiej poznanym i najbardziej efektywnym genem warunkującym odporność typu poziomego. Dotychczas, gen *Lr34* został uznany za źródło trwałej i rasowo niespecyficznej odporności na rdzę brunatną, żółtą, żdźbłową oraz mączniaka prawdziwego. Gen ten został sklonowany a sekwencja poznana. Koduje on transporter wiążący ATP (tzw. *ABC transporter – ATP Binding Cassette transporter*). Jest to wielodomenowe białko błonowe, wykorzystujące energię z hydrolizy ATP do translokacji substancji przez błonę komórek wszystkich organizmów żywych. Dlatego też gen *Lr34* jest powszechny we wszystkich odmianach pszenicy heksaploidalnej, w kilku wariantach allelicznych. Allel zapewniający odporność (*Lr34res*) różni się od powszechnie obecnego w

pszenicy allelu *Lr34sus* trzema mutacjami typu SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu – ang. *single nucleotide polymorphism*) w intronie 4 oraz egzonach 11 i 12 sekwencji genu *Lr34*. Cechą charakterystyczną działania tego allelu jest podwyższenie odporności na infekcję niezależnie od rasy i rodzaju patogena. Udowodniono, że każdy z wyżej opisanych genów powoduje spowolnienie infekcji patogena i w konsekwencji obniżenie stopnia porażenia. Dlatego też jednym z celów projektu jest stworzenie kombinacji (piramid genowych) zawierających zarówno geny odporności typu pionowego i poziomego.

Kluczowym, tegorocznym osiągnięciem jest opracowanie zestawu trzynastu multipleksowych kombinacji markerów PCR, które można zastosować w procesie selekcji wspomaganiej markerami. Opracowaliśmy protokoły multipleksowego PCR dla najskuteczniejszych głównych genów (*Lr19*, *Lr24*, *Lr26* i *Lr38*) oraz genów typu „slow rusting”: *Lr34* i *Lr68*, które zapewniają trwałą odporność pszenicy. Optymalizacja multipleksowego PCR jest wymagającą procedurą, która opiera się głównie na metodzie prób i błędów. W literaturze tylko nieliczne publikacje omawiają proces opracowywania protokołu multipleksowego PCR (Chamberlain i Chamberlain, 1994; Edwards i Gibbs, 1994; Henegariu i in., 2018). Początkowym rozwiązaniem trudności napotkanych przy opracowywaniu multipleksowej reakcji PCR było zastosowanie polimerazy typu „Hot Start” (Chou i in., 1992). Ten typ enzymu eliminuje reakcje niespecyficzne (zwłaszcza wytwarzanie dimerów starterów) spowodowane przyłączeniem starterów w niskiej temperaturze (4 do 25°C) przed rozpoczęciem konkretnych cykli reakcji. Dlatego w naszych badaniach zastosowaliśmy polimerazę OptimaHotStart, która jest aktywowana tylko wtedy, gdy mieszanina reakcyjna jest ogrzewana do około 95°C przez 10 min (pierwszy etap denaturacji). Pierwsze cykle mają istotny wpływ na ogólną czułość i swoistość PCR. Powodzenie specyficznej amplifikacji zależy od hybrydyzacji starterów do matrycy DNA i szybkości, z jaką hybrydyzowane startery są wydłużane wzdłuż pożądanej sekwencji. Optymalne wyżarzanie zależy od długości startera i zawartości GC oraz ich stężeń, a także od temperatury przyłączenia (Chamberlain i Chamberlain, 1994). Zatem większość modyfikacji mających na celu poprawę wydajności reakcji PCR była ukierunkowana na czynniki wpływające na szybkość renaturacji i/lub wydłużania. Optymalizacja multipleksowych PCR może stwarzać kilka przeszkód, w tym słabą czułość lub specyficzność i/lub preferencyjną amplifikację pewnych specyficznych sekwencji (Polz i Cavanaugh, 1998). Obecność więcej niż jednej pary starterów w multipleksowym PCR zwiększa szansę na uzyskanie fałszywych produktów amplifikacji, głównie z powodu tworzenia się dimerów starterów (Brownie i in., 1997). W przypadku naszego eksperymentu z markerami *Lr24* i *Lr34* te niespecyficzne produkty amplifikowano wydajniej niż oczekiwane amplikony. Zatem optymalizacja multipleksowego PCR powinna mieć na celu zminimalizowanie lub zmniejszenie takich niespecyficznych interakcji. Można to osiągnąć



poprzez wykorzystanie starterów o prawie identycznych, optymalnych temperaturach przyłączania (długość startera od 18 do 30 bp lub więcej i zawartość GC od 35 do 60% może okazać się zadowalająca) i nie powinny wykazywać znaczącej homologii ani wewnątrz, ani między sobą (Henegariu i in., 2018). Modyfikacje, w tym stężenia starterów, jak również innych składników PCR, takich jak PCR, dNTP i stężenia enzymów w multipleksowym PCR, w stosunku do tych w zwykłych reakcjach simplex PCR, zazwyczaj skutkują niewielką poprawą swoistości testu. Zwiększanie stężenia tych czynników może zwiększać prawdopodobieństwo wytwarzania fałszywych, niespecyficzných produktów amplifikacji. Jednak optymalizacja tych składników w multipleksowych PCR, które są zaprojektowane do jednoczesnej amplifikacji wielu celów, może okazać się korzystna. Na przykład w multipleksowym PCR do jednoczesnego wykrywania pszenicy i soi zastosowano różne stosunki stężeń starterów do analizy 21 różnych komercyjnych produktów spożywczych (Shin i in., 2021). Multipleksowy PCR znajduje szerokie zastosowanie w branży hodowli roślin do wysokowydajnego genotypowania i selekcji wspomaganą markerami (MAS – ang. *Marker Assisted Selection*) (Yap i in., 2016) oraz identyfikacji organizmów zmodyfikowanych genetycznie (Bak i Emerson, 2019). Jest to szybka metoda, która pozwala również obniżyć koszty badań i skrócić czas trwania eksperymentu. Na przykład Skowrońska i in. (2019) opublikowała protokół wspólnej identyfikacji *Lr34* i *Lr46*, a później udoskonaliła protokół, dodając marker molekularny powiązany z innym genem powolnego rdzewienia, *Lr68* (Skowrońska et al. 2020). Co więcej, Lata i in. (2021) zoptymalizowali multipleksową reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) do jednoczesnego wykrywania dwóch ważnych genów odporności na rdzę liści: genu odporności siewek *Lr24* i typu „slow rusting” *Lr68*.

Podsumowując, w bieżącym roku sprawozdawczym analizom poddano **1500 prób** (miernik nr 1) pod kątem identyfikacji **6 genów** (miernik nr 2) za pomocą **8 markerów** (miernik nr 3). Ponadto, zoptymalizowano i opracowano 13 kombinacji multipleksowych warunków PCR do jednoczesnej identyfikacji markerów powiązanych zarówno z efektywnymi genami specyficznymi dla rasy (*Lr19*, *Lr24*, *Lr26* i *Lr38*), jak i trwałymi, nieswoistymi genami odporności liści (*Lr34* i *Lr68*). Protokoły te mogą być wykorzystane do przyspieszenia hodowli odpornościowej pszenicy zwyczajnej wspomaganą markerami, co odpowiada najnowszym oczekiwaniom hodowców.

#### **Literatura (temat badawczy 1):**

Bak A, Emerson JB (2019) Multiplex quantitative PCR for single-reaction genetically modified (GM) plant detection and identification of false-positive GM plants linked to Cauliflower mosaic virus (*CaMV*) infection. BMC Biotechnol 19:73. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0571-1>

Brownie J., Shawcross S., Theaker J., Whitcombe D., Ferrie R., Newton C., Little, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research*, 25(16), 3235–3241. <https://doi.org/10.1093/NAR/25.16.3235>

Chamberlain, J. S., & Chamberlain, J. R. (1994). Optimization of Multiplex PCRs. In: *The Polymerase Chain Reaction*. Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (eds). Birkhäuser, Boston, MA. pp.38-46. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0257-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0257-8_3)

Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J., & Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20(7):1717–1723. <https://doi.org/10.1093/NAR/20.7.1717>

Edwards, M. C., & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: Advantages, development, and applications. *Genome Research*, 3(4):S65-S75. <https://doi.org/10.1101/GR.3.4.S65>

Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (2018). Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques* 23(3): 504-511

Lata C, Kumar A, Gangwar OP, Prasad P, Adhikari S, Kumar S, Kulshreshtha N, Bhardwaj SC (2021) Multiplex PCR assay for the detection of *Lr24* and *Lr68* in salt tolerant wheat genotypes. *Cereal Res Commun*. <https://doi.org/10.1007/s42976-021-00218-1>

Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 3724–3730.

Shin, J., Kim, M. J., & Kim, H. Y. (2021). Development of triplex PCR for simultaneous detection of soybean and wheat. *Food Science and Biotechnology*, 30(6): 801. <https://doi.org/10.1007/S10068-021-00926-8>

Skowrońska R, Tomkowiak A, Szwarc J, Nawracała J, Kwiatek M. (2020). Multiplex PCR assay for simultaneous identification of slow rust resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Protection Research* 60(4): 388-398. [doi.org/10.24425/jppr.2020.134914](https://doi.org/10.24425/jppr.2020.134914)

Skowrońska R., Kwiatek M., Tomkowiak A., Nawracała J. (2019) Development of multiplex PCR to detect slow rust resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *Journal of Applied Genetics* 60(3): 301-304. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z>

Yap R, Hsu YC, Wu YP, Lin YR, Kuo CW (2016) Multiplex PCR genotyping for five bacterial blight resistance genes applied to marker-assisted selection in rice (*Oryza sativa*). *Plant Breed*, 135(3):309-317. <https://doi.org/10.1111/pbr.12368>



## WNIOSKI (Temat badawczy 1)

1. Markery molekularne pozwoliły wyselekcjonować genotypy posiadające dwa lub więcej alleli genów warunkujących odporność typu „slow rusting” pośród form mieszańcowych pokolenia F<sub>1</sub>.
2. Odmiana Euforia, charakteryzowała się obecnością genów *Lr46*, *Lr67* oraz *Lr68* a w wyniku przeprowadzonych badań, jej pula genetyczna została poszerzona o gen *Lr34*.
3. Optymalizacja metody PCR w celu zaprojektowania reakcji multipleksowego PCR wymaga następujących kroków:
  - a. selekcji efektywnych, dostępnych markerów molekularnych dla *Lr19*, *Lr24*, *Lr34* i *Lr68*, których rozmiary amplikonów pozwalają na rozróżnienie poszczególnych alleli w multipleksie;
  - b. dopasowanie wspólnych temperatur przyłączania za pomocą gradientowego PCR;
  - c. manipulowanie stężeniami starterów w celu uzyskania łatwego do interpretacji wzoru prążkowania na żelu.
4. Opracowane trzynaście wariantów multipleks PCR okazały się być skuteczne w identyfikacji genotypów charakteryzujących się piramidyzacją genów typu „slow rusting” w analizowanej puli genotypów.
5. Dwuletnie obserwacje morfologicznego markera *Ltn* (nekroza końcówek liści), który jest sprzężony z *loci*: *Lr34 (Ltn1)*, *Lr46 (Ltn2)* *Lr67 (Ltn3)* oraz *Lr68 (Ltn4)* wykazały, iż obserwowana cecha jest stałym markerem obecność alleli warunkujących odporność.
6. Ostateczne potwierdzenie odporności warunkowanej przez zidentyfikowane *loci* za pomocą markerów molekularnych musi być oparta o wyniki ekspresji tych genów oraz wyniki obserwacji polowych (temat badawczy 2).

### Mierniki dla tematu badawczego 1:

Lp.	miernik <sup>2</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba prób DNA	1500	1500
3.	Liczba badanych genów	6	6
4.	Liczba analizowanych markerów	8	8

<sup>2</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

### 3.2 Temat badawczy 2

Analizy qPCR i ddPCR 150 prób pobranych z pięciu genotypów mieszańcowych F<sub>1</sub>

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu badawczego 2 jest analiza różnic w ekspresji genu *Lr34*, genów kandydujących *Lr46* oraz genu *Lr67* odpowiedzialnych za zróżnicowaną odporność na rdzę brunatną form mieszańcowych F<sub>1</sub> powstałych z przekrzyżowania odmiany Glenlea z genotypami pochodzącymi z polskich spółek hodowlanych.

**Zaplanowany cel nie został w pełni zrealizowany stan na (5.12.2022r.)**

Do końca grudnia 2022 r. zostaną ukończone analizy qPCR

**Materiały i metody** (Temat badawczy 2)

#### **Materiał roślinny**

Materiałem roślinnym użytym do badań było 5 mieszańców pokolenia F<sub>1</sub> powstałych z przekrzyżowania odmiany referencyjnej Glenlea z wybranymi genotypami pochodzącymi z polskich firm hodowlanych (Tab. 1).

Tabela 1. Materiał roślinny

<b>Polska firma hodowlana</b>	<b>Genotyp referencyjny</b>	<b>Genotyp z firmy hodowlanej</b>
Danko	Glenlea	Itaka
Strzelce	Glenlea	Aura
MHR	Glenlea	Harenda
MHR	Glenlea	Jutrzenka
Smolice	Glenlea	Merkawa

**Metody** (Temat badawczy 2)

Założenie doświadczenia z mieszańcami pokolenia F<sub>1</sub> w kontrolowanych warunkach w fitotronie oraz w warunkach polowych (na poletkach należących do firm hodowlanych). Inokulacja w fitotronie pokolenia mieszańcowego F<sub>1</sub> zarodnikami grzyba z rodzaju *Puccinia*

Rośliny mieszańcowe F<sub>1</sub> poddano ocenie stopnia porażenia przez rdzę brunatną w doświadczeniu, w fitotronowych oraz sześciu lokalizacjach (5 mieszańców F<sub>1</sub> × 3 powtórzenia × 6 lokalizacji = 90 obiektów doświadczalnych.) na terenie kraju:

- \* RGD Dłoń, UP w Poznaniu
- \* Lokalizacja wskazana przez firmę Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o.
- \* Lokalizacja wskazana przez firmę Hodowla Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR
- \* Lokalizacja wskazana przez firmę Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR
- \* Lokalizacja wskazana przez firmę Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o.
- \* Lokalizacja wskazana przez firmę Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o.

W warunkach fitotronowych stres biotyczny u form mieszańcowych F<sub>1</sub> wywołany został w stadium rośliny dorosłej poprzez inokulację zarodnikami (sporami) grzyba. Materiałem infekcyjnym była mieszanina 5 izolatów *Puccinia triticina*. Rośliny mieszańcowe F<sub>1</sub> pszenicy inokulowane były poprzez zastosowanie oprysku całych roślin zawiesiną zarodników o stężeniu ok.  $5 \times 10^5$  zarodników/ml w stadium rośliny dorosłej.

### Izolacja miRNA

Tkanka liściowa pobrana została z każdego, z pięciu mieszańców F<sub>1</sub> w trzech powtórzeniach biologicznych, w dwóch wariantach (inokulowane i nieinokulowane). Łącznie analizowano 30 roślin (5 genotypów mieszańcowych pokolenia F<sub>1</sub> × 3 powtórzenia × 2 warianty). Fragmenty tkanki liściowej do analiz molekularnych zostały pobrane z każdej rośliny mieszańcowej przed inokulacją oraz po 6, 12, 24 i 48 godzinach po inokulacji (hai, ang. hours after inoculation). Łącznie do analizy ekspresji miRNA związanego z genem *Lr34* i genem kandydującym *Lr46* pobrano **150 prób** {5 mieszańców x 3 powtórzenia biologiczne x 5 czasów (0h, 6h, 12h, 24h i 48h) x 2 warianty (inokulowane i nieinokulowane)}. Pobrane liście zostały zamrożone w ciekłym azocie, a następnie umieszczone w probówkach typu eppendorf i przechowywane w kriozamrażarce -80 stopni Celcjusza do momentu izolacji miRNA. Do izolacji mikroRNA został wykorzystany kit mirVana™ miRNA Isolation Kit z firmy ThermoFisher Scientific. Izolację wykonano zgodnie z procedurą dołączoną do zestawu. Koncentracja miRNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru DeNovix.

### Izolacja mRNA

Podobnie jak w przypadku miRNA tkanka liściowa pobrana została z każdego, z pięciu mieszańców F<sub>1</sub> w trzech powtórzeniach biologicznych, w dwóch wariantach (inokulowane i nieinokulowane). Łącznie analizowano 30 roślin (5 genotypów mieszańcowych pokolenia F<sub>1</sub> × 3 powtórzenia × 2 warianty). Fragmenty tkanki liściowej do analiz molekularnych zostały pobrane z każdej rośliny mieszańcowej przed inokulacją oraz po 6, 12, 24 i 48 godzinach po inokulacji. Łącznie do analizy ekspresji mRNA związanego z genem *Lr34* i genami kandydującymi *Lr46* pobrano **150 prób** {5 mieszańców x 3 powtórzenia biologiczne x 5 czasów (0h, 6h, 12h, 24h i 48h) x 2 warianty (inokulowane i nieinokulowane)}. Pobrane liście zostały zamrożone w ciekłym azocie, a następnie umieszczone w probówkach typu eppendorf i przechowywane w kriozamrażarce -80 stopni Celcjusza do momentu izolacji mRNA. Do izolacji mRNA wykorzystano kit Maxwell® RSC Plant RNA Kit z firmy Promega. Izolację wykonano zgodnie z procedurą dołączoną do zestawu. Koncentracja mRNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru DeNovix.

### Synteza cDNA (miRNA)

Syntezę cDNA przeprowadzono dla 150 próbek wyizolowanego miRNA. W tym celu użyto kitu SuperScript™ IV Reverse Transcriptase 10 000 U z firmy ThermoFisher Scientific. Do próbek typu Eppendorf dodano odpowiednią, uprzednio przeliczoną ilość matrycy (miRNA) i H<sub>2</sub>O. Końcowa objętość tej mieszaniny nie powinna przekraczać 7 µl. W pierwszej kolejności przygotowano próbę kontrolną. Skład mieszaniny dla próby kontrolnej, którą poddaje się inkubacji przedstawiono poniżej:

0,5 µl dNTP

1 µl primer stem loop SCR RNA Thr 3'

1 µl starter

Po inkubacji dodano:

6,35 µl Master Mix Enzyme

8 µl H<sub>2</sub>O

Następnie Przygotowano mieszaninę ze starterami referencyjnymi. Skład mieszaniny przedstawiono poniżej:

0,5 µl dNTP mix

1 µl primer stem loop SCR RNA Thr 3' (2 µM)

1 µl SCR-RNA (referencyjny Spike in) (10<sup>-7</sup>)

1 µl primer 1 (2 µM)

W kolejnym kroku do każdej probówki z wodą i matrycą dodawano po 6,5 µl wcześniej przygotowanej mieszaniny i inkubowano w 60 °C przez 5 minut.

Następnie przygotowano mieszaninę z enzymami. Skład mieszaniny podano poniżej:

4 µl (5x First Standard Buffer)

2 µl (0,1 M DTT)

0,1 µl RNaseOUT (40U/µl)

0,25 µl SuperScript IV RT (200U/µl)

Po wyciągnięciu prób z inkubacji do każdej z nich dodawano po mieszaniny zawierającej enzymy i mieszano na vorteksie. W kolejnym etapie w termocyklerze przeprowadzano reakcję RT-PCR o następującym profilu temperaturowym:

Denaturacja wstępna      16 °C – 30 min.

60 cykli:

Denaturacja              30 °C – 30 sek.

Wiązanie starterów      42 °C – 30 sek.

Synteza                    50 °C – 1 sek.

Synteza końcowa         85 °C – 5 min.

Przechowywanie         4 °C – 24 h

Po zakończeniu programu wyjęto próby z termocyklera i przechowywano w -20 °C.

### Synteza cDNA (mRNA)

Syntezę cDNA przeprowadzono przy użyciu zestawu iScript cDNA Synthesis Kit z firmy BIO-RAD. Syntezę prowadzono dla 150 prób wyizolowanego wcześniej mRNA. Optymalna ilość wyizolowanego RNA wynosiła powyżej 200 ng/µl. Do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji (synteza cDNA) przeliczano potrzebną objętość każdej z wyizolowanych prób RNA w celu ujednoczenia ilości RNA w próbach (1µg = 1000 ng). Do ustalonej objętości RNA dodawano wodę wolną od nukleaz. Pozostałą część mieszaniny reakcyjnej stanowił RT Supermix. W zależności od ilości wybranych genów do badań, konieczne było zwielenokrotnienie ilości zsyntetyzowanego cDNA. Przygotowane próby poddawano inkubacji zgodnie z poniższym protokołem:

Przygotowanie              5 min. 25<sup>0</sup>C

Odwrotna transkrypcja      20min. 46<sup>0</sup>C

Inaktywacja                 1 min. 95<sup>0</sup>C

## Analiza ekspresji miRNA z wykorzystaniem reakcji ddPCR.

Materiałem badawczym było 150 prób otrzymanego wcześniej cDNA z fragmentów miRNA. Odczynniki do reakcji ddPCR zostały zakupione w firmie BioRad. Następnie mieszaninę reakcyjną przeniesiono na specjalne kartridże, które umieszczono w generatorze kropli, gdzie powstały krople lipidowe, w których zamknięto rozcieńczoną matrycę cDNA. Dzięki temu stworzono układ autonomicznych reakcji PCR. Dzięki niespecyficznym barwnikom obliczono efektywność amplifikacji. Otrzymano odczyty układów zero-jedynkowych (liczba micel, w których zachodzi amplifikacja odpowiada bezpośrednio liczbie kopii na początku reakcji). Analiza danych polegała na porównaniu fluorescencji tła (puste krople) i barwnika (krople z amplifikacją) oraz na ustaleniu wartości odcięcia pomiędzy nimi. Posłużyły do tego wykresy poissonowskie.

## Analiza ekspresji z wykorzystaniem reakcji qPCR

Materiałem badawczym było 150 prób otrzymanego wcześniej cDNA z fragmentów mRNA. Startery były zaprojektowane bazując na sekwencjach genów *Lr34*, genów kandydujących *Lr46* oraz genu *Lr67*, które są dostępne w literaturze oraz bazach danych. Reakcja RT-qPCR przeprowadzona została za pomocą zestawu iTaq Universal SYBR Green Supermix przy użyciu urządzenia CFX Connect Real-Time PCR Detection System z firmy BIO-RAD dostępnego w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin UP w Poznaniu.

## **WYNIKI (Temat badawczy 2)**

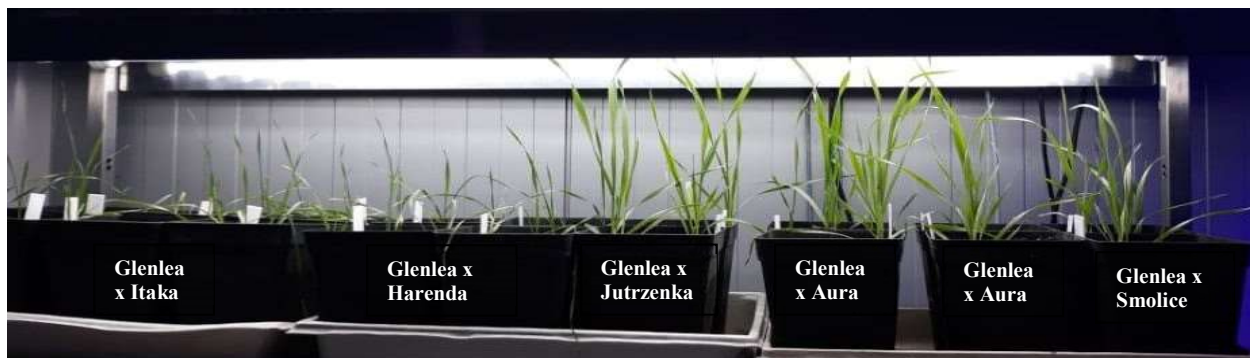
### Obserwacje naturalnego porażenia

W ramach zaplanowanej w harmonogramie i kosztorysie usługi badawczej, analizowane genotypy mieszańcowe zostały poddane ocenie stopnia porażenia przez rdzę brunatną, w doświadczeniach w warunkach polowych na terenie kraju w następujących lokalizacjach:

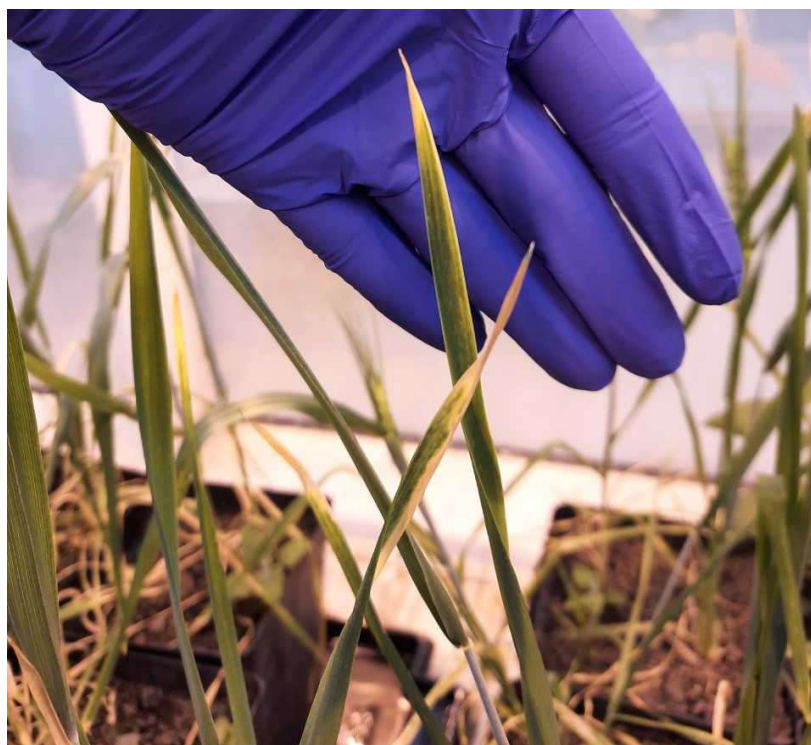
- Dłoń (RGD Dłoń, UP w Poznaniu) – brak porażenia
- Choryń (Danko Hodowla Roślin Sp. z.o.o.) – brak porażenia
- Smolice (Hodowla Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR) – brak porażenia
- Strzelce (Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR) – brak porażenia
- Kobierzyce (Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o.) – brak porażenia
- Wiatrowo (Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o.) – brak porażenia

### Obserwacje porażenia w doświadczeniach inokulacyjnych

Obserwacje roślin po inokulacji w stadium rośliny dorosłej wykazały, iż badane mieszańce F<sub>1</sub> charakteryzowały się niskim stopniem porażenia przez *Puccinia tritica* o podobnym zakresie w porównaniu do obserwacji na siewkach – tj. w zakresie 0-4.



**Fot . 1.** Siewki analizowanych roślin mieszańcowych F<sub>1</sub> (Glenlea x Itaka, Harenda, Jutrzenka, Aura, Smolice)



**Fot . 2.** Liść flagowy dojrzałej rośliny genotypu Glenlea (Lr34+Lr46+Lr68). Brak symptomów porażenia przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Puccinia* sp.

### Izolacja miRNA

Do izolacji mikroRNA został wykorzystany kit mirVana™ miRNA Isolation Kit z firmy ThermoFisher Scientific. Izolację wykonano zgodnie z procedurą dołączoną do zestawu. Koncentrację miRNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru DeNovix. Wydajność pojedynczej izolacji była wysoka i wahała się od 105 ng/ul dla mieszańca F<sub>1</sub> Glenlea x Jutrzenka do 698 ng/ul dla mieszańca F<sub>1</sub> Glenlea x Harenda (Tab. 2). Czystość poszczególnych próbek mieściła się w zakresie od 1.62 do 2.44 dla absorbancji 260/230 oraz od 1,81 do 2,3 dla absorbancji 260/280 (Tab.2). Dzięki otrzymaniu stosunkowo wysokiej koncentracji miRNA próbki doprowadzono do jednakowego stężenia (optymalne stężenie to 200 ng/ul) wymaganego do reakcji odwrotnej transkrypcji. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2.** Pomiar stężenia miRNA oraz jego czystości długości fali 260/230 nm oraz 260/280 nm.

Lp.	Mieszaniec F <sub>1</sub>	Powtórzenie biologiczne	Punkt Czasowy (hpi)	Koncentracja (ng/ul)	A 260/230	A 260/280
1	Glenlea x Itaka	I	0	342	2,11	1,99
2	Glenlea x Itaka	II	0	175	2,17	1,92
3	Glenlea x Itaka	III	0	345	2,02	2,11
4	Glenlea x Harenda	I	0	562	2,04	2,00
5	Glenlea x Harenda	II	0	122	1,89	2,10
6	Glenlea x Harenda	III	0	134	1,84	1,95
7	Glenlea x Jutrzenka	I	0	105	1,68	2,15
8	Glenlea x Jutrzenka	II	0	198	1,97	2,30
9	Glenlea x Jutrzenka	III	0	177	2,01	2,18
10	Glenlea x Aura	I	0	187	2,11	2,00
11	Glenlea x Aura	II	0	176	2,24	1,94
12	Glenlea x Aura	III	0	287	1,93	2,16
13	Glenlea x Smolice	I	0	198	1,94	2,21
14	Glenlea x Smolice	II	0	261	2,10	1,98
15	Glenlea x Smolice	III	0	287	2,13	1,88
16	Glenlea x Itaka	I	6	546	2,23	1,81
17	Glenlea x Itaka	II	6	354	2,84	1,82
18	Glenlea x Itaka	III	6	443	1,98	2,11
19	Glenlea x Harenda	I	6	435	2,22	1,99
20	Glenlea x Harenda	II	6	232	2,15	2,11
21	Glenlea x Harenda	III	6	587	1,87	2,00
22	Glenlea x Jutrzenka	I	6	398	1,99	2,00
23	Glenlea x Jutrzenka	II	6	122	2,13	2,06
24	Glenlea x Jutrzenka	III	6	254	2,16	1,96
25	Glenlea x Aura	I	6	543	2,26	2,17
26	Glenlea x Aura	II	6	354	2,18	2,22
27	Glenlea x Aura	III	6	398	2,44	2,15
28	Glenlea x Smolice	I	6	387	1,95	2,11
29	Glenlea x Smolice	II	6	234	1,91	2,11
30	Glenlea x Smolice	III	6	276	1,89	1,94
31	Glenlea x Itaka	I	12	287	2,15	1,89
32	Glenlea x Itaka	II	12	333	2,24	2,10
33	Glenlea x Itaka	III	12	453	2,17	2,21
34	Glenlea x Harenda	I	12	298	1,86	2,01
35	Glenlea x Harenda	II	12	278	2,20	2,07
36	Glenlea x Harenda	III	12	287	2,25	2,16
37	Glenlea x Jutrzenka	I	12	372	2,22	2,13
38	Glenlea x Jutrzenka	II	12	231	2,26	2,02
38	Glenlea x Jutrzenka	III	12	432	1,80	2,13
40	Glenlea x Aura	I	12	365	2,05	2,17
41	Glenlea x Aura	II	12	122	1,91	2,00
42	Glenlea x Aura	III	12	187	1,75	1,89
43	Glenlea x Smolice	I	12	198	2,11	1,91
44	Glenlea x Smolice	II	12	298	2,01	1,89
45	Glenlea x Smolice	III	12	176	1,88	1,79
46	Glenlea x Itaka	I	24	268	2,19	1,81
47	Glenlea x Itaka	II	24	233	1,74	2,18
48	Glenlea x Itaka	III	24	432	2,34	2,22
49	Glenlea x Harenda	I	24	698	2,28	1,89
50	Glenlea x Harenda	II	24	434	2,13	1,95
51	Glenlea x Harenda	III	24	422	2,23	1,99

52	Glenlea x Jutrzenka	I	24	154	2,39	1,91
53	Glenlea x Jutrzenka	II	24	166	2,25	2,11
54	Glenlea x Jutrzenka	III	24	342	2,16	2,11
55	Glenlea x Aura	I	24	222	2,21	2,07
56	Glenlea x Aura	II	24	324	2,25	1,85
57	Glenlea x Aura	III	24	433	2,17	1,92
58	Glenlea x Smolice	I	24	655	2,22	2,16
59	Glenlea x Smolice	II	24	611	2,16	2,19
60	Glenlea x Smolice	III	24	343	2,12	2,11
61	Glenlea x Itaka	I	48	341	1,75	2,13
62	Glenlea x Itaka	II	48	462	2,13	1,93
63	Glenlea x Itaka	III	48	329	2,23	1,93
64	Glenlea x Harenda	I	48	352	1,62	1,89
65	Glenlea x Harenda	II	48	632	1,78	2,10
66	Glenlea x Harenda	III	48	119	1,91	2,00
67	Glenlea x Jutrzenka	I	48	291	1,95	2,08
68	Glenlea x Jutrzenka	II	48	398	2,22	2,02
69	Glenlea x Jutrzenka	III	48	436	2,18	1,82
70	Glenlea x Aura	I	48	236	2,33	1,96
71	Glenlea x Aura	II	48	254	2,08	1,89
72	Glenlea x Aura	III	48	453	2,14	1,94
73	Glenlea x Smolice	I	48	397	2,20	1,90
74	Glenlea x Smolice	II	48	368	2,11	2,16
75	Glenlea x Smolice	III	48	243	1,95	2,20

### Izolacja mRNA

Izolację mRNA przeprowadzono z wykorzystaniem aparatury i zestawu do izolacji Maxwell® RSC Plant RNA Kit (izolacja zautomatyzowana). Wydajność pojedynczej izolacji wahała się od 120 ng/ul dla Glenlea x Harenda do 860 ng/ul dla Glenlea x Itaka (Tab. 3). Czystość poszczególnych próbek mieściła się w zakresie od 1,67 do 2,49 dla absorbancji 260/230 oraz od 1,88 do 2,35 dla absorbancji 260/280 (Tab.3). Podobnie jak w przypadku miRNA próby mRNA doprowadzono do jednakowego stężenia 200 ng/ul, które również w tym przypadku jest optymalne dla reakcji odwrotnej transkrypcji. Koncentrację wyizolowanego RNA mierzono wykorzystując spektrofotometr NanoDrop. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 3.

**Tabela 3.** Pomiar stężenia mRNA oraz jego czystości długości fali 260/230 nm oraz 260/280 nm.

Lp.	Mieszaniec F <sub>1</sub>	Powtórzenie biologiczne	Punkt Czasowy (hpi)	Koncentracja (ng/ul)	A 260/230	A 260/280
1	Glenlea x Itaka	I	0	432	2,35	2,19
2	Glenlea x Itaka	II	0	254	2,00	2,22
3	Glenlea x Itaka	III	0	287	1,94	2,19
4	Glenlea x Harenda	I	0	354	2,12	2,00
5	Glenlea x Harenda	II	0	435	2,26	1,98
6	Glenlea x Harenda	III	0	344	2,11	1,95
7	Glenlea x Jutrzenka	I	0	657	2,18	1,88
8	Glenlea x Jutrzenka	II	0	753	2,17	2,19
9	Glenlea x Jutrzenka	III	0	811	1,91	2,00
10	Glenlea x Aura	I	0	656	1,97	1,90
11	Glenlea x Aura	II	0	342	2,00	1,94
12	Glenlea x Aura	III	0	716	1,90	2,01



13	Glenlea x Smolice	I	0	743	2,11	2,12
14	Glenlea x Smolice	II	0	128	2,11	1,99
15	Glenlea x Smolice	III	0	194	1,93	2,00
16	Glenlea x Itaka	I	6	723	1,67	2,01
17	Glenlea x Itaka	II	6	433	1,99	2,12
18	Glenlea x Itaka	III	6	536	2,00	1,90
19	Glenlea x Harenda	I	6	365	2,12	1,99
20	Glenlea x Harenda	II	6	765	1,95	2,11
21	Glenlea x Harenda	III	6	810	2,17	2,00
22	Glenlea x Jutrzenka	I	6	500	2,29	2,01
23	Glenlea x Jutrzenka	II	6	322	2,13	2,18
24	Glenlea x Jutrzenka	III	6	500	2,12	2,16
25	Glenlea x Aura	I	6	435	2,13	2,35
26	Glenlea x Aura	II	6	611	1,91	2,00
27	Glenlea x Aura	III	6	533	1,96	1,99
28	Glenlea x Smolice	I	6	326	1,90	1,96
29	Glenlea x Smolice	II	6	444	1,91	1,93
30	Glenlea x Smolice	III	6	711	2,25	2,22
31	Glenlea x Itaka	I	12	222	2,16	2,01
32	Glenlea x Itaka	II	12	213	2,21	2,08
33	Glenlea x Itaka	III	12	276	2,15	2,02
34	Glenlea x Harenda	I	12	376	2,17	2,01
35	Glenlea x Harenda	II	12	276	2,12	2,22
36	Glenlea x Harenda	III	12	554	2,16	2,21
37	Glenlea x Jutrzenka	I	12	712	2,12	2,01
38	Glenlea x Jutrzenka	II	12	199	2,15	2,01
38	Glenlea x Jutrzenka	III	12	200	2,30	2,08
40	Glenlea x Aura	I	12	453	2,29	1,95
41	Glenlea x Aura	II	12	712	2,11	1,98
42	Glenlea x Aura	III	12	244	2,23	1,90
43	Glenlea x Smolice	I	12	756	2,11	2,21
44	Glenlea x Smolice	II	12	511	2,18	2,14
45	Glenlea x Smolice	III	12	355	1,99	2,11
46	Glenlea x Itaka	I	24	387	2,09	1,99
47	Glenlea x Itaka	II	24	276	2,23	1,98
48	Glenlea x Itaka	III	24	414	2,22	1,99
49	Glenlea x Harenda	I	24	378	2,16	2,22
50	Glenlea x Harenda	II	24	365	2,12	2,08
51	Glenlea x Harenda	III	24	623	2,09	2,16
52	Glenlea x Jutrzenka	I	24	512	2,04	2,21
53	Glenlea x Jutrzenka	II	24	189	2,30	2,00
54	Glenlea x Jutrzenka	III	24	465	2,16	2,00
55	Glenlea x Aura	I	24	276	2,49	2,22
56	Glenlea x Aura	II	24	245	2,31	1,95
57	Glenlea x Aura	III	24	276	2,31	1,92
58	Glenlea x Smolice	I	24	800	2,27	2,10
59	Glenlea x Smolice	II	24	549	2,00	2,19
60	Glenlea x Smolice	III	24	198	2,10	1,99
61	Glenlea x Itaka	I	48	860	2,00	2,10
62	Glenlea x Itaka	II	48	553	2,23	1,94
63	Glenlea x Itaka	III	48	232	2,21	1,93
64	Glenlea x Harenda	I	48	654	1,89	2,04
65	Glenlea x Harenda	II	48	120	1,90	2,08
66	Glenlea x Harenda	III	48	183	2,11	2,01
67	Glenlea x Jutrzenka	I	48	254	2,05	2,12
68	Glenlea x Jutrzenka	II	48	198	2,21	1,99

69	Glenlea x Jutrzenka	III	48	354	2,38	1,92
70	Glenlea x Aura	I	48	444	2,34	1,91
71	Glenlea x Aura	II	48	811	2,00	1,95
72	Glenlea x Aura	III	48	833	2,00	2,14
73	Glenlea x Smolice	I	48	453	1,96	2,21
74	Glenlea x Smolice	II	48	743	1,95	1,99
75	Glenlea x Smolice	III	48	198	1,95	2,03

#### Synteza cDNA (miRNA)

W celu przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji cząsteczek miRNA, komplementarnych do sekwencji genów *Lr34* oraz *Lr46* zaprojektowano startery, których sekwencje zamieszczono w tabeli 4.

**Tabela 4.** Sekwencje zaprojektowanych starterów do reakcji odwrotnej transkrypcji

Gen	Lp.	Nazwa startera RT	Sekwencja startera
<i>Lr34</i>	1.	RT miR9653b	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GCC TC-3'
	2.	RT miR9773	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TCC GCA CTG GAT ACG ACT TCA CA-3'
	3.	RT miR9677b	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TCC GCA CTG GAT ACG ACG GCC AC-3'
<i>Lr46</i>	4.	RT miR164	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATAGGACTGCACG -3'
	5.	RT miR9780	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACGCCGCG-3'
	6.	RT miR9775	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACTAGCAA-3'
	7.	RT miR5384-3p	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACCATTTCG -3'
	8.	Scrabled short RNA (SCR)	5'-AUA GGC CAU AAG GAG UCU CGG UAC GUC UUG UAU G-3'

#### Analiza ekspresji miRNA z wykorzystaniem reakcji ddPCR.

W celu przeprowadzenia reakcji ddPCR zaprojektowano startery, których sekwencje podano w tabeli numer 5.

**Tabela 5.** Sekwencje zaprojektowanych starterów do reakcji ddPCR

Gen	Lp.	Nazwa startera	Sekwencja startera
<i>Lr34</i>	1.	miR9653b F	5'-ACG CAG TGG CCA AGG TCT CTT-3'
	2.	miR9773 F	5'- GGG ACG TTT GTT TTT ATG TTA TTT -3'
	3.	miR9677b F	5'- AGA TAT CAG GGC GGG GAA CAG -3'
<i>Lr46</i>	4.	miR164 F	5'-AGTCAGTGGAGAAGCAGGGCA -3'
	5.	miR9780 F	5'- ATT ATA CGG GTC GGC GCT GCA -3'
	6.	miR9775 F	5'- CAT GCA TGT GCG CAA TAA GAT T -3'
	7.	miR5384-3p F	5'- ATAGTATGAGCGCGCCGCCGT-3'
	8.	Universal R	5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3'

Analizując ekspresję różnych miRNA komplementarnych do sekwencji genu *Lr34* stwierdzono, że najwyższy poziom ekspresji wystąpił dla wszystkich mieszańców i punktów czasowych w przypadku miR9653b (Tab. 6 i Tab. 7). Podobne wyniki otrzymano w 2021 roku badań na liniach referencyjnych. W przypadku mieszańców Itaka x Glenlea oraz Smolice x Glenlea liczba kopii miR9653b zdecydowanie rośnie po 6h od inokulacji a następnie maleje po 12h. Po 24h odnotowano ponowny jego wzrost i spadek po 48h (Tab. 6 i Tab. 7). Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku mieszańca Aura x Glenlea, gdzie po 6h od inokulacji zaobserwowano spadek liczby kopi miR9653b a następnie jego wzrost po 12h. Po 24h poziom ekspresji miR9653b w przypadku tego mieszańca spadł i znów wzrósł po 48h (Tab. 6 i Tab.7). W przypadku pozostałych dwóch mieszańców Harenda x Glenlea oraz Jutrzenka x Glenlea odnotowano intensywny wzrost ekspresji miR9653b bezpośrednio po inokulacji aż do 24h. Po 48h zaobserwowano spadek liczby kopii miR9653b (Tab. 6 i Tab. 7). W przypadku miR9773 i miR9677b odnotowano nieistotny poziom ich ekspresji (Tab. 6 i Tab.7).

**Tabela 6.** Ekspresja miRNA komplementarnych do genu *Lr34*

Lp.	Mieszaniec F <sub>1</sub>	Czas od inokulacji	Ekspresja tae-miR9653b (copies/ $\mu$ L)	Ekspresja tae-miR9773 (copies/ $\mu$ L)	Ekspresja tae-miR9677b (copies/ $\mu$ L)
1.	Itaka x Glenlea (DANKO)	0h	876,12	-	1,53
2.	Itaka x Glenlea (DANKO)	0h	226,34	-	2,02
3.	Itaka x Glenlea (DANKO)	0h	683,30	3,29	-
4.	Harenda x Glenlea (MHR)	0h	650,41	-	3,40
5.	Harenda x Glenlea (MHR)	0h	451,07	-	1,78
6.	Harenda x Glenlea (MHR)	0h	650,17	1,27	-
7.	Jutrzenka x Glenlea (MHR)	0h	496,27	-	2,19
8.	Jutrzenka x Glenlea (MHR)	0h	761,81	1,87	1,73
9.	Jutrzenka x Glenlea (MHR)	0h	372,36	1,97	1,48
10.	Aura x Glenlea (Strzelce)	0h	878,16	4,42	-
11.	Aura x Glenlea (Strzelce)	0h	-	-	1,60
12.	Aura x Glenlea (Strzelce)	0h	1101,27	1,32	2,79
13.	Smolice Glenlea x ? (Smolice)	0h	991,93	5,89	1,08
14.	Smolice Glenlea x ? (Smolice)	0h	725,58	-	-
15.	Smolice Glenlea x ? (Smolice)	0h	-	1,95	2,50
16.	Itaka x Glenlea (DANKO)	6h	1433,72	-	2,77
17.	Itaka x Glenlea (DANKO)	6h	1056,13	1,71	1,75
18.	Itaka x Glenlea (DANKO)	6h	1009,98	3,73	1,84

19.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	820,66	2,88	-
20.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	911,65	-	2,17
21.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	1417,48	3,29	2,52
22.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	677,74	-	-
23.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	510,51	1,60	1,84
24.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	617,86	-	2,67
25.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>6h</b>	383,86	4,33	2,33
26.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>6h</b>	795,06	-	2,58
27.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>6h</b>	-	1,62	2,86
28.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>6h</b>	1299,41	4,39	2,31
29.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>6h</b>	1061,81	-	2,96
30.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>6h</b>	828,98	2,77	-
31.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>12h</b>	691,34	2,33	1,81
32.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>12h</b>	751,98	4,26	1,89
33.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>12h</b>	483,66	0,82	-
34.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	1446,09	1,91	3,82
35.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	2049,20	4,20	1,88
36.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	1823,31	1,62	3,48
37.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	1166,59	1,43	2,05
38.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	1123,37	-	2,44
39.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	943,42	3,80	2,21
40.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>12h</b>	929,18	1,98	3,02
41.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>12h</b>	916,49	-	1,94
42.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>12h</b>	1001,18	1,58	2,47
43.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>12h</b>	725,44	1,91	1,36
44.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>12h</b>	1045,70	1,26	2,02
45.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>12h</b>	1044,53	1,25	1,37
46.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>24h</b>	2193,02	-	1,71

47.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>24h</b>	1125,23	1,26	2,50
48.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>24h</b>	1336,36	4,40	1,48
49.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	2223,95	-	2,45
50.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	2910,08	0,941	2,58
51.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	-	2,589	3,75
52.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	1906,21	-	3,75
53.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	2771,00	-	1,91
54.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	3354,91	1,46	-
55.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>24h</b>	971,11	3,05	3,15
56.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>24h</b>	800,54	-	1,94
57.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>24h</b>	793,73	2,03	1,01
58.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>24h</b>	1278,00	3,99	1,98
59.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>24h</b>	2184,34	1,42	2,47
60.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>24h</b>	2397,91	5,49	2,23
61.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>48h</b>	-	-	3,65
62.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>48h</b>	576,68	-	1,41
63.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>48h</b>	640,64	-	2,19
64.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>48h</b>	2926,20	-	2,58
65.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>48h</b>	2897,96	-	2,62
66.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>48h</b>	1661,65	5,10	2,42
67.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>48h</b>	283,38	-	3,03
68.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>48h</b>	487,36	-	2,27
69.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>48h</b>	323,73	-	2,00
70.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>48h</b>	692,25	4,48	1,79
71.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>48h</b>	871,99	1,84	1,64
72.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>48h</b>	1550,48	2,31	2,20
73.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>48h</b>	712,81	-	2,24
74.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>48h</b>	802,53	-	1,87
75.	<b>Smolice Glenlea x ?</b>	<b>48h</b>	1279,42	-	1,86

**Tabela 7. Średnia ekspresja miRNA komplementarnych do genu *Lr34***

<b>tae-miR9653b (copies/μL)</b>					
<b>Czas od inokulacji</b>	<b>Itaka x Glenlea</b>	<b>Harenda x Glenlea</b>	<b>Jutrzenka x Glenlea</b>	<b>Aura x Glenlea</b>	<b>Smolice x Glenlea</b>
<b>0</b>	595,25	583,88	543,48	989,71	858,75
<b>6</b>	1166,61	1049,93	602,03	589,46	1063,40
<b>12</b>	642,32	1772,86	1077,79	948,95	938,55
<b>24</b>	1551,53	2567,01	2677,37	855,12	1953,41
<b>48</b>	608,66	2495,27	346,82	1038,24	931,58
<b>tae-miR9773 (copies/μL)</b>					
<b>Czas od inokulacji</b>	<b>Itaka x Glenlea</b>	<b>Harenda x Glenlea</b>	<b>Jutrzenka x Glenlea</b>	<b>Aura x Glenlea</b>	<b>Smolice x Glenlea</b>
<b>0</b>	3,29	1,27	1,92	2,87	3,92
<b>6</b>	2,72	3,08	1,6	2,97	3,58
<b>12</b>	2,47	2,57	2,61	1,78	1,47
<b>24</b>	2,83	1,76	1,46	2,54	3,63
<b>48</b>	-	5,1	-	2,87	-
<b>tae-miR9677b (copies/μL)</b>					
<b>Czas od inokulacji</b>	<b>Itaka x Glenlea</b>	<b>Harenda x Glenlea</b>	<b>Jutrzenka x Glenlea</b>	<b>Aura x Glenlea</b>	<b>Smolice x Glenlea</b>
<b>0</b>	1,77	2,59	1,80	2,19	1,79
<b>6</b>	2,12	2,34	2,25	2,59	2,63
<b>12</b>	1,85	3,06	2,23	2,47	1,58
<b>24</b>	1,89	2,92	2,83	2,03	2,22
<b>48</b>	2,41	2,54	2,43	1,87	1,99

Najwyższą ekspresją spośród analizowanych miRNA odznacza się miR164, który jest komplementarny do genu kandydata *Lr46* (*Rlk3*) (Tab.8 i Tab.9). W przypadku mieszańców Jutrzenka x Glenlea oraz Aura x Glenlea obserwujemy znaczący wzrost kopii miR164, w stosunku do wartości sprzed inokulacji (Tab.8 i Tab.9). Dla pozostałych mieszańców ekspresja miR164 waha się w czasie od 6h do 48h po inokulacji osttecznie przyjmując wartość niższą niż przed inokulacją (Tab.8 i Tab.9). W przypadku miR5384-3p również zaobserwowano istotną ekspresję tego miRNA po porażeniu przez *Puccinia Triticina*. Spośród wszystkich analizowanych mieszańców tylko Aura x Glenlea charakteryzował się znacznym wzrostem ekspresji miR5385-3p po 48h, w porównaniu do poziomu sprzed inokulacji. Dla pozostałych mieszańców odnotowano po 48h mniejszą ilość kopii tego miRNA niż przed inokulacją (Tab.8 i Tab.9). W przypadku miR9780 i miR9775 odnotowano nieistotny poziom ich ekspresji (Tab. 8 i Tab.9).

**Tabela 8. Ekspresja miRNA komplementarnych do genów kandydatów *Lr46* (*Glu2*, *Rlk2* i *Rlk3*)**

<b>Lp.</b>	<b>Mieszaniec F<sub>1</sub></b>	<b>Czas od inokulacji</b>	<b>Gen <i>Glu2</i> i Gen <i>Rlk2</i></b>	<b>Gen <i>Glu2</i></b>	<b>Gen <i>Glu2</i></b>	<b>Gen <i>Rlk3</i></b>
			<b>Ekspresja miR9780 (copies/μL)</b>	<b>Ekspresja tae-miR9775 (copies/μL)</b>	<b>Ekspresja tae-miR5384-3p (copies/μL)</b>	<b>Ekspresja tae-miR164 (copies/μL)</b>
1.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>0h</b>	22,73	5,47	133,03	121,17
2.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>0h</b>	7,05	-	48,34	12,11

3.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>0h</b>	20,28	-	109,64	134,32
4.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>0h</b>	15,18	5,95	37,70	47,59
5.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>0h</b>	16,16	-	65,26	11,64
6.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>0h</b>	16,45	4,57	57,31	50,33
7.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>0h</b>	18,45	-	97,59	26,44
8.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>0h</b>	20,18	-	105,95	25,58
9.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>0h</b>	30,73	5,77	106,02	28,44
10.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>0h</b>	12,10	-	47,70	85,58
11.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>0h</b>	11,72	4,23	-	80,35
12.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>0h</b>	12,43	1,99	49,78	89,85
13.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>0h</b>	18,71	4,20	94,65	126,61
14.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>0h</b>	18,07	-	-	132,56
15.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>0h</b>	17,88	0,52	96,01	150,28
16.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>6h</b>	17,94	-	52,67	14,01
17.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>6h</b>	25,25	1,28	95,68	255,07
18.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>6h</b>	13,38	2,30	37,35	12,35
19.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	11,78	0,76	42,35	100,31
20.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	15,91	-	58,81	123,38
21.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	23,58	-	78,58	147,48
22.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	12,50	-	37,90	22,63
23.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	20,06	-	45,10	24,76
24.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>6h</b>	13,40	-	58,28	21,86
25.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>6h</b>	8,33	28,63	38,71	215,55
26.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>6h</b>	8,97	1,91	41,88	207,05
27.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>6h</b>	14,34	2,76	70,85	187,74
28.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>6h</b>	20,09	-	72,91	30,29
29.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>6h</b>	16,66	-	64,12	202,84
30.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>6h</b>	14,51	2,47	64,76	24,61

31.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>12h</b>	9,39	-	32,64	27,04
32.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>12h</b>	23,44	1,58	114,59	231,30
33.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>12h</b>	25,11	2,63	111,14	222,40
34.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	13,18	-	49,76	18,67
35.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	6,72	-	24,98	8,97
36.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	18,28	-	56,04	21,15
37.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	11,33	1,90	41,40	29,49
38.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	17,00	4,97	55,11	37,73
39.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>12h</b>	17,24	2,50	47,68	32,70
40.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>12h</b>	8,40	-	35,93	143,98
41.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>12h</b>	7,12	1,55	26,74	160,81
42.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>12h</b>	7,24	1,52	37,52	185,93
43.	<b>Smolice Glenlea x Merkawa (Smolice)</b>	<b>12h</b>	8,60	2,75	29,83	113,75
44.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>12h</b>	19,18	0,93	85,54	182,48
45.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>12h</b>	11,45	-	39,08	130,41
46.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>24h</b>	16,36	1,31	39,93	46,95
47.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>24h</b>	14,76	1,32	-	98,33
48.	<b>Itaka x Glenlea (DANKO)</b>	<b>24h</b>	14,71	1,84	58,89	95,33
49.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	23,15	-	69,71	17,87
50.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	19,55	-	65,82	27,55
51.	<b>Harenda x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	16,12	1,89	64,71	28,29
52.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	13,92	1,66	59,20	38,79
53.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	18,60	-	62,01	47,31
54.	<b>Jutrzenka x Glenlea (MHR)</b>	<b>24h</b>	20,83	4,19	61,95	43,61
55.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>24h</b>	8,67	2,69	2,81	1,16
56.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>24h</b>	13,63	2,58	67,86	347,50
57.	<b>Aura x Glenlea (Strzelce)</b>	<b>24h</b>	9,35	3,47	80,63	371,63
58.	<b>Smolice Glenlea x ? (Smolice)</b>	<b>24h</b>	22,89	1,17	78,24	46,14



59.	Smolice Glenlea x ? (Smolice)	24h	20,09	-	57,57	104,56
60.	Smolice Glenlea x ? (Smolice)	24h	13,94	3,69	46,30	87,58
61.	Itaka x Glenlea (DANKO)	48h	31,20	-	87,99	11,82
62.	Itaka x Glenlea (DANKO)	48h	23,15	3,55	94,79	182,23
63.	Itaka x Glenlea (DANKO)	48h	29,31	-	102,18	9,31
64.	Harenda x Glenlea (MHR)	48h	22,13	2,17	62,84	9,42
65.	Harenda x Glenlea (MHR)	48h	14,04	3,28	41,30	16,46
66.	Harenda x Glenlea (MHR)	48h	16,53	2,16	60,15	20,39
67.	Jutrzenka x Glenlea (MHR)	48h	17,51	2,43	45,35	21,04
68.	Jutrzenka x Glenlea (MHR)	48h	38,30	-	115,79	103,62
69.	Jutrzenka x Glenlea (MHR)	48h	19,06	-	56,66	56,49
70.	Aura x Glenlea (Strzelce)	48h	15,43	1,80	66,02	384,82
71.	Aura x Glenlea (Strzelce)	48h	18,37	3,76	78,13	490,91
72.	Aura x Glenlea (Strzelce)	48h	13,93	1,78	66,34	311,29
73.	Smolice Glenlea x ? (Smolice)	48h	20,20	-	65,41	107,60
74.	Smolice Glenlea x ? (Smolice)	48h	22,04	5,02	68,12	132,26
75.	Smolice Glenlea x ? (Smolice)	48h	5,48	2,31	16,42	14,75

**Tabela 9.** Średnia ekspresja miRNA komplementarnych do genów kandydatów Lr46 (*Glu2*, *Rlk2* i *Rlk3*)

<b>Gen <i>Glu2</i> i Gen <i>Rlk2</i> miR9780 (copies/μL)</b>					
<b>Czas od inokulacji</b>	<b>Itaka x Glenlea</b>	<b>Harenda x Glenlea</b>	<b>Jutrzenka x Glenlea</b>	<b>Aura x Glenlea</b>	<b>Smolice x Glenlea</b>
<b>0</b>	16,68	15,93	23,12	12,08	18,22
<b>6</b>	18,85	17,09	15,32	10,54	17,08
<b>12</b>	19,31	12,72	15,19	7,58	13,07
<b>24</b>	15,27	19,60	17,78	10,55	18,97
<b>48</b>	27,88	17,56	24,95	15,91	15,90
<b>Gen <i>Glu2</i> miR9775 (copies/μL)</b>					
<b>Czas od inokulacji</b>	<b>Itaka x Glenlea</b>	<b>Harenda x Glenlea</b>	<b>Jutrzenka x Glenlea</b>	<b>Aura x Glenlea</b>	<b>Smolice x Glenlea</b>
<b>0</b>	5,47	5,26	5,77	3,11	2,36
<b>6</b>	1,79	0,76	-	11,1	2,47
<b>12</b>	2,10	-	3,12	1,53	1,84
<b>24</b>	1,49	1,89	2,92	2,91	2,43
<b>48</b>	3,55	2,53	2,43	2,44	3,66
<b>Gen <i>Glu2</i></b>					

miR5384-3p (copies/ $\mu$ L)					
Czas od inokulacji	Itaka x Glenlea	Harenda x Glenlea	Jutrzenka x Glenlea	Aura x Glenlea	Smolice x Glenlea
0	97,0	53,42	103,18	48,74	95,33
6	61,9	59,91	47,09	50,48	67,26
12	86,12	43,59	48,06	33,39	51,48
24	49,41	66,74	61,05	50,43	60,70
48	94,98	54,76	72,6	70,16	49,98
Gen <i>Rlk3</i> miR164 (copies/ $\mu$ L)					
Czas od inokulacji	Itaka x Glenlea	Harenda x Glenlea	Jutrzenka x Glenlea	Aura x Glenlea	Smolice x Glenlea
0	89,2	36,52	26,82	85,26	136,48
6	93,81	123,72	23,08	203,44	85,91
12	160,24	16,26	33,3	163,57	142,21
24	80,20	24,57	43,23	240,09	79,42
48	67,78	15,42	60,38	395,67	84,87

Analiza ekspresji genu *Lr34* oraz genów kandydatów *Lr46* z wykorzystaniem reakcji qPCR.

Startery do reakcji qPCR zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencje genów z bazy NCBI oraz Ensembl Plants. W 2021 roku na podstawie pracy Cobo i in. (2019) zostało wyselekcjonowanych 10 genów-kandydatów dla genu *Lr46*, których sekwencje znaleziono w bazie Ensembl Plants. Po sprawdzeniu ekspresji tych genów do analiz w roku 2022 wybrano te, które charakteryzowały się najwyższą ekspresją w odpowiedzi na porażenie przez *Puccinia Triticina*, czyli geny *Glu2*, *Rlk2* i *Rlk3*.

W przypadku *Lr34* i *Lr67* kopie genów były na tyle podobne, że zaprojektowano startery uniwersalne, które powinny pozwolić na wykrycie każdego z transkryptów, również kopii genów na innych chromosomach.

**Tabela 10.** Sekwencje starterów wykorzystane do analiz ekspresji genów *Lr34*, genów kandydatów *Lr46* (*Glu2*, *Rlk2* i *Rlk3*) oraz genu *Lr67*

Gen	Starter Forward	Starter Reverse	Tm °C	Długość produktu
<b>Lr34</b>	GGTAGTAGCAGTTGAAGC	CTCTTCTCATTGCATCCC	54	110
<b>Lr46-Glu2</b>	TATCTCTTGTTCGCCCC	CCATCGCATAGTACACAG	55	103
<b>Lr46-RLK2</b>	TGAGATCGTGACGGGAAG	CTAGCATCTCCAGTAGTGT	56	114
<b>Lr46-RIK3</b>	CAGGGACCTTAAAGCTAAT	GGTTTGAGTATGAGTGTG	52	109
<b>Lr67</b>	CGCCATCTTCATCTTCTTC	CTGCTTCCACACCTTGTC	55	118

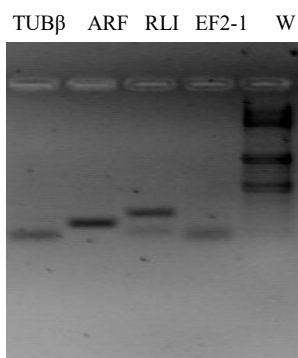
**Tabela 11.** Produkty ekspresji oraz ID analizowanych genów z wykorzystaniem techniki qPCR.

Lp.	ID Genu w bazie Ensembl Plants	Skrót nazwy genu	Funkcja/produkt ekspresji genu	Chromosom	Źródło
1.	TraesCS7D02G080300.1	<i>Lr34</i>	ABC transporter (ATP-Binding Cassette transporter)	7D	Ensembl Plants
2.	TraesCS1B02G454200.1	<i>Lr46-Glu2</i>	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	1B	Cobo et al. 2019; Ensembl Plants
3.	TraesCS1B02G454000.2	<i>Lr46-RLK1</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B	Cobo et al. 2019; Ensembl Plants
4.	TraesCS1B02G454100.1	<i>Lr46-RLK2</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B	Cobo et al. 2019; Ensembl Plants
5.	TraesCS4D02G243100.1 TraesCS4B02G243500.1 TraesCS4D02G243100.1	<i>Lr67</i>	4D hexose transporter	4D	Ensembl Plants; NCBI

### Analiza genów referencyjnych

Na podstawie danych literaturowych wytypowano 4 geny pszenicy, które ulegały stabilnej ekspresji: TUB $\beta$ , ARF, RLI oraz EF2-1 (Scholtz, Visser, 2013; Xie i in. 2019). W literaturze podano sekwencje starterów dla tych genów. Przetestowano je wykonując amplifikację na matrycy zbiorczej cDNA (próby po 12, 24, 48 h od inokulacji) i rozdzielono w żelu agarozowym 2%. Na tym etapie odrzucono gen RLI, ponieważ po amplifikacji otrzymano dwa niespecyficzne produkty PCR (Fot. 12). Po wykonaniu krzywych wzorcowych dla genów referencyjnych wytypowano dwa geny: TUB $\beta$  oraz ARF i dla nich wykonano analizy qPCR na analizowanej matrycy (75 prób cDNA). Analiza genów referencyjnych dla 75 prób badanych jest istotna, ze względu na obliczenia statystyczne ponieważ, ekspresja genu referencyjnego będzie porównywana z ekspresją genu analizowanego dla każdej próbki.

**Fot. 12.** Elektroforegram przedstawiający wyniki amplifikacji dla genów referencyjnych.



Analiza ekspresji genów *Lr34*, genów kandydatów *Lr46* (*Glu2*, *Rlk2*, *Rlk3*) oraz genu *Lr67* wykonana zostanie w grudniu 2022

**Dyskusja oraz wnioski zostaną opracowane po analizie wszystkich wyników oraz umieszczone w ostatecznej wersji sprawozdania.**

Mierniki dla tematu badawczego 2:

Lp.	miernik <sup>3</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba genotypów	5	5
2.	Liczba analizowanych mikro RNA komplemenatrych do analizowanych genów	6	6
3.	Liczba prób mRNA do analiz qPCR	150	150
4.	Liczba prób miRNA do analiz ddPCR	150	150

<sup>3</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

## 5. Informacja nt. prezentacji wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	miernik <sup>4</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	VI Polski Kongres Genetyki (organizowane przez Polskie Towarzystwo Genetyki) Kraków, 27-30.06.2022 r.	Referat*	1	1
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	miernik <sup>5</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Journal of Applied Genetics	Publikacja oryginalna**	1	0 (3 manuskrypty, 1 w recenzjach)

\* Na konferencji przedstawiono wyniki uzyskane w roku 2022 dotyczące transferu genów odporności do z form donorowych do wybranych form akceptorowych oraz metody detekcji przeniesionej informacji genetycznej (strony ze sprawozdania za rok 2022: 6-15; załącznik 2) i 2022. Zgodnie z kosztorysem sfinansowano udział jednej osoby (kierownika zadania). Koszty udziału w konferencji: 1 582,29 zł.

\* W artykule naukowym:

- i. Noweiska A., Bobrowska R., Spychała J., Tomkowiak A., Kwiatek M.. 2022. Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.)” przedstawiono proces dostosowywania reakcji multiplex PCR do jednoczesnej identyfikacji głównych genów odporności na rdzę liści *Lr19* i *Lr24* oraz genów odporności poziomej *Lr34* i *Lr68*, w sześciu kombinacjach (strony sprawozdania: 13-16). Praca obecnie znajduje się w trakcie recenzji w czasopiśmie Journal of Applied Genetics (IF= ; MEiN=140 pkt., załącznik 3)

\* Dwa pozostałe manuskrypty:

- i. Spychała J., Tomkowiak A., Kwiatek M., Wolko Ł., Bobrowska R., Sobiech A. 2022 Transcriptome profiling of the slow rusting resistance genes *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and linked miRNA expression patterns. – publikacja wysłana do recenzji, do czasopisma Journal of Applied Genetics.
- ii. Spychała J., Tomkowiak A., Kwiatek M., Rychel-Bielska S., Bocianowski J., Noweiska A. 2022 Transcriptome – based analysis of candidate genes for the *Lr46/Yr29* „slow rusting” locus in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and associated miRNA expression pathways. – publikacja wysłana do recenzji, do czasopisma Theoretical Applied Genetics.  
zostały wysłane na początku grudnia 2022 (strony sprawozdania: 27-43).

### Załączniki<sup>6</sup>:

1. Tabelaryczne ujęcie analiz identyfikacji *loci* czterech genów typu „slow rusting”: *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* i *Lr68*, u roślin mieszańcowych pszenicy ozimej pokolenia F<sub>1</sub> za pomocą sześciu markerów molekularnych - niekompletny
2. Materiały konferencyjne. Referat pt: “The use of molecular cytogenetic tools for studies in the wild-to-cereal crop gene transfer scenario”.
3. Artykuł naukowy pt.: “Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.)” . Praca obecnie znajduje się w trakcie recenzji w czasopiśmie Journal of Applied Genetics (IF= ; MEiN=140 pkt., załącznik 3)

<sup>4</sup> Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

<sup>5</sup> Podać, czy chodzi o publikację oryginalną, czy np. polemika, list do edytora, rozdział w monografii etc.

<sup>6</sup> Podać listę oraz dołączyć do sprawozdania kopie posterów/wyciągi z materiałów konferencyjnych/publikacje etc.

W nawiasie podać, na której stronie sprawozdania znajdują się prezentowane wyniki.

**6. Adres, pod którym wyniki badań będą dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:**

<https://puls.edu.pl/dotacje-mrirw>

**7. Miernik zadania – stopień realizacji**

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
<b>temat badawczy 1</b>				
1.1	Liczba prób	1500	1500	1,0
1.2	Liczba analizowanych markerów	6	6	1,0
1.3	Liczba badanych genów	8	8	1,0
<b>temat badawczy 2</b>				
2.1	Liczba genotypów	5	5	1,0
2.2	Liczba analizowanych prób mikro RNA	6	6	1,0
2.3	Liczba prób mRNA do analiz qPCR	150	150	1,0
2.4	Liczba prób miRNA do analiz ddPCR	150	150	0
			ŚREDNIA	0,75
			% REALIZACJI ZADANIA	85,71%

Sporządzono: dnia 6 grudnia 2022 r.

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania  
Prof. UPP dr hab. Michał  
Kwiatek

data

podpis i pieczęć

podpis