



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii

Aleksandra Noweiska

**Analiza ekspresji genów i analiza cytomolekularna form  
pszenicy (*Triticum aestivum* L.) z introgresją chromatyny  
gatunków pokrewnych warunkującej odporność na rdzę  
brunatną**

Gene Expression Analysis and Cytomolecular Analysis of Wheat  
(*Triticum aestivum* L.) Forms with Chromatin Introgression from  
Related Species Conferring Resistance to Leaf Rust

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk rolniczych  
w dyscyplinie Rolnictwo i Ogrodnictwo  
Doctoral thesis in Agricultural sciences  
in the Agriculture and Horticulture discipline

Promotor:

Prof. dr hab. Michał Kwiatek

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 2024

**Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej:**

**P1.** Noweiska A., Bobrowska R., Kwiatek M.T. (2022) **Structural Polymorphisms of Chromosome 3A<sup>m</sup> Containing *Lr63* Leaf Rust Resistance Loci Reflect the Geographical Distribution of *Triticum monococcum* L. and Related Diploid Wheats.** Agriculture, 12, 966. <https://doi.org/10.3390/agriculture12070966>

Impact factor: 3,6

Punktacja wg MNiSW: 100

**P2.** Noweiska A., Bobrowska R., Spychała J., Tomkowiak A., Kwiatek M.T. (2023) **Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.).** J Appl Genetics 64, 55–64. <https://doi.org/10.1007/s13353-022-00745-5>

Impact factor: 2,0

Punktacja wg MNiSW: 140

**Sumaryczny Impact Factor: 5,6**

**Suma punktów MNiSW: 240**

*Chciałabym serdecznie podziękować*

*Promotorowi za przekazaną wiedzę, poświęcony czas,  
cierpliwość oraz pomoc w rozwoju naukowym*

*Pracownikom Katedry Genetyki i Hodowli Roślin  
za wszelkie wskazówki i życzliwość*

*Mamie i Bratu  
za możliwość nauki i nieustające wsparcie*

*Przyjaciółom...  
za naukę oraz dobre słowo*

ALEKSANDRA NOUČIŠKA.....

imię i nazwisko doktoranta

### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Niniejszym oświadczam, że przedłożoną rozprawę doktorską pt.:

*Analiza ekspresji genu i analiza cytomorfologiczna partii p. 2000 (Tubicum aestivum L.).  
2. Integracja chromosomów pokrewnych i karyotypów...  
..... napisałem samodzielnie, tj.:*

- nie zleciłem opracowania rozprawy lub jej części innym osobom,
- nie przepisałem rozprawy lub jej części z innych opracowań i prac związanych tematycznie z moją pracą,
- korzystałem jedynie z niezbędnych konsultacji,
- wszystkie elementy rozprawy, które zostały wykorzystane do jej realizacji (cytaty, ryciny, tabele, programy itp.), a nie będące mojego autorstwa, zostały odpowiednio zaznaczone wraz z podaniem źródła ich pochodzenia,
- rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego.

Data *17.09.2024*.....

*Noučka Aleksandra*.....

podpis autora rozprawy

prof. dr hab. Michał Kućda

imię i nazwisko promotora / promotorów / promotora pomocniczego

### Oświadczenie promotora(-ów) rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.: *Analiza... ekspresji... genów... i... analiza...  
cytomolekularna... form... pręci... (Tutkim... o... i... z... integracją... chromatinu...  
... gatunków... poleceń... warunków... odporności... na... r... b...  
została przygotowana pod moim/naszym kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.*

Data *17/09/24*.....

Podpis promotora rozprawy

*Michał Kućda*  
.....

Podpis promotora / promotora pomocniczego rozprawy

—  
.....

# Spis treści

<b>1. Wykaz skrótów</b> .....	6
<b>2. Streszczenie</b> .....	8
<b>3. Streszczenie w języku angielskim</b> .....	9
<b>4. Wprowadzenie</b> .....	10
4.1 Uprawa pszenicy .....	10
4.2 Ewolucja pszenicy .....	10
4.2.1 Przodkowie pszenicy z genomem A.....	12
4.3 Zagrożenia w uprawie pszenicy .....	13
4.3.1 Rdza brunatna .....	13
4.4 Geny odporności na rdzę brunatną .....	14
4.4.1 Gatunki pokrewne pszenicy, jako rezerwuar genów przydatnych hodowli roślin .....	15
4.5 Hodowla odpornościowa .....	17
4.6 Reakcja rośliny na patogen.....	18
<b>5. Hipoteza badawcza i cel pracy doktorskiej</b> .....	22
<b>6. Materiał i metody</b> .....	23
6.1 Materiał badawczy.....	23
6.2 Analizy molekularne .....	25
6.2.1 Izolacja genomowego DNA (P1, P2) .....	25
6.2.2 Markery molekularne, reakcja PCR, multipeks PCR (P1, P2) .....	25
6.2.3 Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja, Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR).....	26
6.2.4 Analizy statystyczne .....	28
6.3 Analizy cytogenetyczne.....	28
6.3.1 Przygotowanie preparatów metodą maceracji enzymatycznej .....	28
6.3.2 Przygotowanie znakowanych sond oraz blokera .....	29
6.3.3 Genomowa hybrydyzacja <i>in situ</i> (GISH) .....	30
6.3.4 Analiza mikroskopowa i opracowanie wyników.....	31
6.4 Wyprowadzenie mieszańców - krzyżowanie.....	31
6.5 Inokulacja roślin w stadium siewek mieszaniną zarodników <i>P. triticina</i> .....	31
<b>7. Wyniki</b> .....	33
7.1 Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności (P1, P2).....	33
7.2 Analiza molekularna oraz cytogenetyczna form donorowych i akceptorowych .....	34
7.3 Krzyżowania.....	42
7.4 Analiza molekularna pokoleń: F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> i F <sub>3</sub> .....	42
7.4.1 Pokolenie F <sub>1</sub> z formą akceptorową KWS Carusum .....	42
7.4.2 Pokolenie F <sub>1</sub> z formą akceptorową Mantra.....	44
7.4.3 Pokolenie F <sub>2</sub> z formą akceptorową KWS Carusum .....	46
7.4.4 Pokolenie F <sub>2</sub> z formą akceptorową Mantra.....	48
7.4.5 Pokolenie F <sub>3</sub> z formami akceptorowymi KWS Carusum i Mantra.....	50

7.5 Obserwacje po inokulacji mieszaniną zarodników.....	51
7.6 Analiza poziomu ekspresji genów .....	53
7.6.1 Analiza genu <i>TaLr19TLPI</i> (PR5).....	56
7.6.2 Analiza genu PR2 .....	60
7.6.3 Analiza genu PR9 .....	64
7.6.4 Analiza genu <i>TaPrx107</i> (PRA2).....	68
7.6.5 Analiza genów referencyjnych .....	72
7.6.6 Analiza korelacji.....	78
<b>8. Dyskusja .....</b>	<b>80</b>
<b>9. Podsumowanie i wnioski .....</b>	<b>86</b>
<b>10. Bibliografia.....</b>	<b>88</b>
<b>11. Spis tabel oraz rycin .....</b>	<b>98</b>
<b>12. Opublikowane prace wchodzące w skład zbioru .....</b>	<b>101</b>
<b>P1. Structural Polymorphisms of Chromosome 3A<sup>m</sup> Containing <i>Lr63</i> Leaf Rust Resistance Loci Reflect the Geographical Distribution of <i>Triticum monococcum</i> L. and Related Diploid Wheats...</b>	<b>101</b>
<b>P2. Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) .....</b>	<b>113</b>
<b>13. Oświadczenia autorów .....</b>	<b>124</b>

# 1. Wykaz skrótów

%E – (ang. *efficiency*) wydajność

× – krzyżowanie

μ – mikro (10<sup>-6</sup>), przedrostek jednostki miary w układzie SI, oznaczający mnożnik 0,000 001 = 10<sup>-6</sup> (jedna milionowa)

AFLP – (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów

BBCH – (niem. *Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie*) – skala pozwalająca na identyfikację fitofenologicznych faz roślin uprawnych

bp/pz – (ang. *base pair*) pary zasad

cDNA – (ang. *complementary DNA*) komplementarne DNA

CE – (ang. *Crossing Efficiency*) efektywność krzyżowania

COBORU – Centralny Ośrodek Badań Odmian Roślin Uprawnych

cT – (ang. *Threshold cycle*) cykl progowy reakcji qPCR

CWR – (ang. *Crop Wild Relatives*) dzicy krewni roślin uprawnych

DAPI – 4',6-diamidyno-2-fenylindol

DNA – (ang. *Deoxyribonucleic acid*) kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP – deoksynukleotydy

ETI – (ang. *Effector-Triggered Immunity*) odporność aktywowana przez efektor

F<sub>1</sub> – (łac. *filia* = córka, *filius* = syn) pierwsze pokolenie potomne

FAO – (ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa

FISH – (ang. *Fluorescent in situ Hybridization*) fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

GISH – (ang. *Genomic in situ Hybridization*) genomowa hybrydyzacja *in situ*

HR – (ang. *Hypersensitive Response*) reakcja nadwrażliwości

L. – skrót umieszczany przy naukowej nazwie taksonu, którego autorem jest Karol Linneusz

Lr – (ang. *Leaf rust*) gen odporności na rdzę brunatną

PAMP – (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) wzorce molekularne związane z patogenami

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PCR – (ang. *Polymerase Chain Reaction*) reakcja łańcuchowa polimerazy

Pm – (ang. *Powdery mildew*) gen odporności na mączniaka prawdziwego

PR – (ang. *Pathogenesis-related proteins*) białka związane z patogenezą

qPCR – (ang. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji

RFLP – (ang. *Restriction Fragments Length Polymorphism*) polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

RNA – (ang. *Ribonucleic acid*) kwasy rybonukleinowe

RNAza – rybonukleaza

RNS – (ang. *Reactive Nitrogen Species*) reaktywne formy azotu

ROS – (ang. *Reactive Oxygen Species*) reaktywne formy tlenu

SAR – (ang. *Systemic Acquired Resistance*) nabyta odporność systemiczna

SDS – laurylosiarczan sodu

sp. – (łac. *species*) gatunek

Sr – (ang. *Stem rust*) gen odporności na rdzę źdźbłową

SSC – bufor, cytrynian sodowo-solny

ssp. – (łac. *subspecies*) podgatunek

TLP – (ang. *Thaumatococin-like Proteins*) białka podobne do taumatyny

T<sub>m</sub> – temperatura topnienia

Yr – (ang. *Yellow rust*) gen odporności na rdzę żółtą

## 2. Streszczenie

Produkcja zbóż w Polsce jest jedną z najważniejszych gałęzi rolnictwa i ma kluczowe znaczenie dla gospodarki żywnościowej kraju. Na uprawę zbóż w znacznym stopniu wpływają: warunki klimatyczne, postęp hodowlany, wielkość oraz struktura gospodarstwa, a także poziom rozwoju technologicznego. W produkcji krajowej zbóż dominuje pszenica, poprzez duże znaczenie w żywieniu ludzi i zwierząt oraz znacznego potencjału plonowania. Patogeny roślinne stanowią główne ograniczenie w produkcji pszenicy zmniejszając prognozowane zbiory na świecie średnio o 21% każdego roku. Cztery główne choroby: rdza brunatna, fuzarioza kłosów zbóż, septorioza paskowana liści pszenicy, rdza żółta – odpowiadają za ponad połowę strat. Nagłe i niespodziewane pojawienie się szkodliwych czynników może doprowadzić do epidemii prowadzącej do strat w uprawach na dużą skalę. Środki kontroli obejmują pestycydy, kwarantannę i hodowle w kierunku zmienności genetycznej prowadzącej do zwiększonej odporności oraz poprawy innych cech. Odporność genetyczna może zmniejszyć optymalną dawkę stosowanego fungicydu wymaganą do uniknięcia rozprzestrzeniania się choroby. Zdolność patogenów do adaptacji i ewolucji wymaga ciągłych poszukiwań i transferu nowych genów odporności. Dzicy krewni roślin uprawnych mogą stanowić źródło zmienności genów *Lr* warunkujących odporność na rdzę brunatną. Do tej pory zidentyfikowano około 80 genów *Lr*, z czego co najmniej połowa pochodzi od dzikich krewnych pszenicy. Rośliny podczas infekcji patogenem aktywują odpowiedź odporności zaczynając od pojedynczych komórek, a kończąc na zmianach widocznych na roślinie.

W niniejszej rozprawie doktorskiej celem była piramidyżacja genów odporności *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr38* i *Lr63* pochodzących z pierwszo- i trzeciorzędowej puli genetycznej. Do określenia obecności genów odporności opracowano protokoły multipleks, dodatkowo obce segmenty chromatyny identyfikowano przy użyciu metody GISH. Brak sklonowanych genów *Lr* ogranicza poznanie dokładnych mechanizmów odporności pszenicy na rdzę brunatną. W pracy analizowano geny kodujące białka PR, które podczas interakcji gen – patogen rozpoznając cząsteczki efektorowe zwiększają swoją ekspresję będąc częścią mechanizmu obronnego roślin. Ponadto przeprowadzono analizę krótkiego ramienia chromosomu 3A u diploidalnych gatunków pszenic.

**Słowa kluczowe:** pszenica, rdza brunatna, hodowla odpornościowa, pula genowa, białka PR

### 3. Streszczenie w języku angielskim

One of Poland's most significant agriculture sectors and an important part of the nation's food economy is cereal production. The environment, breeding efficacy, farm size, and innovations in technology each have significant effects on cereal production. Due to its substantial yield potential and relevance in both human and animal nutrition, wheat dominates the production of cereals in the country. Plant pathogens are a significant barrier to wheat production, with an average annual reduction of 21% in expected worldwide yields. More than half of the losses are caused by the four primary diseases: leaf rust, fusarium head blight, septoria tritici blotch, yellow rust. Harmful agents can emerge out of nowhere and cause epidemics that result in significant crop losses. Pesticides, quarantine, and breeding use genetic diversity that increases resistance and improves other traits are examples of control strategies. Genetic resistance could reduce the ideal rate of fungicide application needed to stop the spread of disease. The ability of pathogens to adapt and evolve requires a constant search for and transfer of new resistance genes. Wild relatives of crop plants may represent a source of variation in *Lr* genes determining resistance to leaf rust. To date, about 80 *Lr* genes have been identified, at least half of which are derived from wild relatives of wheat. Plants initiate a resistance response in reaction to pathogen infection, which begins with single cells and ends in changes that are apparent on the plant.

In this doctoral dissertation, the aim was to pyramidise the resistance genes *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr38* and *Lr63* from the primary and tertiary gene pools. Multiplex protocols were developed to determine the presence of resistance genes; in addition, foreign chromatin segments were identified using the GISH method. The lack of cloned *Lr* genes limits the knowledge of the mechanisms of wheat resistance to leaf rust. In this study, we analysed genes encoding PR proteins that, during gene-pathogen interactions by recognising effectors, increase their expression being part of the plant defence mechanism. Additionally, a study was carried out to investigate the short arm of chromosome 3A in diploid wheat species.

**Keywords:** wheat, leaf rust, resistance breeding, gene pool, PR proteins

## 4. Wprowadzenie

### 4.1 Uprawa pszenicy

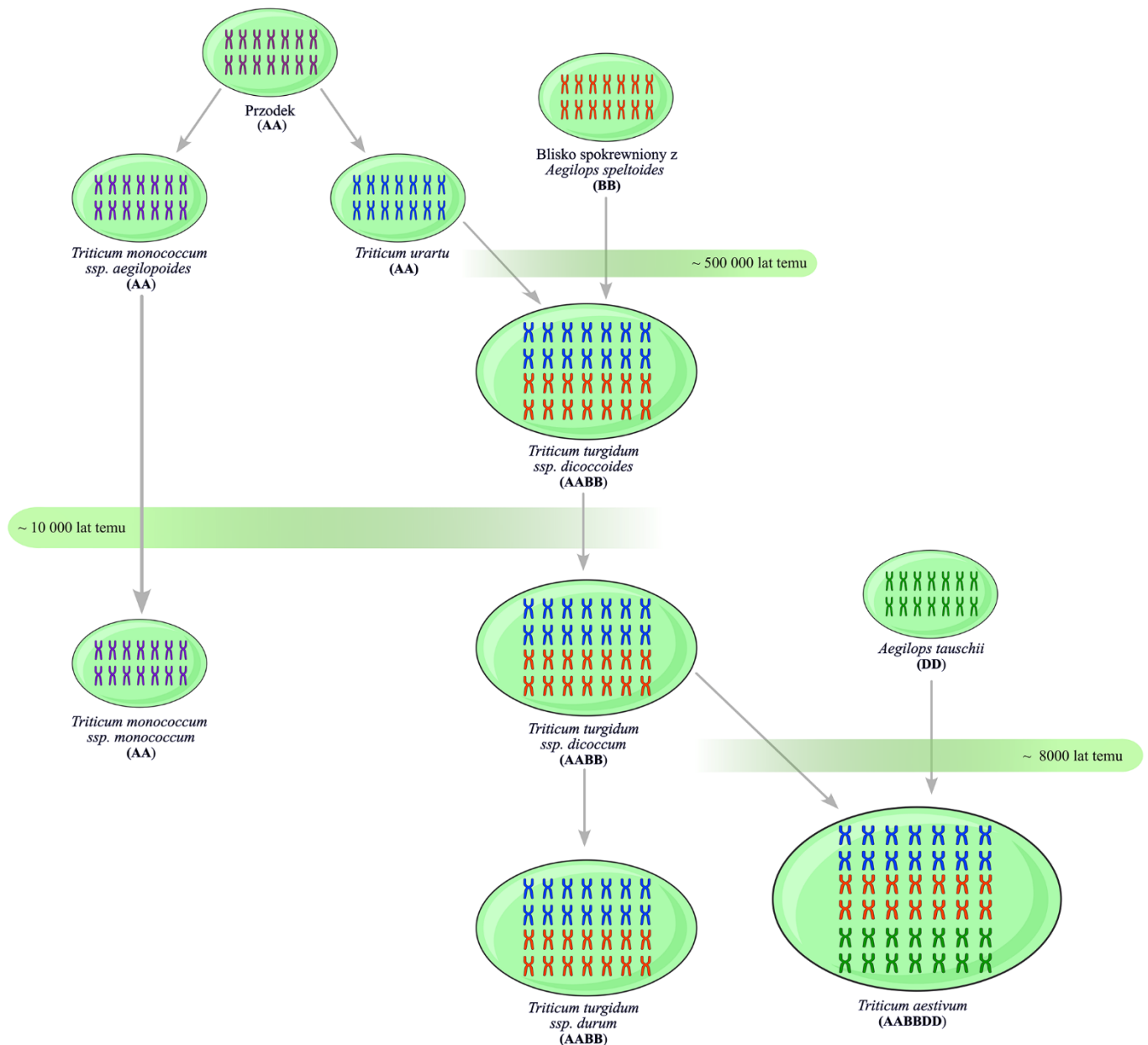
Ewolucja rolnicza mająca miejsce około 10 000 lat temu na obszarze Żywnego Półksiężyca, aktualnych terenach Bliskiego Wschodu odegrała kluczową rolę w rozwoju kultury rolniczej. Rozwój cywilizacji był kształtowany między innymi poprzez selekcję cech roślin, które były dostosowywane do potrzeb człowieka. W tym okresie pszenica (*Triticum aestivum* L.) stała się jedną z najważniejszych roślin uprawnych na świecie. (Faris, 2014). Pszenica odgrywała istotną rolę w Cesarstwie Rzymskim, które jest często opisywane jako imperium pszeniczne. W Chinach uważana była za jedną z pięciu świętych roślin obok prosa, ryżu, jęczmienia i soi. Zmiany w wykorzystaniu pszenicy w ciągu ostatnich dwóch tysiącleci wyraźnie pokazują, jak ludzie doskonalili mielenie mąki, w celu uzyskiwania rafinowanej białej mąki do produkcji pieczywa. Działania te doprowadziły do wzrostu znaczenia pszenicy w żywieniu człowieka w porównaniu z innymi zbożami, takimi jak jęczmień i żyto. Jednak główną przewagą pszenicy nad innymi zbożami ukształtował popyt konsumentów na biały chleb, powodując wzrost produkcji pszenicy w wielu krajach zachodnich, a także udoskonalenia jej pod kątem genetycznym (Igrejas i Branlard, 2020).

Pszenica uprawiana jest w prawie wszystkich regionach świata. Światowa średnia produkcja pszenicy sięga 777 mln ton na areale 219 mln ha (średnia 2020-2022, FAOSTAT), co przekłada się na średni plon ziarna wynoszący 3,54 t/ha. Azja i Europa to obszary o największym udziale w światowej produkcji pszenicy (odpowiednio 43,9% i 34,5%, średnia 2020-2022, FAOSTAT). Średni areal uprawy pszenicy na terytorium Polski w latach 2020 – 2022 wyniósł 2,4 mln ha, średnia produkcja sięgała 12,5 mln ton, dając średni plon ziarna 5,21 ton na hektar (FAOSTAT).

### 4.2 Ewolucja pszenicy

Pszenica nie ma bezpośredniego dzikiego heksaploidalnego przodka, powstała w wyniku dwóch poliploidyzacji. Pierwsza hybrydyzacja zaszła między diploidalną pszenicą bliską *Triticum urartu* ( $2n = 2x = 14$ ; AA) a nieodkrytym gatunkiem spokrewnionym z *Aegilops speltoides* (BB) tworząc *Triticum turgidum ssp. diccoides* ( $2n = 4x = 28$ ; AABB), następną hybrydyzacja form *Triticum turgidum ssp. dicoccum* ( $2n = 4x = 28$ ; AABB) i *Aegilops tauschii* ( $2n = 2x = 14$ ; DD) doprowadziła do powstania heksaploidalnej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) ( $2n = 6x = 42$ ; AABBDD) (Rycina 1) (El Baidouri i in., 2017). Rozmiar genomu pszenicy szacowany jest na ~ 16 Gbp, z czego większość genomu stanowią retrotranspozony, które szacuje się na ~ 85% sekwencji powtarzalnych (Alonge i in., 2020).

Rycina 1. Teoria pochodzenia pszenicy, na podstawie Vergauwen & De Smet (2017)



Pochodzenie pszenicy tetraploidalnej opisywane jest poprzez dwie hipotetyczne teorie: mono i polifiletyczną. Teoria monofiletyczna zakłada, że odmiany pszenicy tetraploidalnej (AABB) pochodzą od jednego przodka. Oznaczając, że jednorazowa hybrydyzacja między diploidalnym przodkiem (AA) a gatunkiem traw (BB) (np. *Aegilops speltoides*) dała początek kolejnym formom tetraploidalnej pszenicy. W wyniku tej teorii wszystkie współczesne odmiany pszenicy tetraploidalnej byłyby ściśle ze sobą spokrewnione i miałyby wspólną genealogię. W teorii polifiletycznej głównym założeniem jest, że różne odmiany pszenicy tetraploidalnej powstały w wyniku niezależnych zdarzeń hybrydyzacyjnych między diploidalnym gatunkiem (AA) a różnymi populacjami traw z genomem BB (np. *Aegilops* z sekcji Sitopsis, genom S). Oznacza to, że pszenica tetraploidalna mogła powstać kilkakrotnie, w różnych miejscach oraz różnym czasie. W teorii

polifiletycznej różne odmiany pszenicy tetraploidalnej mogłyby mieć różne pochodzenie i nie byłyby ze sobą ściśle spokrewnione, pomimo dzielącego ich tego samego układu genomowego (AABB), sugerowałyby to większą różnorodność w obrębie tych form pszenicy (Feldman i Levy, 2023; Katamadze i in., 2023).

Obie te teorie były przedmiotem intensywnych badań filogenetycznych, obejmujących analizę sekwencji DNA, badania cytogenetyczne oraz analizę różnorodności genetycznej. Współczesne badania sugerują, że pochodzenie monofiletyczne pszenicy tetraploidalnej jest bardziej prawdopodobne, jednak pewne dowody wskazują również na możliwość występowania niezależnych zdarzeń hybrydacyjnych. Mimo że, teoria monofiletyczna jest bardziej akceptowana, nie można całkowicie wykluczyć teorii polifiletycznej, możliwe, że oba procesy miały miejsce, co by oznaczało, że różne populacje pszenicy tetraploidalnej, mogą mieć zróżnicowane pochodzenie (Feldman i Levy, 2015, 2023; Katamadze i in., 2023).

#### 4.2.1 Przodkowie pszenicy z genomem A

Wyróżniamy dwa dzikie gatunki diploidalne *Triticum*: *T. boeoticum* (syn. *T. monococcum* subsp. *aegilopoides*) ( $A^bA^b$ ) oraz *T. urartu* ( $A^uA^u$ ). Różnią się one morfologią roślin, a także loci markerowych. Diploidalna pszenica *T. monococcum* była jedną z pierwszych udomowionych roślin na obszarze Żytnego Półksiężycza. W trakcie udomawiania *T. monococcum* zostało podzielone przez silne zróżnicowanie genetyczne na trzy rasy: rasę  $\alpha$ , rasę  $\beta$  oraz rasę  $\gamma$ . Jednak tylko rasa  $\beta$  została wykorzystana do dalszych upraw. Dokładnie udomowienie tej formy miało miejsce w górach Karacadag w południowo-wschodniej Turcji. Diploidalna pszenica rozpowszechniła się w kilku miejscach pod nazwą einkorn (*T. monococcum* L. subsp. *monococcum*). Nazwa pochodzi od „Einkorn” co oznacza „pojedyncze ziarno” i odnosi się do występowania tylko jednego ziarna na kłos. Jednakże nazwa ta czasami jest używana zarówno dla form dzikich (subs. *aegilopoides*), jak i uprawnych (subsp. *monococcum*). We wczesnym neolicie zboże to było niezwykle ważne, jednak obecnie jest również szeroko uprawiane w zachodniej Turcji, na Bałkanach, w Szwajcarii, Niemczech, Hiszpani i na Kaukazie. Brandolini i in., (2006) określili w swoich badaniach podobieństwo genetyczne między genomami  $A^b$  i  $A^u$  metodą AFLP. Wyniki wykazały, że genom *T. urartu* w porównaniu do *T. boeoticum*, jest około 20% bliższy genomowi A pszenicy uprawnej (*T. aestivum*) uznając go za bezpośredniego przodka genomu A (El Baidouri i in., 2017; Kilian i in., 2007; Noweiska i in., 2022; Zaharieva & Monneveux, 2014).

Ustalenie dawcy genomu B jest bardziej złożone. Tetraploidalny gatunek *T. turgidum* starszy od pszenicy heksaploidalnej, uległ większemu zróżnicowaniu pod kątem biochemicznym,

molekularnym, cech morfologicznych oraz typu cytoplazmy. Skutkiem czego jest trudniejsza identyfikacja bezpośrednio dawcy genomu B. Badania nad koniugacją chromosomów homologicznych podczas fazy mejozy, kariotypem, morfologią roślin i rozmieszczeniem geograficznym dzikich gatunków związanych z pszenicą i ich mieszańców z gatunkami pszenicy zidentyfikowały kociońca *Aegilops speltoides* Tauschi ( $2n = 2x = 14$ , genom SS) jako najbliższego przodka genomu pszenicy B (Nawracała, i in. 2004). W swoich badaniach (W. Zhang i in., 2018) potwierdzili, że forma *Ae. speltoides* nie powinna być uważana za wyłącznego dawcę genomu B, prawdopodobnie jest jednym z diploidalnych przodków zaangażowanych w pochodzenie genomu, zgodnie z teorią pochodzenia polifiletycznego. Natomiast pochodzenie genomu D *T. aestivum* jest potwierdzone m.in. analizami RFLP, gdzie zmienność genomu *Ae. tauschii* była bardzo podobna do genomu D odmiany referencyjnej Chinese Spring (Nawracała, i in. 2004).

Skomplikowana filogeneza, udomowienie, intensywna presja selekcyjna są przyczyną ograniczenia puli genowej pszenicy, zmniejszając poziom zmienności genetycznej dostępnej w programach hodowlanych. Pojawiające się choroby oraz znaczące zmiany klimatyczne dodatkowo wpływają negatywnie na plony pszenicy. Niezbędne jest zatem zwiększanie różnorodności genetycznej i poszukiwanie nowych źródeł genów odporności (W. Zhang i in., 2018).

### 4.3 Zagrożenia w uprawie pszenicy

Choroby roślin są aktualnie główną przyczyną strat w produkcji roślinnej. Patogeny roślinne są przyczyną redukcji plonów o 1/5. W wartościach bezwzględnych straty te wynoszą rocznie ok. 210 mln ton ziarna, jest to ilość wystarczająca do wypieku 290 mld bochenków chleba. Wiele głównych chorób występuje w późnym okresie wegetacji. W walce tej nie tylko na szali stawiane jest pożywienie, ale również energia, zasoby i woda, które są niezbędne do jej uprawy. Energia potrzebna do uprawy 210 milionów ton pszenicy, mogłaby zapewnić energię elektryczną dla 40-390 milionów gospodarstw domowych przez rok (Wulff i Krattinger, 2022). Patogeny roślinne stanowiąc główne ograniczenie w produkcji pszenicy, zmniejszają prognozowane zbiory na świecie średnio o 21% każdego roku. Cztery główne choroby: rdza brunatna, fuzarioza kłosów zbóż, septorioza paskowana liści pszenicy, rdza żółta – odpowiadają za ponad połowę strat, za ponad 90% odpowiada reszta chorób i szkodników.

#### 4.3.1 Rdza brunatna

Rdza brunatna wywoływana przez patogen grzybowy *Puccinia triticina* Eriks jest jedną z kluczowych chorób pszenicy, która może powodować straty w plonach, sięgające nawet do 50%.

Rozpowszechniona jest we wszystkich rejonach uprawy pszenicy, występuje corocznie w zmiennym nasileniu. Rdza brunatna jest chorobą dwudomową, jednak w warunkach Europy Środkowej rozwija się z pominięciem fazy żywiciela pośredniego. Zimuje w postaci grzybni i urediniospor na oziminach, samosiewach i różnych trawach łąkowych. Pierwsze objawy choroby występują wczesną wiosną w postaci pojedynczych urediniów. W kolejnych miesiącach rozwijają się pod skórka liścia, w postaci owalnych koloru jasnobrązowego skupienia urediniospor. Uredinia mogą się tworzyć również na pochwach liściowych, źdźbłach i kłosach. Gdy uredinie rozerwą epidermę liści, urediniospory są uwalniane. Zarodniki przenoszą się łatwo z prądami powietrza, również na duże odległości. Zakażenie rośliny występuje w świetle jak i ciemności, najbardziej optymalną temperaturą dla tego procesu jest zakres pomiędzy 15-18°C, przy względnej wilgotności powietrza 100% (Aktar-Uz-Zaman i in., 2017; K. Kumar i in., 2022; Prasad i in., 2020a).

Patogen *Pt* w przyrodzie charakteryzuje się mnogą ilością ras o zróżnicowanym poziomie zjadliwości. Związane jest to między innymi z ewolucją patotypów, która pozwala rozwijać wirulencję przeciwko odmianom pszenic zawierającym geny odporności. Zarodniki mogą łatwo rozprzestrzeniać się na tysiące kilometrów od początkowego miejsca infekcji, co prowadzi do wystąpienia epidemii na skalę kontynentu (Aktar-Uz-Zaman i in., 2017; Prasad i in., 2020a). Istnieją dwa sposoby zwalczania rdzy brunatnej w pszenicy: kontrola chemiczna oraz odporność genetyczna, która jest korzystniejsza ze względów środowiskowych oraz ekonomicznych (Ellis i in., 2014).

#### 4.4 Geny odporności na rdzę brunatną

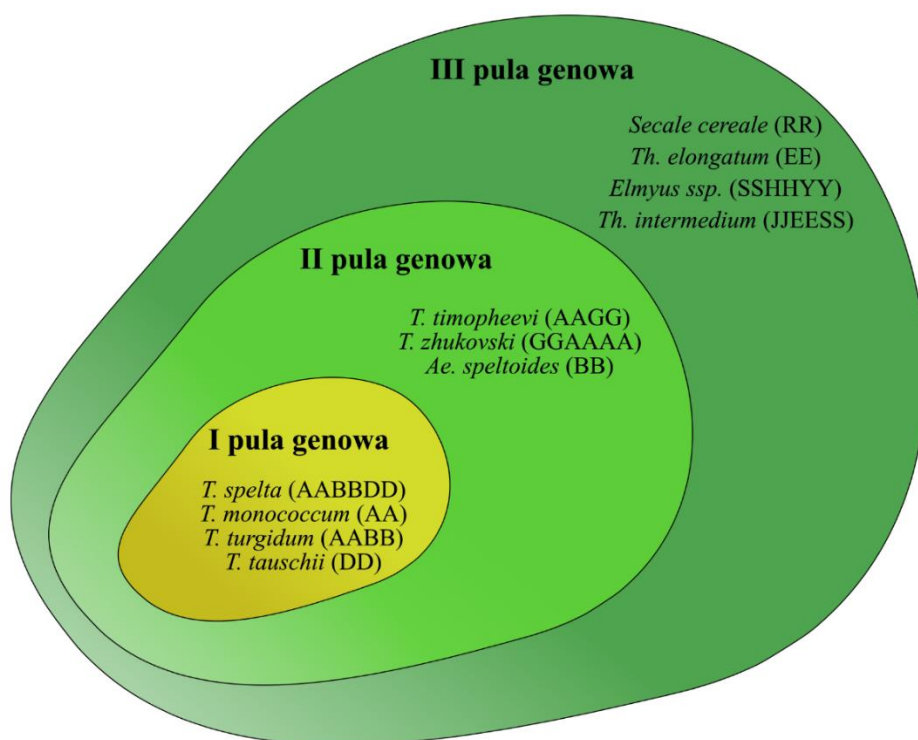
Od momentu zidentyfikowanego pierwszego genu *Lr* (ang. *Leaf rust*) w 1946 r., zidentyfikowano ponad 80 genów odporności na rdzę brunatną, z których większość została zmapowana na określonych chromosomach przy użyciu markerów DNA. Zgodnie z teorią Flor'a (1971) „gen na gen” aktywność każdego genu *Lr* zależy od odpowiadającego mu genu awirulencji (*Avr*). Patogeny poprzez mutacje lub rekombinacje powodujące zmiany w sekwencji m.in. genów awirulencji, prowadzą do braku rozpoznania przez geny odporności rośliny. W związku z tym odporność gospodarza ulega przełamaniu i jest krótkotrwała. Według niektórych szacunków, odporność wywołana konkretnym genem *Lr* trwa około 5-7 lat (Ellis i in., 2014; Kumar i in., 2022).

Geny odporności możemy podzielić na dwie klasy: geny główne nadające odporność specyficzną dla rasy lub szczepu patogenu (geny R) oraz geny odporności roślin dorosłych (geny APR). Geny główne działają przede wszystkim od stadium siewki do stadium dorosłej rośliny, podczas gdy geny APR funkcjonują głównie w stadium dorosłym rośliny. Ze względu na duży rozmiar pszenicy i złożony genom do tej pory tylko dziesięć genów zostało sklonowanych: *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr21*, *Lr22a*, *Lr34*, *Lr42*, *Lr67* (Kumar i in., 2022; Li i in., 2023).

#### 4.4.1 Gatunki pokrewne pszenicy, jako rezerwuuar genów przydatnych hodowli roślin

Co najmniej 50% genów odporności na rdzę brunatną pochodzi od dzikich krewnych gatunków. Dzicy krewni roślin uprawnych (ang. *crop wild relatives*, CWR) są to rośliny, które rosną w warunkach naturalnych, a literatura wskazuje, że nie uległy one procesowi udomowiania. Rośliny CWR posiadają cechy korzystne dla hodowli, zwłaszcza geny odporności na stesy biotyczne i abiotyczne, które zostały utracone podczas udamawiania zbóż oraz dalszych selekcji hodowlanych (Kumar i in., 2022). Źródła zmienności genetycznej wykorzystywane do udoskonalania pszenicy uprawnej zostały sklasyfikowane do pierwszo-, drugo-, i trzeciorzędowej puli genowej (Rycina 2).

Rycina 2. Schemat pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej puli genowej



Pierwszorzędowa pula genowa obejmuje gatunki z rodzaju *Triticum* i *Aegilops*, które są protoplastą dla heksaploidalnej pszenicy. Transfer genów odbywa się na zasadzie homologicznej rekombinacji w efekcie krzyżowań prostych, wstecznych oraz odpowiedniej selekcji. Drugorzędowa pula genowa składa się z gatunków należących do *Triticum* i *Aegilops*, ale zawierają tylko jeden subgenom pszenicy. Transfer genów jest możliwy na zasadzie krzyżowań prostych, rekombinacji tylko pomiędzy homologicznymi genomami i za pomocą specjalnych manipulacji cytogenetycznych dotyczących pozostałych niehomologicznych genomów. Dodatkową metodą wspomaganą

z wykorzystaniem tych gatunków może być „embryo rescue”. Trzeciorzędowa pula genowa uwzględnia diploidalne i poliploidalne gatunki z rodzajów należących do plemienia Triticeae, których genomy różnią się od *T. aestivum*. Transfer genów wymaga specjalnych technik cytogenetycznych, które spowodują nie-homologiczne rekombinacje chromosomów. Stosuje się między innymi: napromieniowanie, wykorzystanie mutantów *ph1* lub indukcje translokacji za pośrednictwem kultur *in vitro*. *Secale cereale*, *Thinopyrum elongatum*, *Thinopyrum intermedium* są gatunkami należącymi do trzeciorzędowej puli genowej i stanowią one ogromy i w dużej mierze niewykorzystany rezerwuuar zmienności genetycznej, który może być wykorzystywany do poprawy pożądanych cech pszenicy (Gupta, 2016; Kwiatek i in., 2017).

*Thinopyrum elongatum* (syn. *Agropyron elongatum*, *Lophopyrum elongatum*) należy do rodzaju *Thinopyrum*, który pod koniec XX wieku został wyodrębniony z większego rodzaju Elytrigia, wraz z rodzajem Lophopyru i Trichopyrum. Zidentyfikowano odmiany diploidalne ( $2n = 2x = 14$ ; EE), tetraploidalne ( $2n = 4x = 28$ ; EEEE) oraz dekaploidalne ( $2n = 10x = 70$ ; EEEEEStStStSt). W literaturze można zauważyć znaczne zamieszanie w rozróżnianiu między dekaploidalnym *Th. elongatum* a jego pokrewnym dekaploidalnym *Th. ponticum*, do pewnego momentu gatunki te były określane tą samą nazwą *Agropyron elongatum*. Tetraploid *Th. Elongatum* jest źródłem genów, które zapewniają odporność na stropy biotyczne i abiotyczne, służy również do zwiększania różnorodności genetycznej pszenicy uprawnej. Formy diploidalne oraz dekaploidalne *Th. elongatum* do tej pory stanowią główne źródło genów odporności (Baker i in., 2020; Li i in., 2018). Kolejnym gatunkiem niosącym wysoce efektywne geny odporności z rodzaju *Thinopyrum* jest alloheksaploid *Thinopyrum intermedium* (Host) (=Elytrigia intermedia (Host) Nevski, *Agropyron intermedium* (Host) P. B., *Agropyrum glaucum* (Desf.ex DC) Roem et Schult.), jego genom opisywany jest na dwa sposoby:  $EEE^sE^sStSt$  lub  $JJJ_sJ_sStSt$ . Gatunek z rodzaju *Pseudoregneria* uznawany jest jako domniemany dawca genomu St, dla genomu E (=J) brani są pod uwagę *Th. bessarabicum* lub *Th. elongatum*. Podczas ewolucji w wyniku rekombinacji genomów E (=J) i St powstał genom  $E^{st}$  (=J<sub>s</sub>). Złożona struktura tych genomów utrudnia zidentyfikowanie ich dokładnych przodków. W dotychczasowych badaniach, obserwowana jest duża ilość polimorfizmów, wskazująca na polimorfizm wewnątrzpopulacyjny (Jensen i in., 2016; Mahelka i in., 2011; Salina i in., 2015). W hodowli introgresywnej pszenicy najczęściej wykorzystywane są: *Th. elongatum* D. R. Dewey ( $2n = 2x = 14$ ), *Th. bessarabicum* (Savul & Rayss) Á. Löve ( $2n = 2x = 14$ ), *Th. junceiforme* Á. Löve ( $2n = 4x = 28$  lub  $2n = 6x = 42$ ), *Th. intermedium* Barkworth & D. R. Dewey ( $2n = 6x = 42$ ) oraz *Th. ponticum* Beauv. ( $2n = 10x = 70$ ) (Cui i in. 2018).

Gen odporności na rdzę brunatną *Lr19* przeniesiony z *Agropyron elongatum*, do długiego ramienia chromosomu 7D pszenicy przez Sharmę i Knotta (1966), przez wiele lat zapewniał wysoką odporność na wielu obszarach, jednak została ona przełamana. Gen ten jest sprzężony z genem *Sr25*

warunkującym odporność na rdzę żdźbłową. Translokacja 7DS.7DL-7Ae#1L niosąca gen *Lr19* związana jest również ze zwiększonym plonem ziarna (S. K. Gupta i in., 2006). Kolejnym genem pochodzącym z *A. elongatum*, jest gen *Lr24*, który został przeniesiony przez Searsa (1973) uzyskując linie z translokacją 3Ag/3DL (Schachermayr i in., 1995). Gen *Lr24* sprzężony jest również z genem warunkującym odporność na rdzę żdźbłową *Sr24* (X. F. Xu i in., 2017; Yadav i in., 2021).

Na krótkim ramieniu chromosomu 1R żyta (*Secale cereale* L.), zlokalizowanych jest kilka genów nadających odporność na ważne choroby pszenicy. Są to geny odporności na rdzę brunatną (*Lr26*), rdzę żółtą (*Yr9*), rdzę żdźbłową (*Sr31*) oraz mączniaka prawdziwego (*Pm8*) (Crespo-Herrera i in., 2017). Translokacja 1RS.1BL związana jest także ze zwiększoną biomasą oraz wysokim plonem pszenicy (Sharma i in., 2018).

Gen *Lr38* pochodzący z *Thinopyrum intermedium* nadaje odporność roślinom w stadium siewki oraz roślinom dorosłym na wiele patotypów w Europie. Gen ten został wprowadzony do chromosomu 6DL pszenicy (Mebrate i in., 2008; Ren i in., 2023).

Gen *Lr63* pochodzący z *Triticum monococcum*, jako jedyny został zmapowany na dystalnej części chromosomu 3AS, warunkuje on niskie lub średnie infekcje dla patotypów *P. triticina*, dając możliwość do wykorzystania w programach hodowlanych (Kolmer i in., 2010; Noweiska i in., 2022).

#### 4.5 Hodowla odpornościowa

Trwała odporność na choroby ma kluczowe znaczenie dla osiągnięcia globalnego bezpieczeństwa żywnościowego oraz zrównoważonego rolnictwa. Jedną z możliwości poprawy odporności jest łączenie kilku genów w jednej roślinie – piramidyzacja. Strategia ta leży u podstaw niniejszej rozprawy doktorskiej, w której podjęto trud piramidyzacji genów odporności: *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr38* oraz *Lr63* w dwóch odmianach pszenicy jarej. Wprowadzenie w Unii Europejskiej obowiązku stosowania integrowanej ochrony roślin, strategię „Od pola do stołu” oraz „Na rzecz bioróżnorodności” określają obniżenie stosowania środków ochrony roślin o 50%. Wraz z postępem biologicznym, uzyskiwanie odmian odpornych na stesy biotyczne i abiotyczne jest jedną z możliwości uzyskania dobrej jakości plonu przy ograniczeniu stosowania środków chemicznych. Piramidyzacja jest sumą efektów pojedynczych genów. Pomimo czasochłonności i dużego nakładu pracy, uważana jest za skuteczny sposób zwiększania trwałej odporności na choroby (Liu i in., 2020). Niestety niewiele wiadomo na temat udziału różnych mechanizmów, które mogą przyczyniać się do trwałości piramid genów, oraz jakie kombinacje genów odporności mogą być najbardziej trwałe (Mundt, 2018).

Rozwój biologii molekularnej przyczynił się do rozwoju identyfikacji zmienności genetycznej, w szczególności do scharakteryzowania i opisanego genów. Najważniejszym etapem

w hodowli pszenicy jest selekcja osobników. Aktualnie klasyczna selekcja wspomagana jest z wykorzystaniem markerów molekularnych (MAS), które są sprzężone z pożądanymi cechami. Co prawda techniki te są wysoce specyficzne oraz wiarygodne niemniej jednak wymagają nakładu pracy, czasu oraz są kosztowne. Jednym z rozwiązań może być reakcja multipleks PCR, która jest z powodzeniem stosowana w wielu obszarach badań DNA. Pozwala ona na jednoczesną amplifikację dwóch lub więcej loci w ramach jednej reakcji. Wiąże się to ze skróceniem czasu badań, a także co kluczowe kosztem analiz (Noweiska i in., 2023).

W przeciwieństwie do mutacji, introgresja umożliwia wprowadzenie dużej liczby nowych alleli, co może być źródłem nowych funkcjonalnych alleli, a nawet adaptacji do cech poligenicznych (Ellstrand, 2014). Zjawisko hybrydyzacji i introgresji znana jest dla naukowców od dawna, pierwszy próby uzyskania mieszańców pszenicy i żyta zostały opisane już w XIX wieku. Początek lat XX związany z ulepszaniem metod hodowli tkankowej *in vitro* pozwoliły na sukcesy wcześniej niemożliwych do uzyskania form mieszańcowych. Od momentu wprowadzenia terminu „inżynieria chromosomowa” w 1972 roku przez Searsa, szeroko zaczęto stosować podejścia biologii molekularnej do wykorzystywania różnorodności genetycznej w różnych pulach genowych i opracowywania nowych źródeł genetycznych, które pochodzą z obcych gatunków. Pomimo wielu postępów hodowla introgresyjna nadal jest w dużej mierze empiryczna i niezbędne są dalsze badania, aby wprowadzać precyzyjnie korzystne allele bez negatywnego wpływu na pozostałe cechy (Balfourier i in., 2019; Zhao i in., 2021)

Fluorescencyjna oraz genomowa hybrydyzacja *in situ* (FISH/GISH) są szeroko stosowane do identyfikacji obcych segmentów chromosomów w genomie pszenicy. Pierwsze takie próby zostały podjęte już w latach 90-tych, z sukcesem identyfikując chromosomy żytnie. Metoda GISH polegająca na hybrydyzacji *in situ* z wyznakowanym genomowym DNA obcego gatunku, pozwala na dokładne określenie obecności obcych segmentów chromosomów w pszenicy. Technika (mcGISH) zapewniła bardziej precyzyjnej analizy genomu. Metoda ta służy do jednoczesnej identyfikacji kilku genomów w roślinach allopoloidalnych (Cai i in., 2001; Han i in., 2003; Pei i in., 2018)

Zastosowanie metody MAS oraz technik cytogenetycznych w hodowli odpornościowej, może ułatwić oraz przyspieszyć wybór otrzymywanych pokoleń, dążąc do uzyskiwania ulepszonych odmian pszenicy. Selekcja genotypów na podstawie markerów molekularnych sprzężonych z *locus* cechy, jest bardziej precyzyjna od oceny fenotypowej.

#### 4.6 Reakcja rośliny na patogen

Infekcja patogenem powoduje złożony, wielopoziomowy szereg reakcji obronnych ukierunkowanych na indukcję syntezy białek obronnych, izolację patogenu w miejscu wniknięcia za

pomocą zaprogramowanej śmierci komórek, syntezę wtórnych metabolitów czy też indukcji interferencji RNA (w przypadku infekcji wirusowej). Rośliny rozwinęły mechanizmy obronne uwzględniając dwa szlaki odporności, uruchamiane podczas infekcji, służące do ochrony przed stresami biotycznymi takimi jak patogeny roślinne. Pierwszy szlak opisywany jako model zygzakowy, zakłada, że rośliny rozpoznają wzorce molekularne związane z m. in. patogenami (PAMP, ang. *pathogen-associated molecular patterns*) określane jako nieswoiste elicytory. Drugi szlak związany jest z bezpośrednim rozpoznaniem efektorów przez wewnątrzkomórkowe receptory kodowane przez geny odporności R, skutkując uruchomieniem specyficznej odporności, wyzwalanej przez efektor ETI (ang. *effector-triggered immunity*). ETI w większości przypadków prowadzi do reakcji nadwrażliwości (HR, ang. *hypersensitive response*) skutkując śmiercią komórki. W ramach kaskady reakcji odpornościowych dochodzi do: powstawania reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*); akumulacji białek powiązanych z patogenezą (PR, ang. *pathogenesis-related proteins*) takich jak glukanazy; wzmocnienia ściany komórkowej poprzez syntezę i dekomponowanie kalozy, związanej z indukcją kompleksów enzymatycznych takich jak peroksydazy; oraz produkcji metabolitów wtórnych o charakterze antygrzybicznym (fitoaleksyn) (Banasiak, 2022; Lata, Prasad, i in., 2022).

Reakcje obronne roślin obejmują procesy komórkowe takie jak rozpoznawanie wzorców lub efektorów związanych z patogenami, kaskadę kinaz aktywowanych mitogenami, transkrypcję genów związanych z patogenezą (PR) oraz reakcją nadwrażliwości (HR). Nabyta odporność systemiczna (SAR ang. *Systemic acquired resistance*) nazywana odpornością „całej rośliny” aktywowana jest w odpowiedzi na infekcję patogenem, zaczyna się od pojedynczych komórek, a kończy na nekrotycznych zmianach widocznych na roślinie. Białka PR stanowią część mechanizmu SAR w szlakach transdukcji sygnału. Do tej pory zidentyfikowano prawie 19 rodzin białek PR (PR1 - PR19) u roślin jedno- i dwuliściennych na podstawie ich związków strukturalnych oraz aktywności biologicznej. Niektóre z tych białek opisywane są jako zaangażowane w reakcji odporności pszenicy na infekcję patogenem *P. triticinia* (Conrath, 2006; Loon i in., 2006; Prasad i in., 2020b).

$\beta$ -1,3-glukanazy należą do rodziny PR2 klasyfikowanej jako enzymy z klasy hydrolaz (endonukleazy) (E.C.3.2.1.39). Są enzymami wielofunkcyjnymi, na przestrzeni lat opisano cztery podrodziny  $\beta$ -glukanaz (A, B, C i D), a wśród podrodzin wyodrębniono dziesięć  $\beta$ -1,3-glukanaz (Linton, 2020).  $\beta$ -1,3-glukany oraz chityna stanowią podstawowy składnik strukturalny ścian komórkowych. Glukanazy ( $\beta$ -1,3) odgrywają nie tylko ważną rolę w reakcji odpornościowej na stresy biotyczne i abiotyczne, ale poprzez swoje rozmieszczenie wzdłuż rośliny są zaangażowane również we wzrost roślin oraz kiełkowanie nasion. Naturalnie poziomy ekspresji genów  $\beta$ -1,3-glukanazy są stosunkowo niskie, podczas infekcji patogenem następuje szybka akumulacja enzymu prowadząc do zwiększonej aktywności hydrolitycznej.  $\beta$ -1,3-glukanazy działając synergistycznie z chitynazami,

katalizują degradację ściany komórkowej roślin poprzez wydzielanie do apoplastu po infekcji grzybiczej, przyczyniając się do kluczowej roli w reakcji odpornościowej (dos Santos i Franco, 2023; Gao i in., 2016; Prasad i in., 2020b).

Białka podobne do taumatyny (TLP, ang. *Thaumatococin-like proteins*) należą do rodziny PR5, białka te jednak nie są szczegółowo przebadane zwłaszcza w uprawach zbóż. Ich określenie „białko podobne do taumatyny” wiąże się z ich sekwencją aminokwasów i strukturalnym podobieństwem do białek o słodkim smaku z owoców zachodnioafrykańskiego krzewu *Thaumatococcus daniellii* (Li i in., 2015) Są indukowane w roślinie po infekcji patogenu i ekspozycji na elicytory. Działanie TLP obejmuje zmiany w integralności błony komórkowej grzybów prowadząc do zahamowania wzrostu grzybów, lizy zarodników oraz degradacji ścian komórkowych. Co więcej kilka białek z grupy PR5 do tej pory z powodzeniem zostało wykorzystane w celu poprawienia odporności roślin na stesy biotyczne oraz abiotyczne m.in. białko *DcTLP* z marchwi (*Daucus carota*) ulegało silnej ekspresji w stresie suszy (Sharma i in., 2022; Zhang i in., 2017). W swoich badaniach (Zhang i in., 2017) wyizolowali gen *TaLr19TLP1* z pszenicy należący do rodziny PR5. Białka PR5 wykazują swoje działanie w odpowiedzi na infekcję grzybem poprzez gwałtowny i znaczny wzrost przepuszczalności błony komórkowej patogenu, poprzez zakłócenie dwuwarstwy lipidowej tworząc pory transbłonowe (El-kereamy i in., 2011).

Peroksydazy (PR9) zaangażowane są również w reakcję odpornościową roślin. Pośredniczą w odporności gospodarza poprzez syntezę barier strukturalnych lub wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) i reaktywnych form azotu (RNS), w celu zapobiegnięcia rozprzestrzeniania się patogenu w komórkach. Niektóre białka z rodziny PR9 zaangażowane są w redukcję  $H_2O_2$ , co może przyczyniać się do zwiększonej podatności pszenicy na patogeny wywołujące mączniaka prawdziwego oraz rdzę brunatną. Białka PR9 zaangażowane są w proces lignifikacji i gojenia się ran u roślin, a także uczestniczą w regulacji wydłużania komórek. Oprócz aktywowania szlaków sygnałowych, zdolne są do polimeryzacji makromolekuł, które odkładają się na powierzchniach zewnątrzkomórkowych prowadząc do utrudnienia infekcji patogenem. (dos Santos i Franco, 2023; Prasad i in., 2020b).

U roślin wyróżniamy dwie klasy peroksydaz (PRX): peroksydazy klasy I – wewnątrzkomórkowe oraz peroksydazy klasy III - wydzielane do apoplastu i wakuoli. Peroksydazy klasy III (PRA2) odgrywają ważną rolę w reakcji produkcji i usuwania ROS poprzez katalizowanie reakcji redoks między nadtlenkiem wodoru ( $H_2O_2$ ) z różnymi związkami organicznymi i nieorganicznymi (Yan i in., 2019). W początkowej aktywności peroksydazy mają potencjał do generowania  $H_2O_2$ , co prowadzi do osłabienia uszkodzeń oksydacyjnych i zapobiega infekcji patogenów, ostatecznie prowadząc do tolerancji rośliny na stres. W dalszych etapach reakcji uczestniczą w szlaku sygnalizacyjnym oraz odpowiedzi hormonalnej (Dmochowska-Boguta i in.,

2013; Kidwai i in., 2020). W porównaniu do innych reaktywnych form tlenu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest najbardziej stabilny i najmniej reaktywny, łatwo przenika przez błonę co sprawia że jest dobrą cząsteczką sygnałową (Jiao i in., 2024). Dostępne są dane literaturowe dotyczące biochemicznych i fizjologicznych aspektów peroksydazy roślin w warunkach stresu, jednak ich funkcjonalna charakterystyka, podstawy molekularne i genetyczne nie są w pełni poznane (Kidwai i in., 2020).

Rośliny z genami odporności przeciwdziałają infekcji patogenu wyzwalając efektor ETI. Wysoce specyficzna reakcja odporności aktywowana jest podczas gdy gospodarz jest nosicielem genu głównego (R), a patogen zawiera odpowiedni gen awirulencji (*Avr*). Obrona, w której pośredniczą geny R, odbywa się przez regulacje ekspresji genów związanych m.in. z patogenezą (PR). Zrozumienie specyficznej interakcji genów *Lr* między pszenicą a *Pt* wymaga dokładnej oceny wzorców poziomu ekspresji genów związanej z odpowiedzią na stres. Informacje te mogą być dalej wykorzystywane do opracowań nowych strategii w hodowli odporności roślin (Prasad i in., 2019).

## 5. Hipoteza badawcza i cel pracy doktorskiej

Praca miała na celu piramidyzację genów odporności na rdzę brunatną, pochodzących z pierwszo- i trzeciorzędowej puli genowej *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr38* i *Lr63* w podłożu genetycznym pszenicy. Hipoteza badawcza zakłada, że piramidyzacja genów odporności w porównaniu z odpornością warunkowaną przez jeden gen jest bardziej efektywna oraz istnieje związek między wielkością translokacji a jej dziedziczeniem. Cele były następujące:

- 1) Analiza krótkiego ramienia chromosomu 3A, związanego z markerami *locus Lr63* u diploidalnych gatunków pszenic,
- 2) Identyfikacja genów odporności *Lr* w genotypach pszenicy zwyczajnej z wykorzystaniem markerów molekularnych,
- 3) Jednoczesna identyfikacja chromatyny obcych segmentów pochodzących z gatunków *Thinopyrum* i *Secale cereale* z wykorzystaniem metody GISH,
- 4) Opracowanie protokołów multiplex PCR, do jednoczesnej identyfikacji markerów sprzężonych z genami: *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr38*,
- 5) Wyprowadzenie form mieszańcowych, a następnie:
  - › Analiza molekularna pokoleń: F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> i F<sub>3</sub>,
  - › Obserwacje pokolenia F<sub>3</sub> po inokulacji patogenem,
  - › Analiza poziomów ekspresji genów PR pokolenia F<sub>3</sub> za pomocą RT-qPCR

## 6. Materiał i metody

### 6.1 Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły 2 odmiany pszenicy jarej (*Triticum aestivum* L.), zarejestrowanych w Krajowym Rejestrze COBORU: pszenica Mantra pochodząca z Hodowli Roślin Strzelce sp. z o.o. Grupa IHAR, wpisana do krajowego rejestru w 2021 roku oraz KWS Carusum pochodząca z firmy KWS Lochow GmbH, zarejestrowana w 2022 roku. Odmiany te są polecane do upraw na terenie Polski, według danych pochodzących z PDO (Porejestrowe Doświadczalnictwo Odmianowe) odporność na rdzę brunatną w 2022 roku wyniosła odpowiednio 8,3 oraz 8,2; w 2023 roku 7,5 oraz 7,8 (Najewski i in. 2023). Podana skala 9<sup>o</sup> odporności według COBORU wykazuje 9 – stan najlepszy (najkorzystniejszy), 5 – stan średni (przeciętny), 1 – stan najgorszy (najmniej korzystny).

Do badań użyto 25 genotypów pszenicy jarej (Tabela 1), które według danych rodowodowych zawierają introgresję gatunków pokrewnych warunkujących odporność na rdzę brunatną, oraz 16 genotypów pszenicy diploidalnej do analizy markerów sprzężonych z genem *Lr63*. Do analiz molekularnych genów odporności *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr38*, *Lr63* wykorzystano odmiany referencyjne: TC+*Lr19*, TC+*Lr24*, TC+*Lr26*, TC+*Lr38* oraz TC+*Lr63* oraz kontrole negatywną Thatcher. W analizach cytogenetycznych zastosowano genotypy: pszenicy - Chinese Spring, żyta - Imperial, *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D. R. Dewey subsp. *intermedium* - GRA 744”, *Thinopyrum elongatum* (Host) D. R. Dewey - CPI23101. Ponadto do analiz chromosomu 3A użyto 16 akcesji diploidalnych pszenic, pochodzących z różnych regionów geograficznych (Tabela 1).

Nasiona pozyskano z National Small Grains Germplasm Facility, National Small Grains Collection Aberdeen, Idaho, USA oraz Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Niemcy.

Tabela 1. Genotypy pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) oraz form diploidalnych

Lp.	Genotyp	Numer identyfikacyjny	Pochodzenie	Gatunek
1.	Agatha	Cltr 14048	Kanada	<i>Triticum aestivum</i>
2.	-	Cltr 17474	Kanada	<i>Triticum aestivum</i>
3.	FL 7111A33-G1-G10	PI 519178	USA, Floryda	<i>Triticum aestivum</i>
4.	OK 77R6605	PI 519194	USA, Oklahoma	<i>Triticum aestivum</i>
5.	RL 6040	PI 520269	Kanada	<i>Triticum aestivum</i>
6.	CIGM98.744-1	PI 614022	Meksyk	<i>Triticum aestivum</i>

7.	CIGM98.745-1	PI 614023	Meksyk	<i>Triticum aestivum</i>
8.	CDLSr24Sr31	PI 675464	USA, Minnesota	<i>Triticum aestivum</i>
9.	CDLSr24Sr36	PI 675466	USA, Minnesota	<i>Triticum aestivum</i>
10.	Sr24	GSTR 517	USA, Minnesota	<i>Triticum aestivum</i>
11.	TC5	PI 578203	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
12.	TC6	PI 578204	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
13.	TC7	PI 578205	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
14.	TC9	PI 578206	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
15.	Z1	PI 578207	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
16.	Z2	PI 578208	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
17.	Z3	PI 578209	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
18.	Z4	PI 578210	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
19.	Z5	PI 578211	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
20.	Z6	PI 578212	Australia	<i>Triticum aestivum</i>
21.	WX-CIGM-295-1	PI 587164	Meksyk	<i>Triticum aestivum</i>
22.	WX-CIGM-295-2	PI 587165	Meksyk	<i>Triticum aestivum</i>
23.	WX-CIGM-295-3	PI 587166	Meksyk	<i>Triticum aestivum</i>
24.	WX-CIGM-295-4	PI 587167	Meksyk	<i>Triticum aestivum</i>
25.	WX-CIGM-295-5	PI 587168	Meksyk	<i>Triticum aestivum</i>
26.	-	Cltr 17667	Turcja	<i>Triticum urartu</i>
27.	G3220	PI428316	Iran	<i>Triticum urartu</i>
28.	Kaploutras	PI225164	Grecja	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>
29.	G3224	PI428011	Azerbejdżan	<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>
30.	84TK154-028.00	PI554513	Były Związek Radziecki	<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>
31.	Kromeriz	PI668147	Była Czechosłowacja	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>
32.	A TRI 613/59	PI277130	Albania	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>
33.	UKR-99-075	PI614649	Ukraina	<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>
34.	V.J. 388	PI290508	Węgry	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>
35.	GR05-052	PI662221	Grecja	<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>
36.	K930	PI307984	Maroko	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>
37.	-	Cltr 17664	Liban	<i>Triticum urartu</i>
38.	2498	PI170196	Turcja	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>
39.	WIR 18140	PI326317	Azerbejdżan	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>
40.	SN-264	PI591871	Gruzja	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>
41.	SY 20033	PI487265	Syria	<i>Triticum urartu</i>

## 6.2 Analizy molekularne

### 6.2.1 Izolacja genomowego DNA (P1, P2)

Izolacje DNA przeprowadzono na liściach uzyskanych z 10-dniowych siewek. Ekstrakcję wykonano przy użyciu zestawu Gene MATRIX Plant & Fungi DNA Purification KIT (EURx Ltd., Polska) zgodnie z załączonym protokołem. Jakość oraz stężenie uzyskanego DNA mierzono za pomocą spektrofotometru (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) przy długościach fali 260 i 280 nm. Próby wykorzystywane do analiz molekularnych były rozcieńczane buforem Tris (EURx Ltd., Gdańsk, Polska) do uzyskania stężenia 50 ng/μl.

### 6.2.2 Markery molekularne, reakcja PCR, multilpeks PCR (P1, P2)

W celu potwierdzenia obecności genów odporności wykorzystano markery molekularne sprzężone z genami odporności (Tabela 2). Analizy PCR przeprowadzono przy użyciu FastGene® Optima HotStart ReadyMix (NIPPON, Niemcy) według dołączonego protokołu producenta. Mieszanina reakcyjna składała się z: 2 μl matrycy DNA (50 ng/μl); 12,5 μl mix FastGene® Optima HotStart ReadyMix która składa się z: FastGene® Optima DNA Polymerase (0,2 U na μl reakcji), buforu FastGene® Optima (1X), dNTP (0,4 mM każdego dNTP w 1X), MgCl<sub>2</sub> (4 mM w 1X) i stabilizatory; starterów forward oraz reverse (Sigma-Aldrich, USA) 1,25 μl (10 μM) oraz wody 8 μl.

Tabela 2. Markery molekularne sprzężone z genami odporności na rdzę brunatną

Gen	Marker	Sekwencja (5'-3')	Wielkość produktu [pz]	Temperatura przyłączenia starterów [°C]	Źródło
<i>Lr19</i>	<i>Xwmc221</i>	F:ACGATAATGCAGCGGGGAAT R:GCTGGGATCAAGGGATCAAT	220 (+) 200 (-)	55	(Gupta i in., 2006)
<i>Lr24</i>	<i>Sr24#12</i>	F:CACCCGTGACATGCTCGTA R:AACAGGAAATGAGCAACGATGT	500	60	(Mago i in., 2005)
<i>Lr26</i>	<i>P6M12</i>	F:GTACTAGTATCCAGAGGTCACAAG R:CAGACAAACAGAGTACGGGC	260 / 360	55	(Mago i in., 2005)
<i>Lr38</i>	<i>Xwmc773</i>	F:GAGGCTTGATGTGCTTGA R:GCCAACTGCAACCGTACTCT	143	63	(Mebrate i in., 2008)
<i>Lr38</i>	<i>Xbarc273</i>	F:AATTCAGAGAAACACACCTCCCTTTTA R:ACTCCATCAACCCCGTTCATTA	230	52	(Mebrate i in., 2008)
<i>Lr63</i>	<i>Xbarc57</i>	F:GCGACCACCTCAGCCAACTTATTATGT R:GCGGGGAGGCACATTCATAGGAGT	240	60	(Kolmer i in., 2010)
<i>Lr63</i>	<i>Xbarc321</i>	F:TGCACTTCCCACAACACA TC R:TTGCCACGTAGGTGATTTATGA	191	52	(Kolmer i in., 2010)

Reakcja łańcuchowej polimerazy przebiegała w oparciu o standardowy protokół. Końcowa reakcja PCR obejmowała: denaturację wstępną w 95°C przez 3 minuty, następnie 35 cykli (denaturacji 95°C 30 sekund, przyłączania starterów 30 sekund, elongacji 72°C przez 1 minutę), kolejno elongacja końcowa w temperaturze 72°C trwająca 7 minut. Produkty amplifikacji przechowywano w 4°C. Analiza PCR przeprowadzana była przy użyciu termocyklera (SensoQuest GmbH).

W ramach opracowania reakcji multiplex PCR, wykorzystano markery podane w Tabeli 2. Skład mieszaniny multiplex PCR: 2 µl matrycy DNA (50 ng/µl); 12,5 µl mix FastGene® Optima HotStart ReadyMix która składa się z: FastGene® Optima DNA Polymerase (0,2 U na µl reakcji), buforu FastGene® Optima (1X), dNTP (0,4 mM każdego dNTP w 1X), MgCl<sub>2</sub> (4 mM w 1X) i stabilizatory; startery, uzupełniono wodą do 20 µl.

Końcowe reakcje multiplex PCR obejmowały: denaturację wstępną w 95°C przez 3 minuty, następnie 35 cykli (denaturacji 95°C 30 sekund, przyłączania starterów 55°C 30 sekund, elongacji 72°C przez 1 minutę), następnie elongacja końcowa w temperaturze 72°C trwająca 7 minut i przechowywanie w 4°C. Analizy multiplex PCR przeprowadzane była przy użyciu termocyklera (SensoQuest GmbH). Produkty reakcji PCR oraz multiplex PCR rozdzielane były w 2% żelu agarozowym (Bioshop) w buforze 1xTBE (Bioshop) z dodatkiem 4 µl Midori Green Advanced DNA Stain (NipponGenetics Europe, Germany) na 100 ml, przy 110 V przez 1,5 godziny. Do wizualizacji produktów amplifikacji wykorzystano system Molecular Imager Gel Doc™ XR UV z oprogramowaniem Biorad Bio Image™.

### 6.2.3 Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja, Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Izolację RNA z liści pszenicy zebranych w 6 punktach czasowych (0 przed infekcją, 6, 12, 24, 48, 72 godzin po inokulacji) przeprowadzono przy użyciu zestawu SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) zgodnie z załączonym protokołem. Stężenie RNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) przy długości fali A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. Syntezę cDNA przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją. Dla genów badanych oraz genów referencyjnych (Tabela 3) przeprowadzono reakcję PCR z gradientem temperaturowym, w celu optymalizacji profilu temperaturowego. Na podstawie danych literaturowych wybrano geny referencyjne do stabilnej ekspresji: *ARF*, *TUB* (Rampino i in., 2006; Scholtz & Visser, 2013). Gradient ustawiono w zakresie temperatur 56 °C a 62 °C, temperaturę

zwiększono co 0,7 °C. Po wizualizacji w 2% żelu agarozowym uzyskano produkt specyficzny dla każdego genu w temperaturze 60 °C.

Do wykonania krzywych wzorcowych, uzyskane amplikony były oczyszczane przy użyciu zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Hilden, Niemcy) zgodnie z załączonym protokołem. Następnie wykonano serię rozcieńczeń od 1 do 10<sup>-10</sup>, dla każdego oczyszczonego amplikonu oraz przeprowadzono reakcję dla uzyskania krzywych standardowych wydajności RT-qPCR (%E) i wartości R<sup>2</sup>. Uzyskane wartości otrzymano w programie Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Tabela 3).

Tabela 3. Sekwencje starterów genów badanych oraz genów referencyjnych, wydajność reakcji RT-qPCR

Gen	Sekwencja (5'-3')	Wielkość produktu [pz]	%E	R <sup>2</sup>	T <sub>m</sub> (°C)	Źródło
<b>TaLr19TLPI (PR5)</b>	F:CAACGAGAACCAGAAGGACAGC R:TACGGACGGACATACGGACACT	80	72,44	0,999	82,5	(Zhang i in., 2017)
<b>PR2</b>	F:GCACTTTGGGCTCTTCAACCCG R:GGCACCTTCTTCAAGTACAAA	161	71,80	0,999	81,0	(Lata i in., 2022)
<b>PR9</b>	F:CACTGGTTCGACGATCCT R:TTGAGGATTCAACCGTCGT	176	72,9	0,998	81,0	(Lata i in., 2022)
<b>TaPrx107 (PRA2)</b>	F:AGCAACATGGACCTCCTCAC R:GTGGCGGTCTCGATATCCT	92	74,4	0,997	84,5	(Dmochowska-Boguta i in., 2013)
<b>ARF</b>	F:GCTCTCCAACAACATTGCCAAC R:GCTTCTGCCTGTCACATACGC	165	83,80	0,998	79,5	(Scholtz i Visser, 2013)
<b>TUB</b>	F:CCCTGAGGTTTGATGGTGCT R:TGGTGATCTCAGCAACGGAC	156	100,60	0,998	81,5	(Rampino i in., 2006)

Reakcję RT-qPCR przeprowadzono przy użyciu iTaq Universal SYBR Green Supermix i CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Każda z przeprowadzonych analiz składała się z trzech powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Reakcję przeprowadzano na płytkach 96-dółkowych. Skład mieszaniny reakcyjnej: iTaq supermix - 5µl, startery Forward i Reverse (10µM) – 0,5µl każdy, woda - 3µl oraz cDNA - 1µl. Na każdą analizowaną płytkę nakładano kontrolę czystości odczynników (NTC). W reakcji qPCR wykorzystano następujący profil temperaturowy: denaturacja wstępna 3 minuty – 95 °C; następnie 40 cykli: denaturacja 10 sekund – 95 °C, przyłączanie starterów 30 sekund – 60 °C (pomiar fluorescencji). Etap topnienia: zakres temperatur od 65 °C do 90 °C, co 5 sekund temperaturę zwiększano o 0,5 °C i wykonywano pomiar fluorescencji. Znormalizowaną ekspresję genów ( $\Delta\Delta Cq$ ) uzyskano przy pomocy oprogramowania Bio-Rad CFX Maestro i narzędzia Gene Study (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), uwzględniając wydajność PCR a także wyniki uzyskane dla obu genów referencyjnych (Rychel-Bielska i in., 2020; Spychała i in., 2023).

## 6.2.4 Analizy statystyczne

Test Kołmogorowa-Smirnov'a został użyty do przetestowania hipotezy zerowej, mówiącej, że zestaw znormalizowanych wartości ekspresji dla określonego genu i odmiany wskazuje na rozkład zbliżony do normalnego. Test ten został przeprowadzony dla wszystkich kombinacji gen  $\times$  genotyp. Do weryfikacji o jednorodności wariancji przeprowadzono test Levene'a wariant Browna-Forsythe'a. Dla porównania średnich wykonano test t-Studenta (dwustronny). Dla każdego genu badanego porównano wartości ekspresji w każdym badanym punkcie czasowym względem ekspresji przed inokulacją mieszaniną zarodników. Znormalizowaną ekspresję genów oraz współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy badanymi genami przedstawiono za pomocą map cieplnych. W celu przetestowania stabilności ekspresji genów referencyjnych wykonano porównania wartości cT w każdym badanym punkcie czasowym po inokulacji względem wartości cT przed inokulacją patogenem. Analizy statystyczne zostały wykonane w programie Excel 2021 oraz Python 3.11.7.

## 6.3 Analizy cytogenetyczne

### 6.3.1 Przygotowanie preparatów metodą maceracji enzymatycznej

Do analiz cytogenetycznych nasiona kiełkowano na szalkach Petriego na bibule zwilżonej wodą przez 3-4 dni, w ciemności, w temperaturze pokojowej. 1-1,5 cm merystemy wierzchołkowe ścinano i umieszczano w lodowatej wodzie na 26 godzin. Wierzchołki korzeni utrwalano w mieszaninie etanolu i kwasu octowego (3:1), przechowywano w temperaturze -20°C.

Preparaty cytogenetyczne wykonywano z utrwalonych merystemy wierzchołkowych zgodnie z procedurą opisaną przez Kwiatka i in. (2016). Wierzchołki płukano 3-krotnie w 0,01M w buforze cytrynianowym (pH = 4,8), następnie umieszczano je w mieszaninie maceracyjnej składającej się z: 20% pektynazy (Sigma; *Aspergillus niger*), 1% celulazy (Calbiochem; *Aspergillus niger*) oraz 1% celulazy (Serva/Unimarket; „Onozuka R-10”, *Trichoderma viride*) inkubując w 37°C przez 2,5 godziny. Po trawieniu merystemy płukano w buforze cytrynianowym, następnie pod mikroskopem stereoskopowym Delta Optical StereoLight (Delta Optical, Polska) preparowaną igłą w kropli kwasu octowego 60% i przenoszono na szkiełko podstawowe oraz rozgniatano. Preparaty mrożono w ciekłym azocie, szkiełka nakrywkowe usuwano przy pomocy żyletki i zostawiano do wysuszenia. Jakość preparatu sprawdzano pod mikroskopem kontrastowo-fazowym Nikon EFD-3, do dalszych analiz wykorzystano preparaty z dużą ilością płytek metafazowych i niewielką ilością cytoplazmy.

### 6.3.2 Przygotowanie znakowanych sond oraz blokera

Genomowe DNA: pszenicy „Chinese Spring” stanowiące prekursor genomów A, B i D, żyta „Imperial” - prekursor genomu R, *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D. R. Dewey subsp. *intermedium* „GRA 744” - prekursor genomów J, J<sup>S</sup> i St, *Thinopyrum elongatum* (Host) D. R. Dewey „CPI23101” - prekursor genomu J<sup>c</sup>; wyizolowano przy użyciu zestawu Gene MATRIX Plant & Fungi DNA Purification KIT (EURx Ltd., Polska).

Genomowe DNA wyznakowano za pomocą fluorochromów Digoxigenin-11-ddUTP (Roche), Tetramethyl-Rhodamine-5-dUTP przy użyciu zestawu Nick Translation Mix (Roche) oraz fluorochromem Atto-674N (Jena Bioscience, Germany) wykorzystując Atto647N NT Labeling Kit. Skład mieszanin w reakcji nick translacji przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Składy mieszanin dla reakcji nick translacji

Nick Translation Mix (Roche)		Atto647N NT Labeling Kit	
Składnik	Objętość	Składnik	Objętość
dA (0,4 mM)	2,5 µl	10x NT labeling buffer	2 µl
dC (0,4 mM)	2,5 µl	Atto647N NT labeling mix	2 µl
dG (0,4 mM)	2,5 µl	enzym	2 µl
dT (0,4 mM)	1,67 µl	woda	8 µl
genomowe DNA (100 ng/µl)	6 µl	genomowe DNA (100 ng/µl)	6 µl
tetramethylrhodamine-5-dUTP/ digoxigenin-11-dUTP	0,83 µl		
Nick Translation Buffer 10x	2 µl		
enzym	2 µl		

Reakcja z wykorzystaniem zestawu Nick Translation Mix przebiegała w następujących warunkach: 15°C przez 95 minut oraz zatrzymanie reakcji w 60°C przez 15 minut. Przy użyciu zestawu Atto647N NT Labeling Kit warunki reakcja była przeprowadzana przez 90 minut w 15°C, w celu zatrzymania reakcji do mieszaniny dodawano 5µl buforu „Stop buffer”. Przygotowane sondy przechowywano w 4°C.

W celu przygotowania blokera, zastosowano genomowe DNA *Triticum aestivum*. Do 100 µl dodano 9 µl 5M NaCl i inkubowano w temperaturze 99°C przez 45 minut w celu fragmentacji DNA, następnie próby przełożono do lodu na 5 minut. Następnie dodano 11 µl 3M NaAC (1/10 objętości roztworu), oraz 300 µl 100% EtOH (2,5x objętości roztworu) schłodzonego w -20°C. Próby przechowywano na noc w -20°C. Kolejnego dnia próby wirowano 30 minut, w temperaturze 4°C,

przy obrotach 14000 rpm. Po wirowaniu zlano supernatant, osad przemyto 50µl 70% EtOH (-20°C), wkrapiając po ściankach probówki. Próby wirowano przez 5 minut w 4°C przy 14000 rpm. Po wirowaniu odsączono EtOH i suszono w cieplarni 37°C przez 15 minut. Uzyskany osad zawieszono w 100 µl H<sub>2</sub>O. Bloker stosowano w stosunku 1:50 (sonda:bloker).

### 6.3.3 Genomowa hybrydyzacja *in situ* (GISH)

Genomową hybrydyzację *in situ* wykonywano na podstawie protokołu Kwiatka i in., (2016) z modyfikacjami.

Preparaty inkubowano z RNAzą (10mg/ml w 2x SSC) w wilgotnej komorze 37°C przez 75 minut. Następnie szkiełka płukano 2 krotnie 2x SSC przez 5 minut w temperaturze pokojowej i utrwalano w 37% formaldehydzie w 10x PBS przez 15 minut. Ponownie płukano preparaty w 2x SSC przez 5 minut i odwodniano w szeregu alkoholowym (EtOH 70%, 90%, 100%) przez 3 minuty, następnie preparaty pozostawiono do wysuszenia. Mieszaninę hybrydyzacyjną przygotowano według składu przedstawionego w Tabeli 5.

Tabela 5. Skład mieszaniny hybrydyzacyjnej

Składnik	Objętość
Formamid 100%	40 µl
Siarczan dekstranu 50% (podgrzany przed użyciem)	16 µl
20x SSC	8 µl
10% SDS	4 µl
Wyznakowane genomowe DNA (300 ng):	
○ <i>Thinopyrum elongatum</i>	1 – 4 µl
○ <i>Thinopyrum intremredium</i>	
○ <i>Secale cereale</i>	
Bloker (1500 ng):	
○ <i>Triticum aestivum</i>	6 µl
<b>Calkowita objętość / preparat</b>	<b>78 µl / 38 µl</b>

Mieszaninę denaturowano przez 10 minut w 75°C, po czym stabilizowano na lodzie 10 minut. Na preparat nakładano mieszaninę po czym przykrywano je folią i poddawano denaturacji 70°C przez 4,5 minuty. Następnie umieszczano je w wilgotnej komorze i inkubowano w cieplarni 37°C przez 16-24h. Po hybrydyzacji szkiełka płukano w 2x SSC, 42°C przez 5 minut, następnie 2 krotnie płukano w 0,1x SSC przez 5 minut i 2xSSC przez 3 minuty w 42°C oraz 3 minuty w 2x SSC w temperaturze pokojowej. Kolejno próby płukano w 4x SSC z dodatkiem 0,2% Tween20 przez 5 minut i nałożono przeciwciało AntiDig (Roche) z Blocking Reagent (Sigma) w celu immunodetekcji i inkubowano

1 godzinę w wilgotnej komorze w 37°C. Po tym czasie preparaty płukano w 4x SSC z 0,2% Tween20 przez 8 minut w temperaturze 37°C, następnie płukano w 2x SSC przez minutę. Preparaty poddano dehydratacji w szeregu alkoholowym (70%, 90%, 100%) przez 1 minutę. Wyszuszone preparaty zostały zamknięte przy użyciu DAPI + Vectashield (1,5µg/ml) (Vector Laboratories) i przechowywano w ciemności w temperaturze 4°C.

#### 6.3.4 Analiza mikroskopowa i opracowanie wyników

Preparaty analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego FV3000 (Olympus, Japan) oraz mikroskopu fluorescencyjnego BX53 (Olympus, Japan). Uzyskane obrazy opracowano w Adobe Photoshop C6 (Adobe, San Jose, CA, USA) oraz FV31S-SW (Olympus).

#### 6.4 Wyprowadzenie mieszańców - krzyżowanie

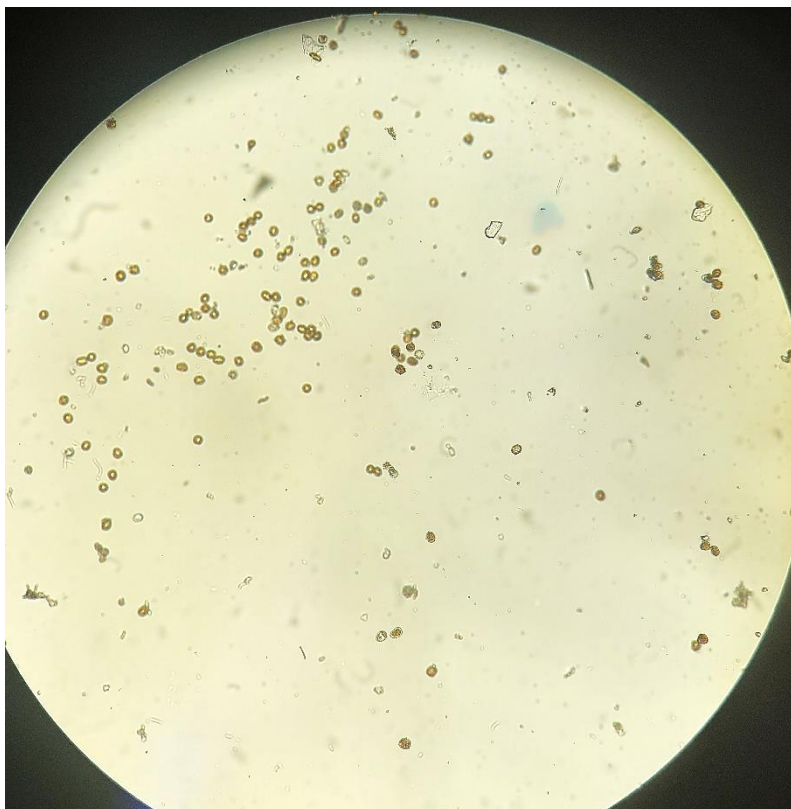
Rośliny mieszańcowe pokolenia F<sub>1</sub> uzyskano w wyniku krzyżowania pszenicy jarej (rodzic żeński) z genotypem uzyskanym z banku genów (zapyłacz) w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (maj/czerwiec 2021). W plastikowych donicach wysiano 30 ziaren z każdego genotypu w 4 powtórzeniach, co dwa tygodnie w celu synchronizacji terminu dojrzałości znamion słupek form akceptorowych i terminu pylenia zapyłacza. Po osiągnięciu odpowiedniego stadium, gdzie kłosy są jeszcze w pochwach liściowych, a liść flagowy osadzony jest 3-5 cm ponad pochwą, kwiaty form matecznych kastrowano metodą Tschermaka (1921), w celu uniknięcia samozapylenia. Pylniki roślin mają barwę zieloną lub delikatnie żółtą. Po upływie 3-5 dni zbierano świeży pyłek donora i zapylano wykastrowane kwiaty. Do krzyżowań wybrano dobrze rozwinięte znamiona słupek w momencie rozwierania się plewek, wywołanego przez napęcznienie łuszczyk miodnikowych. Zapyłony kłos izolowano przy pomocy torebek papierowych i opisywano. Na podstawie ilości wykastrowanych kwiatów oraz ich zapylenia, a także liczbę otrzymanych ziarniaków, przeprowadzono ocenę efektywności krzyżowania. Uzyskane formy mieszańcowe F<sub>1</sub> w latach 2022 oraz 2023 poddano samozapyleniu otrzymując formy F<sub>2</sub> oraz F<sub>3</sub>.

#### 6.5 Inokulacja roślin w stadium siewek mieszaniną zarodników *P. triticina*

Inokulacja została przeprowadzona w komorze fitoronowej w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii w Poznaniu. Zarodniki grzyba *Puccinia triticina* zostały zebrane z zainfekowanego doświadczenia polowego zlokalizowanego na terenie Stacji Doświadczalnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Dłoń, Polska. (51°41'22"N 17°04'23"E). Pokolenie F<sub>3</sub>,

linie donorowe, akceptorowe oraz linie bliskoizogeniczne z genami odporności hodowano do stadium 2-go liścia (BBCH12) w kontrolowanych warunkach. Na początku doświadczenia temperatura komory wynosiła 22°C, wilgotność względna na poziomie 70-95%, z 16-godzinnym fotoperiodem, natężenie światła: 250–300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . W przeddzień infekcji temperatura została ustawiona na 16°C. Mieszaninę inokulacyjną przygotowano obliczając ilość spor niezbędną do przygotowania zawiesiny  $5 \times 10^5$  spor/ml. Obliczenia ilości spor oraz obserwacje żywych zarodników zostały wykonane wykorzystując hemocytometr (Rycina 3).

Rycina 3. Zarodniki *Puccinia triticinia* wykorzystane do przygotowania mieszaniny inokulacyjnej



Do inokulumu dodano 1  $\mu\text{g/ml}$  Tween20. Rośliny spryskano za pomocą opryskiwacza ręcznego z odległości 10 cm. Inkubacja została przeprowadzona w warunkach wysokiej wilgotności przez 24 godziny. Następnie utrzymywano 16-godzinny fotoperiod z temperaturą 25°C. Próby fragmentów liści były pobierane w 6 punktach czasowych 0 (przed inokulacją), 6, 12, 24, 48, 72 godziny po inokulacji, w trzech powtórzeniach biologicznych. Pobrane fragmenty liści zostały natychmiast zamrażane w ciekłym azocie i przechowywane w -80°C. Po 14 dniach od inokulacji, przeprowadzono obserwacje porażonych roślin w sześciu powtórzeniach, według skali: 9 – stan najlepszy (najkorzystniejszy), 5 – stan średni (przeciętny), 1 – stan najgorszy (najmniej korzystny).

## 7. Wyniki

### 7.1 Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności (P1, P2)

W ramach pracy przeanalizowano zmienność alleliczną w *loci Lr63*, równoległe z analizą cytogenetyczną (Publikacja 1) (Tabela 6). Do identyfikacji genu wybrano markery *Xbarc321* oraz *Xbarc57*, wyniki wykazały, że oba markery mogą być wykorzystywane do identyfikacji genu *Lr63*, a ich obecności związane są z kierunkiem udamawiania pszenicy oraz polimorfizmem wewnątrz- i międzygatunkowym.

Tabela 6. Analiza molekularna markerów sprzężonych z *loci* genu *Lr63* u pszenic diploidalnych

Genotyp	Numer identyfikacyjny	Gatunek	<i>Xbarc321</i>	<i>Xbarc57</i>
-	Cltr 17667	<i>Triticum urartu</i>	-	+
G3220	PI428316	<i>Triticum urartu</i>	-	+
Kaploutras	PI225164	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	+	-
G3224	PI428011	<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>	+	+
84TK154-028.00	PI554513	<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>	+	-
Kromeriz	PI668147	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	+	+
A TRI 613/59	PI277130	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	+	+
UKR-99-075	PI614649	<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>	+	-
V.J. 388	PI290508	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	+	+
GR05-052	PI662221	<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>	+	-
K930	PI307984	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	-	+
-	Cltr 17664	<i>Triticum urartu</i>	-	-
2498	PI170196	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	+	+
WIR 18140	PI326317	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	+	+
SN-264	PI591871	<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	+	+
SY 20033	PI487265	<i>Triticum urartu</i>	-	+

W ramach badań powyższej pracy doktorskiej zaprojektowano oraz zoptymalizowano 6 kombinacji reakcji multiplex PCR, do jednoczesnej analizy markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności (Publikacja 2). Do analizy genów *Lr19*, *Lr24*, *Lr26* oraz *Lr38* zastosowano markery odpowiednio: *Xwmc221*, *Sr24#12*, *P6M12*, *Xwmc773*. Zaprojektowanie reakcji składało się

z 3 etapów: wybór skutecznych dostępnych markerów dla genów, których amplikony różnią się długością, umożliwiając identyfikację na żelu agarozowym; dostosowanie temperatury przyłączania starterów przy użyciu gradientu temperaturowego w celu uniknięcia niespecyficznych produktów; dostosowanie stężenia starterów, do uzyskania czytelnych wyników. Wybrane markery oraz odpowiednie objętości starterów umożliwiły jednoczesną identyfikację czterech genów głównych w ramach jednej reakcji PCR oraz kombinacje składające się z dwóch lub trzech genów. (Tabela 7).

Tabela 7. Objętości starterów oraz kombinacje reakcji multipleks PCR

Lp.	Kombinacja	Objętość starterów [ $\mu$ l]
1.	<i>Lr19 + Lr26</i>	0,8 + 0,8
2.	<i>Lr24 + Lr26</i>	0,8 + 0,8
3.	<i>Lr19 + Lr24 + Lr26</i>	0,8 + 0,8 + 0,8
4.	<i>Lr19 + Lr26 + Lr38</i>	0,8 + 0,8 + 0,8
5.	<i>Lr24 + Lr26 + Lr38</i>	0,56 + 1,04 + 0,8
6.	<i>Lr19 + Lr24 + Lr26 + Lr38</i>	0,8 + 0,48 + 1,12 + 0,8

## 7.2 Analiza molekularna oraz cytogenetyczna form donorowych i akceptorowych

W celu piramidyzacji genów głównym przeanalizowano 25 form donorowych oraz 2 formy akceptorowe do identyfikacji genów związanych z odpornością na rdzę brunatną (Tabela 8). Z 25 genotypów wybrano 5, które były wykorzystane do dalszych analiz: PI 578204 (*Lr19, Lr38, Lr63*); PI 572812 (*Lr26, Lr38, Lr63*); PI 614023 (*Lr19, Lr26, Lr38, Lr63*); PI 675464 (*Lr24, Lr26, Lr38, Lr63*); PI 675466 (*Lr24, Lr38, Lr63*). W wybranych formach akceptorowych zidentyfikowano geny: *Lr38* oraz *Lr63*, dodatkowo w odmianie KWS Carusum potwierdzono obecność genu *Lr24*.

Tabela 8. Analiza molekularna form donorowych i akceptorowych

Genotyp	Gen (sprzężony marker molekularny)						
	<i>Lr19</i> ( <i>Xwmc221</i> )	<i>Lr24</i> ( <i>Sr24#12</i> )	<i>Lr26</i> ( <i>P6M12</i> )	<i>Lr38</i> ( <i>Xwmc773</i> )	<i>Lr38</i> ( <i>Xbarc273</i> )	<i>Lr63</i> ( <i>Xbarc57</i> ) ( <i>Xbarc321</i> )	
Cltr 14048	+	-	-	+	+	-	-
Cltr 17474	-	-	-	-	+	-	-
PI 519178	+	-	-	+	+	+	+
PI 519194	+	-	-	+	+	+	+
PI 520269	+	-	-	-	+	+	+
PI 614022	-	-	-	-	+	+	+
<b>PI 614023</b>	+	-	+	+	+	-	+
<b>PI 675464</b>	-	+	+	+	+	-	+
<b>PI 675466</b>	-	+	-	+	+	+	+
GSTR 517	-	+	-	-	+	+	-
PI 578203	+	-	-	-	+	+	-
<b>PI 578204</b>	+	-	-	+	+	+	+
PI 578205	-	-	-	-	+	-	+

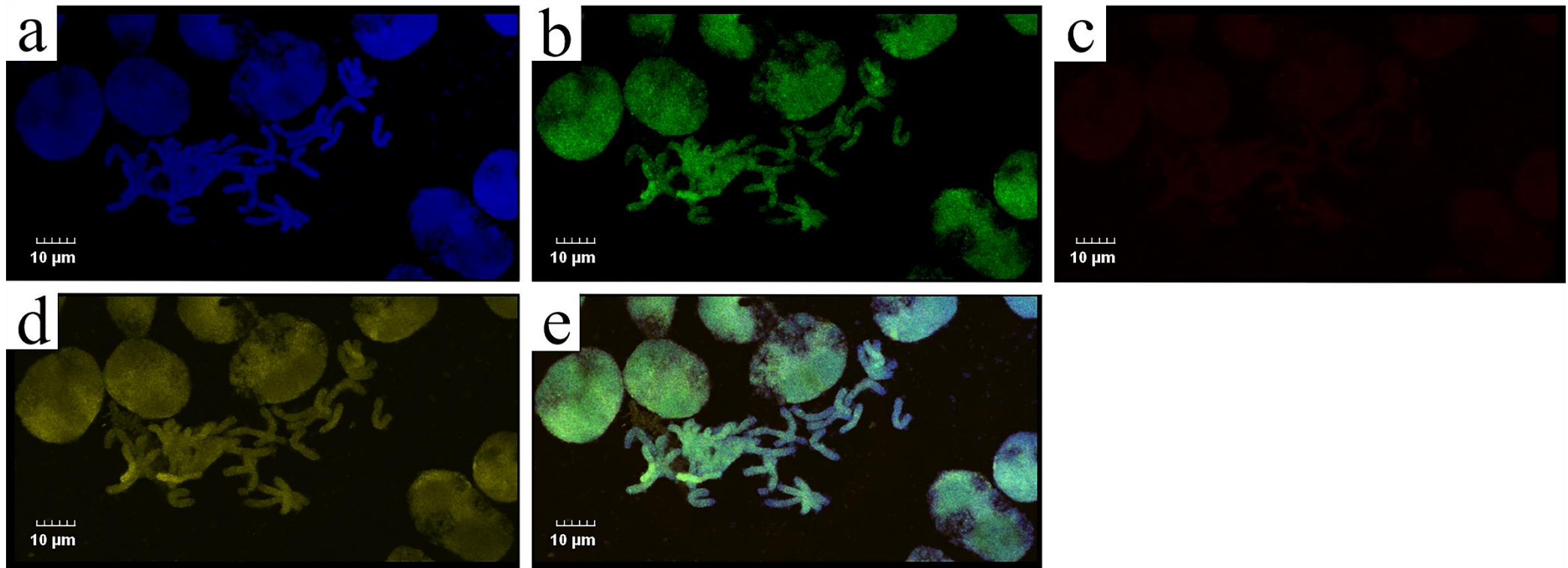
PI 578206	+	-	-	-	+	+	+
PI 578207	-	-	-	-	+	+	+
PI 578208	-	-	-	-	+	+	+
PI 578209	-	-	-	-	+	+	+
PI 578210	-	-	-	-	+	+	+
PI 578211	-	-	-	-	+	+	+
<b>PI 578212</b>	-	-	+	+	+	+	+
PI 587164	-	-	-	-	+	+	+
PI 587165	-	-	+	-	+	+	+
PI 587166	-	-	+	-	+	+	+
PI 587167	-	-	+	-	+	+	+
PI 587168	-	-	+	-	+	+	+
<b>Mantra</b>	-	-	-	+	+	+	+
<b>KWS Carusum</b>	-	+	-	+	+	+	-

Wybrane formy donorowe analizowano cytogenetycznie metodą GISH, w celu określenia obecności translokacji segmentów pochodzących z obcych gatunków. Wyznakowane genomowe DNA, umożliwiło identyfikację fragmentów pochodzących z *Thinopyrum elongatum* (żółty), *Thinopyrum intermedium* (zielony) oraz *Secale cereale* (czerwony).

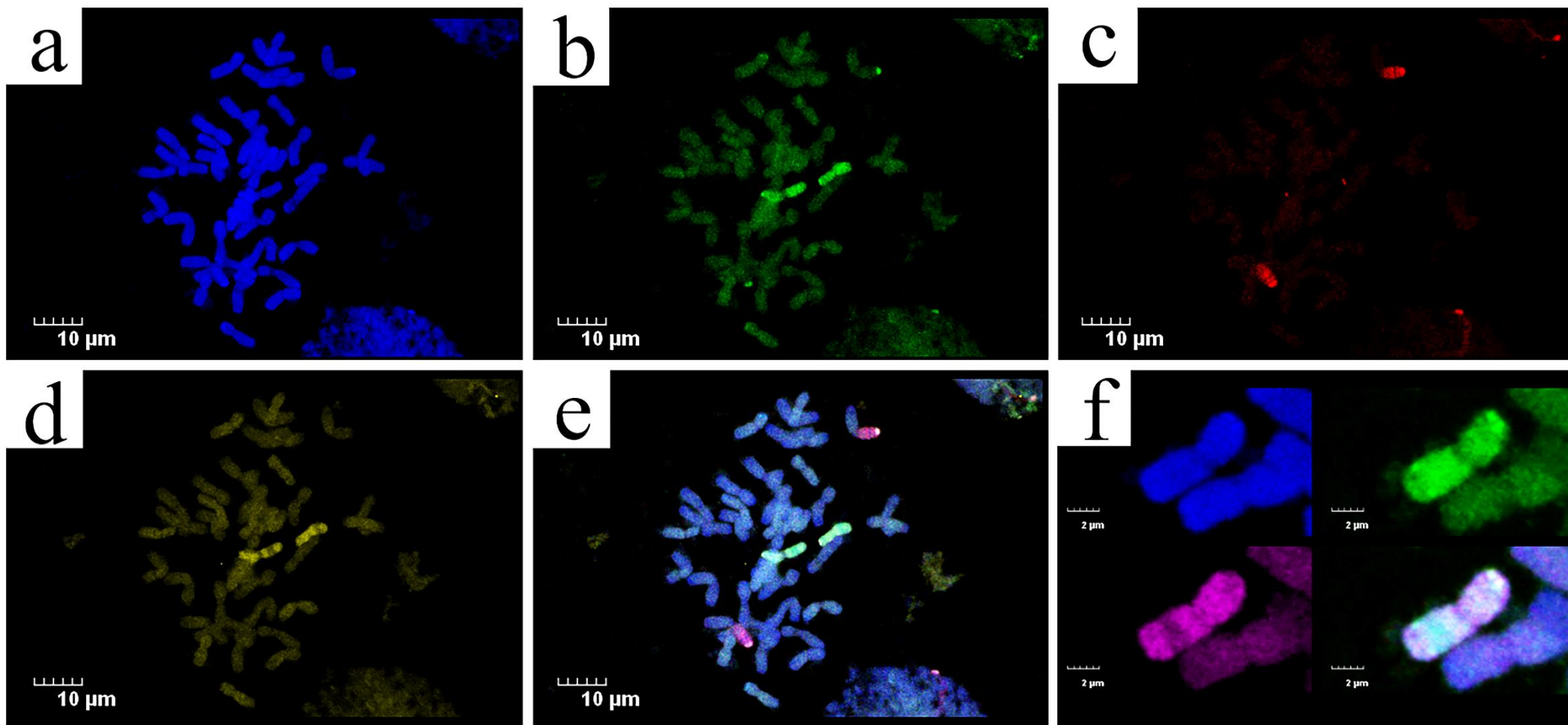
W genotypie PI 578204 zidentyfikowano 42 chromosomy pszenicy, analiza GISH potwierdziła obecność translokacji długiego ramienia 7DS.7DL-7Ae#1L z gatunku *Thinopyrum* (Rycina 4.).

Genotyp PI 578212 jest linią disomiczną (42+2), uzyskaną w wyniku krzyżowań wstecznych z *Thinopyrum intermedium*, posiada dodatkową parę chromosomów homologicznych (Rycina 5). Wyznakowane genomowe DNA *Th. elongatum* (żółty) oraz *Th. intermedium* (zielony) potwierdziły obecność dodatkowej pary chromosomów. (Rycina 5b, 5d). W dystalnej części długiego ramienia chromosomu widoczna jest translokacja segmentu pochodząca z *Th. intermedium* (zielony), natomiast reszta chromosomu składa się z chromatyny pochodzącej z *Th. elongatum* (różowy) (Rycina 5f). Jednoczesna analiza potwierdziła w badanym genotypie obecność translokacji krótkiego ramienia pochodzącego z żyta (czerwony) 1RS.1BL (Rycina 5c).

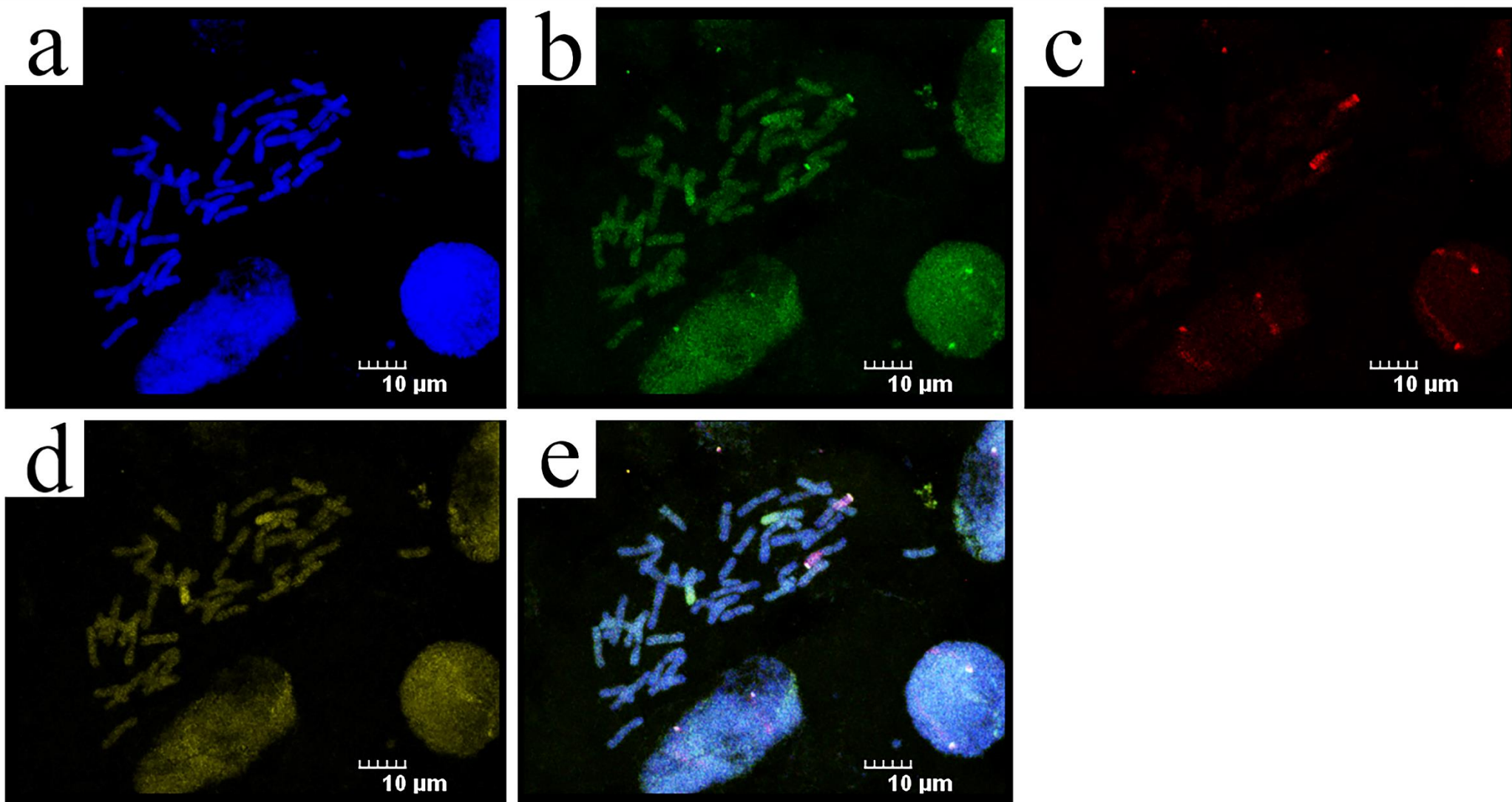
Rycina 4. Płytki metafazowa genotypu PI578204 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone



Rycina 5. Płytki metafazowa genotypu PI578212 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone f) dodatkowy chromosom



Rycina 6. Płytki metafazowa genotypu PI614023 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone

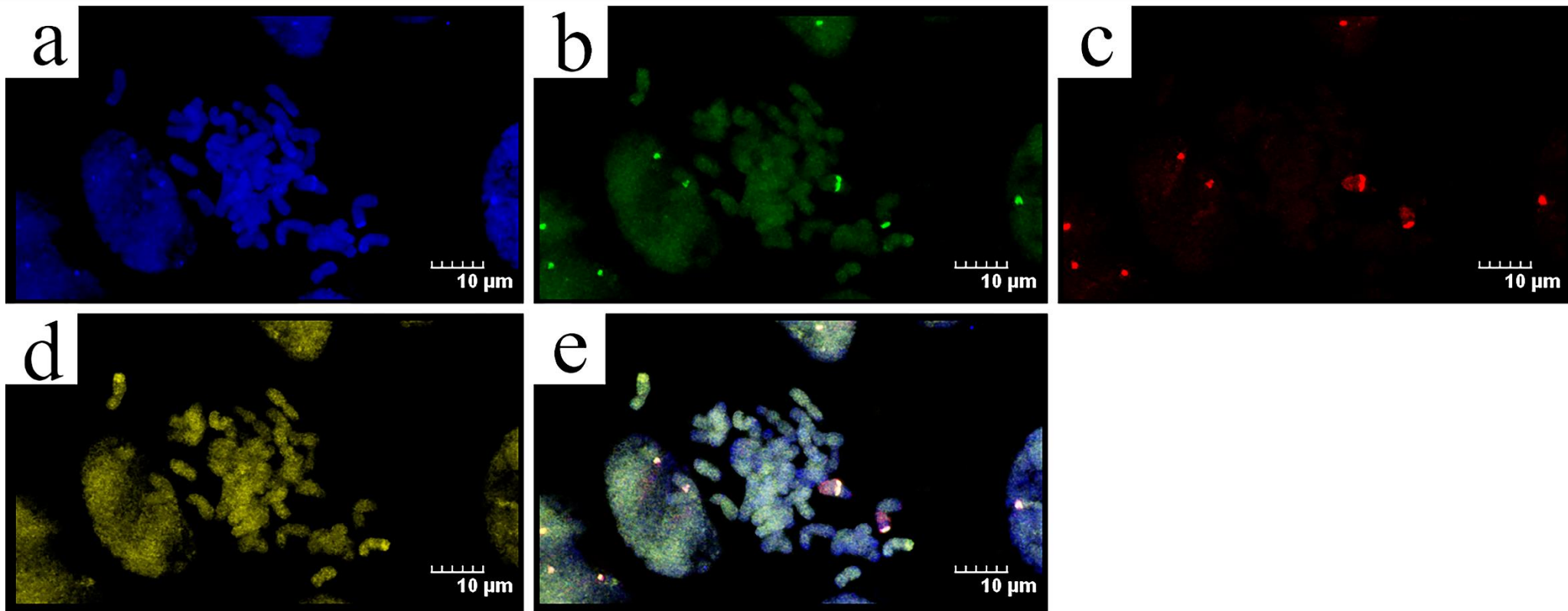


Podczas analizy akcesji PI 614023 obserwowano sygnały wyznakowanych DNA *Th. elongatum* oraz *Th. intermedium* w długim ramieniu chromosomu 7DS.7DL-7Ae#1L oprócz regionu centromerowego (Rycina 6b, 6d). Dodatkowo wyznakowane rodaminą (czerwony) DNA żytnie umożliwiło identyfikację translokacji krótkiego ramienia chromosomu 1RS.1BL (Rycina 6c).

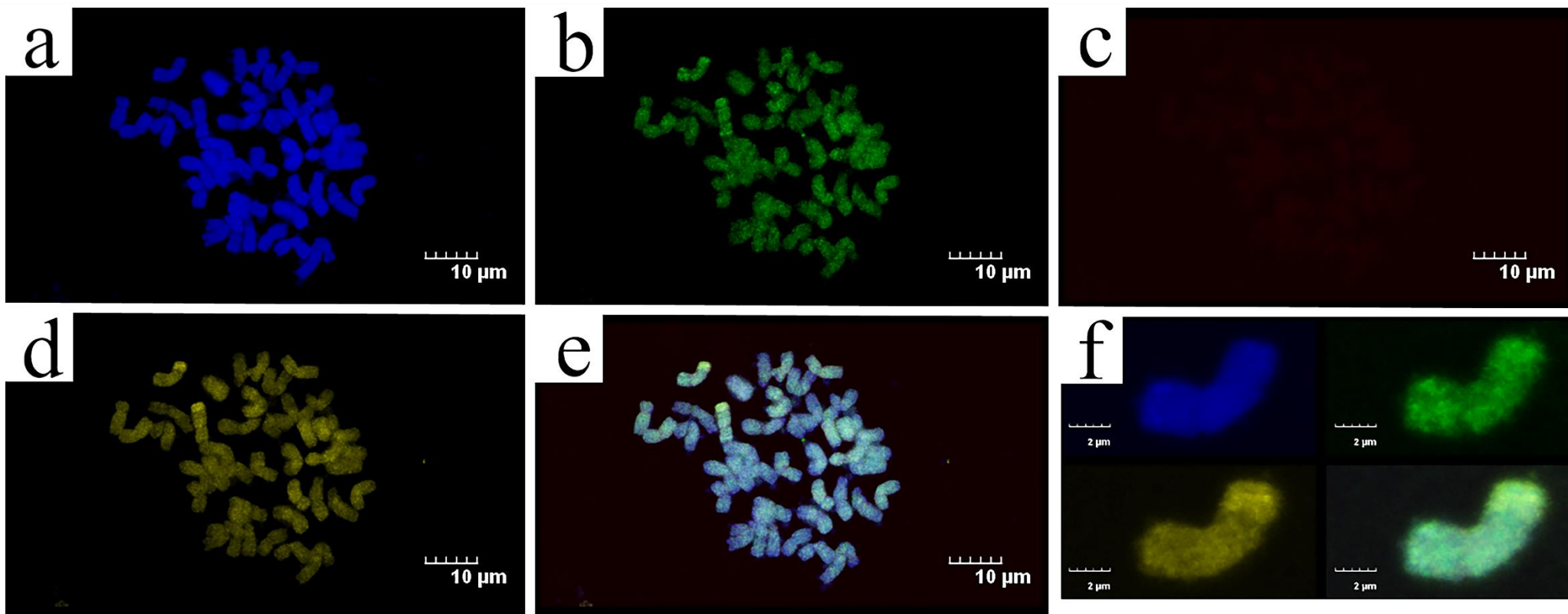
Genotyp PI 675464 charakteryzował się translokacją pochodzącą z gatunku *Th. elongatum* w telomerowej części długich ramion chromosomów (Rycina 7d, 7f). Dodatkowo w akcesji PI 675464 obserwowano sygnały pochodzące z żyta, świadczące o translokacji 1RS.1BL (Rycina 7c).

Analiza genotypu PI 675466 wykazała obecność translokacji pochodzącej z *Th. elongatum* w dystalnej części długiego ramienia chromosomu (Rycina 8b, 8d, 8f)

Rycina 7. Płytki metafazowa genotypu PI675464 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone



Rycina 8. Płytki metafazowa genotypu PI675466 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone f) chromosom z translokacją



### 7.3 Krzyżowania

Do prowadzenia analiz w ramach pracy doktorskiej, przeprowadzono krzyżowania. W celu uzyskania pokolenia F<sub>1</sub> łącznie zapylono 2334 kwiatów odmian Mantra oraz KWS Carusum pyłkiem form donorowych, otrzymując łącznie 171 ziaren. Ocena efektywności krzyżowania (CE) wyniosła 6,8 %. Z krzyżowania KWS Carusum × PI 578204 uzyskano 22 nasiona, KWS Carusum × PI 578212 uzyskano 4 ziarniaki, w krzyżowaniu odmiany Mantra × PI 578204 otrzymano 3 nasiona, natomiast Mantra × PI 578212 jedno ziarno. Najbardziej efektywne były kombinacje KWS Carusum × PI 614023, KWS Carusum × PI 675464 oraz Mantra × PI 614023, Mantra PI 675464 otrzymując odpowiednio: 34, 23 oraz 31, 30 ziarniaki. Z krzyżowania KWS Carusum × PI 675466 uzyskano 17 nasion, a z Mantra × PI 675466 - 6 nasion.

### 7.4 Analiza molekularna pokoleń: F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> i F<sub>3</sub>

Pokolenia roślin F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> i F<sub>3</sub> uzyskano za pomocą samozapyleń otrzymanych form mieszańcowych.

#### 7.4.1 Pokolenie F<sub>1</sub> z formą akceptorową KWS Carusum

Uzyskane pokolenia analizowano reakcją PCR z wykorzystaniem markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności. W ramach pokolenia F<sub>1</sub> krzyżowania odmiany KWS Carusum z formami donorowymi otrzymano 100 ziarniaków, analizy molekularne potwierdziły introgresje genów w 58% uzyskanych roślin (Tabela 9).

Tabela 9. Analiza molekularna pokolenia F<sub>1</sub> uzyskanych z formą akceptorową KWS Carusum

Genotyp	Gen (sprzężony marker molekularny)						
	<i>Lr19</i> ( <i>Xwmc221</i> )	<i>Lr24</i> ( <i>Sr24#12</i> )	<i>Lr26</i> ( <i>P6M12</i> )	<i>Lr38</i> ( <i>Xwmc773</i> ) ( <i>Xbarc273</i> )		<i>Lr63</i> ( <i>Xbarc57</i> ) ( <i>Xbarc321</i> )	
<b>KWS Carusum × PI 578204</b>							
44a	-	+	Nd.	-	+	-	-
44b	-	+	Nd.	-	+	-	-
<b>44c</b>	H	+	Nd.	-	+	+	+
44d	-	+	Nd.	-	+	-	-
<b>101a</b>	H	+	Nd.	-	+	+	+
<b>101b</b>	H	+	Nd.	-	+	+	+
<b>102a</b>	H	+	Nd.	-	+	+	+
<b>104a</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130a</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130b</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130c</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130d</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130e</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+

<b>130f</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130g</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>146a</b>	H	+	Nd.	-	+	+	+
<b>KWS Carusum × PI 578212</b>							
<b>66a</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>66b</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>66c</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>KWS Carusum × PI 614023</b>							
107a	-	+	-	+	+	+	-
107b	-	+	-	+	+	+	-
107c	-	+	-	+	+	+	-
107d	-	+	-	+	+	+	-
107e	-	+	-	+	+	+	-
107f	-	+	-	+	+	+	-
107g	-	+	-	+	+	+	-
107h	-	+	-	+	+	+	-
107i	-	+	-	+	+	+	-
107j	-	+	-	+	+	+	-
108a	-	+	-	+	+	+	-
108b	-	+	-	+	+	+	-
108c	-	+	-	+	+	+	-
<b>109a</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>109b</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>109c</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>109d</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>109e</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>109f</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>109g</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>109h</b>	-	+	+	+	+	+	+
127a	-	+	-	+	+	+	-
127b	-	+	-	+	+	+	-
127c	-	+	-	+	+	+	-
127d	-	+	-	+	+	+	-
127e	-	+	-	+	+	+	-
127f	-	+	-	+	+	+	-
127g	-	+	-	+	+	+	-
127h	-	+	-	+	+	+	-
127i	-	+	-	+	+	+	-
127j	-	+	-	+	+	+	-
<b>128a</b>	-	+	+	+	+	+	-
<b>KWS Carusum × PI 675464</b>							
<b>49a</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>49b</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>49c</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>49d</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>49e</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>49f</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>49g</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>49h</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>50a</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>50b</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>50c</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>50d</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>50e</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>50f</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+

<b>50g</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>50h</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>50i</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>106a</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>106b</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>125a</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>KWS Carusum × PI 675466</b>							
<b>57a</b>	Nd.	-	Nd.	+	+	+	H
<b>117a</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	-
<b>132a</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132b</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132c</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132d</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132e</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132f</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132g</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132h</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132i</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132j</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132k</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H
<b>132l</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	+	H

W formach mieszańcowych KWS Carusum × PI 578204 uzyskano 14% roślin heterozygotycznych pod względem genu *Lr19*. Translokacja z genem *Lr19* nie została wprowadzona do genomu pszenicy jarej KWS Carusum z akcesji PI 614023, jednakże w roślinach uzyskanych z wykorzystaniem tego doszło do introgresji genu odporności *Lr26* zlokalizowanego na krótkim ramieniu żyta 1RS w 28%, natomiast z wykorzystaniem formy donorowej genotypu PI 578212 w 100%. Ponadto translokację z genem *Lr26* zidentyfikowano we wszystkich mieszańcach z donorem PI 675464. W roślinach uzyskanych w wyniku krzyżowania KWS Carusum z PI 675466 zidentyfikowano heterozygoty analizując jeden z markerów molekularnych *Xbarc321* sprzężonego z genem *Lr63*. W pozostałych mieszańcach powyżej opisanych, analiza markera *Xbarc321* wykazała formy homozygotyczne. Drugi marker *Xbarc57* sprzężony z genem *Lr63* zidentyfikowano we wszystkich badanych roślinach. Analizy genu *Lr38* markerem *Xbarc273*, którego produkt amplifikacji wynosi 230 pz potwierdziły jego obecność w badanych mieszańcach. Obecność drugiego markera *Xwmc773*, była niemożliwa do stwierdzenia w 7 roślinach KWS Carusum × PI 578204. (Tabela 9).

#### 7.4.2 Pokolenie F<sub>1</sub> z formą akceptorową Mantra

Z mieszańców pszenicy jarej Mantra uzyskano 71 ziarniaków, analiza PCR potwierdziła introgresję genów w 70% roślin (Tabela 10). Z krzyżowań formy akceptorowej Mantra z genotypami pochodzącymi z banku genów uzyskano 71 ziarniaków, z czego w 70% roślin doszło do introgresji badanych genów głównych. (Tabela 10).

Tabela 10. Analiza molekularna pokolenia F<sub>1</sub> uzyskanych z formą akceptorową Mantra

Genotyp	Gen (sprzężony marker molekularny)						
	<i>Lr19</i> ( <i>Xwmc221</i> )	<i>Lr24</i> ( <i>Sr24#12</i> )	<i>Lr26</i> ( <i>P6M12</i> )	<i>Lr38</i> ( <i>Xwmc773</i> ) ( <i>Xbarc273</i> )		<i>Lr63</i> ( <i>Xbarc57</i> ) ( <i>Xbarc321</i> )	
<b>Mantra × PI 578204</b>							
<b>58a</b>	H	Nd.	Nd.	+	+	+	+
<b>58b</b>	H	Nd.	Nd.	+	+	+	+
<b>77a</b>	H	Nd.	Nd.	+	+	+	+
<b>Mantra × PI 578212</b>							
<b>114a</b>	Nd.	Nd.	+	+	+	+	+
<b>Mantra × PI 614023</b>							
64a	-	Nd.	-	+	+	+	+
64b	-	Nd.	-	+	+	+	+
64c	-	Nd.	-	+	+	+	+
64e	-	Nd.	-	+	+	+	+
64f	-	Nd.	-	+	+	+	+
64g	-	Nd.	-	+	+	+	+
64h	-	Nd.	-	+	+	+	+
<b>72a</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>72b</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>72c</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>73a</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>73b</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>73c</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
86a	-	Nd.	-	+	+	+	+
<b>87a</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
98a	-	Nd.	-	+	+	+	+
98b	-	Nd.	-	+	+	+	+
98c	-	Nd.	-	+	+	+	+
98d	-	Nd.	-	+	+	+	+
98e	-	Nd.	-	+	+	+	+
100a	-	Nd.	-	+	+	+	+
100b	-	Nd.	-	+	+	+	+
100c	-	Nd.	-	+	+	+	+
122a	-	Nd.	-	+	+	+	+
123a	-	Nd.	-	+	+	+	+
<b>134a</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>134b</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>134c</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>134d</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>134e</b>	+	Nd.	+	+	+	+	+
<b>Mantra × PI 675464</b>							
<b>69a</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69b</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69c</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69d</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69e</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69f</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69g</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69h</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69i</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69j</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69k</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69l</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>69m</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+

70a	Nd.	+	+	+	+	+	+
70b	Nd.	+	+	+	+	+	+
70c	Nd.	+	+	+	+	+	+
70d	Nd.	+	+	+	+	+	+
70e	Nd.	+	+	+	+	+	+
70f	Nd.	+	+	+	+	+	+
70g	Nd.	+	+	+	+	+	+
89a	Nd.	+	+	+	+	+	+
89b	Nd.	+	+	+	+	+	+
89c	Nd.	+	+	+	+	+	+
89d	Nd.	+	+	+	+	+	+
89e	Nd.	+	+	+	+	+	+
89f	Nd.	+	+	+	+	+	+
89g	Nd.	+	+	+	+	+	+
89h	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>Mantra × PI 675466</b>							
91a	Nd.	+	Nd.	+	+	+	+
94a	Nd.	+	Nd.	+	+	+	+
94b	Nd.	+	Nd.	+	+	+	+
94c	Nd.	+	Nd.	+	+	+	+
94d	Nd.	+	Nd.	+	+	+	+
113a	Nd.	+	Nd.	+	+	+	+

W otrzymanych mieszańcach Mantra × PI 578204 wykorzystując marker *Xwmc221* zidentyfikowano dwa produkty amplifikacji: 200 pz i 220 pz co świadczy o heterozygotyczności roślin. W dalszych analizach form mieszańcowych z donorem PI 614023 w 12 roślinach obserwowano tylko jeden produkt o długości 220 pz, potwierdzając obecność genu *Lr19*. Introgresję genu *Lr24* stwierdzono w 100% mieszańców form Mantra × PI 675464 i Mantra × PI 675466, do analizy wykorzystano sprzężony z genem marker molekularny *Sr24#12*, który amplifikował produkt o długości 500 pz. Translokacje ramienia żytniego chromosomu 1RS niosącego gen odporności *Lr26* zidentyfikowano we wszystkich formach mieszańcowych Mantra × PI 578212 i Mantra × PI 675464. Dodatkowo translokacja ta obecna była w 12 roślinach, gdzie formą donorową była akcesja PI 614023. Geny *Lr38* oraz *Lr63* analizowane markerami odpowiednio: *Xwmc773*, *Xbarc273* oraz *Xbarc57*, *Xbarc321* zostały wskazane we wszystkich badanych roślinach, w których formą akceptorową była odmiana pszenicy jarej Mantra (Tabela 10).

#### 7.4.3 Pokolenie F<sub>2</sub> z formą akceptorową KWS Carusum

Uzyskanie pokolenie F<sub>2</sub> pochodzące z samozapleń mieszańców F<sub>1</sub> poddano dalszym analizom molekularnym (Tabela 11) (Tabela 12).

Tabela 11. Analiza molekularna pokolenia F<sub>2</sub> uzyskanych z formą akceptorową KWS Carusum

Genotyp	Gen (sprzężony marker molekularny)						
	<i>Lr19</i> ( <i>Xwmc221</i> )	<i>Lr24</i> ( <i>Sr24#12</i> )	<i>Lr26</i> ( <i>P6M12</i> )	<i>Lr38</i> ( <i>Xwmc773</i> ) ( <i>Xbarc273</i> )		<i>Lr63</i> ( <i>Xbarc57</i> ) ( <i>Xbarc321</i> )	
<b>KWS Carusum × PI 578204</b>							
<b>130a1</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
130a2	-	+	Nd.	-	+	+	+
130a3	-	+	Nd.	-	+	+	+
130a4	-	+	Nd.	-	+	+	+
<b>130b2</b>	H	+	Nd.	-	+	+	+
<b>130b3</b>	+	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130b4</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130b5</b>	H	+	Nd.	-	+	+	+
130b6	-	+	Nd.	-	+	+	+
<b>130b7</b>	+	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130b8</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130b9</b>	+	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130b10</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130b11</b>	+	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130b12</b>	+	+	Nd.	+	+	+	+
130c1	-	+	Nd.	-	+	+	+
130c2	-	+	Nd.	-	+	+	+
130c3	-	+	Nd.	-	+	+	+
<b>130c4</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>130c5</b>	H	+	Nd.	+	+	+	+
<b>KWS Carusum × PI 614023</b>							
109a1	-	+	-	-	+	+	+
109a2	-	+	-	-	+	+	+
109a4	-	+	-	-	+	+	+
109a5	-	+	-	-	+	+	+
109a7	-	+	-	-	+	+	+
109a8	-	+	-	-	+	+	+
109a9	-	+	-	-	+	+	+
109a10	-	+	-	-	+	+	+
<b>109a11</b>	-	+	+	-	+	+	+
<b>109a12</b>	-	+	+	-	+	+	+
109a13	-	+	-	-	+	+	+
<b>109a14</b>	-	+	+	-	+	+	+
109a15	-	+	-	-	+	+	+
109d1	-	+	-	-	+	+	+
<b>109d2</b>	-	+	+	-	+	+	+
<b>109e1</b>	-	+	+	-	+	+	+
<b>109f1</b>	-	+	+	-	+	+	+
<b>109f2</b>	-	+	+	-	+	+	+
<b>109f3</b>	-	+	+	-	+	+	+
109f4	-	+	-	-	+	+	+
109h1	-	+	-	-	+	+	+
<b>109h2</b>	-	+	+	-	+	+	+
109h3	-	+	-	-	+	+	+
<b>KWS Carusum × PI 675464</b>							
<b>49b1</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
49b2	Nd.	+	-	+	+	+	+
<b>49b3</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
49c1	Nd.	+	-	+	+	+	+

<b>49c2</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
49c3	Nd.	+	-	+	+	+	+
<b>50f1</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>50f2</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>106b1</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>106b2</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>106b3</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
106b4	Nd.	+	-	+	+	+	+

W mieszańcach KWS Carusum × PI 578204 uzyskano 13 roślin, w których zidentyfikowano gen *Lr19*, z czego w 8 przypadkach w formie heterozygotycznej, a 5 roślin wykazało formę homozygotyczną. Analiza markerem *Sr24#12* potwierdziła u wszystkich badanych mieszańców gen *Lr24*. W formach mieszańcowych 130b2 oraz 130b5 nie zidentyfikowano markeru *Xwmc773* sprzężonego z genem *Lr38*. Analizy pozostałych markerów potwierdziły ich obecność we wszystkich analizowanych próbach. (Tabela 11).

Z form mieszańcowych F<sub>1</sub> KWS Carusum × PI 578212 (66a, 66b, 66c) oraz KWS Carusum × PI 675466 (91a, 94a, 94b, 94c, 94d, 113a) nie udało się uzyskać dalszych pokoleń.

W drugim pokoleniu KWS Carusum × PI 614023 gen *Lr19* został całkowicie wyeliminowany. Analizy markerem *P6M12* umożliwiły zidentyfikowanie genu *Lr26* obecnego na ramieniu żytnim 1R w 9 roślinach, zostały one wykorzystane do dalszych badań. Pomimo obecności jednego z flankujących markerów genu *Lr38* - *Xwmc773* w formie donorowej oraz akceptorowej, a także pokoleniu F<sub>1</sub>, marker ten nie amplifikował produktu o długości 143 pz w formach mieszańcowych F<sub>2</sub>. Markery: *Xbarc273* sprzężony z genem *Lr38* oraz *Xbarc57* i *Xbarc321* sprzężone z genem *Lr63* zostały zidentyfikowane we wszystkich analizowanych próbach. (Tabela 11).

Z uzyskanego F<sub>2</sub> w wyniku samozapylenia roślin mieszańcowych pokolenia F<sub>1</sub> KWS Carusum × PI 675464, nie u wszystkich roślin zidentyfikowano translokację krótkiego ramienia żytniego 1RS.1BL. U 4 roślin (49b2, 49c1, 49c3, 106b4) doszło do eliminacji obcej chromatyny niosącej gen odporności *Lr26*. Analizy pozostałych markerów wskazywały na obecności badanych genów we wszystkich formach mieszańcowych F<sub>2</sub> (Tabela 11).

#### 7.4.4 Pokolenie F<sub>2</sub> z formą akceptorową Mantra

Uzyskanie pokolenie F<sub>2</sub> pochodzące z samozapylenia mieszańców F<sub>1</sub> poddano dalszym analizom molekularnym (Tabela 12).

Podczas analizy drugiego pokolenia Mantra × PI 578204 markerem *Xwmc221* genotyp 58a2 charakteryzował się układem heterozygotycznym, jednocześnie w badanej roślinie nie stwierdzono obecności markera *Xwmc773* sprzężonego z genem *Lr38*. Ponadto marker *Xwmc773* nie amplifikował specyficznych produktów, w genotypach: 69e1, 69e2, 89d1 (Mantra × PI 675464).

Genotypy 69e9 oraz 89d1 pochodzące z formy donorowej PI 645464, a także forma 114a1 pochodząca z krzyżowań Mantra × PI 578212 charakteryzują się obecnością genu *Lr26* (Tabela 12).

Analiza PCR z wykorzystaniem markera molekularnego *Sr24#12* wykazała obecność genu *Lr24* w mieszańcach uzyskanych z Mantra × PI 675464 w 9 genotypach, oraz w całym pokoleniu pochodzącym z Mantra × PI 675466. Flankujący marker *Xbarc273* amplifikował specyficzny produkt dla wszystkich analizowanych roślin. (Tabela 12).

Tabela 12. Analiza molekularna pokolenia F<sub>2</sub> uzyskanych z formą akceptorową Mantra

Genotyp	Gen (sprzężony marker molekularny)						
	<i>Lr19</i> ( <i>Xwmc221</i> )	<i>Lr24</i> ( <i>Sr24#12</i> )	<i>Lr26</i> ( <i>P6M12</i> )	<i>Lr38</i> ( <i>Xwmc773</i> ) ( <i>Xbarc273</i> )		<i>Lr63</i> ( <i>Xbarc57</i> ) ( <i>Xbarc321</i> )	
<b>Mantra × PI 578204</b>							
58a1	-	Nd.	Nd.	-	+	+	+
58a2	H	Nd.	Nd.	-	+	+	+
<b>Mantra × PI 578212</b>							
114a1	Nd.	Nd.	+	+	+	+	+
<b>Mantra × PI 675464</b>							
69e1	Nd.	+	-	-	+	+	+
69e2	Nd.	+	-	-	+	+	+
69e3	Nd.	+	-	+	+	+	+
69e4	Nd.	+	-	+	+	+	+
69e5	Nd.	+	-	+	+	+	+
69e6	Nd.	+	-	+	+	+	+
69e7	Nd.	-	-	-	+	+	+
69e8	Nd.	-	-	-	+	+	+
69e9	Nd.	+	+	+	+	-	+
69h1	Nd.	-	-	-	+	+	+
69j1	Nd.	+	-	+	+	+	+
89d1	Nd.	+	+	-	+	+	+
<b>Mantra × PI 675466</b>							
94a1	Nd.	+	Nd.	+	+	-	-
94a2	Nd.	+	Nd.	+	+	+	+
94b1	Nd.	+	Nd.	+	+	-	-

Identyfikacja markera *Xbarc321* sprzężonego z genem *Lr63* amplifikującego specyficzny produkt o długości 191 pz, możliwa była we wszystkich roślinach form mieszańcowych Mantra × PI 578204, Mantra × PI578212, Mantra × PI647564. W pokoleniu F<sub>2</sub> Mantra × PI675466 u roślin 94a1 oraz 94b1 nie zidentyfikowano markerów *Xbarc321* oraz *Xbarc57* sprzężonych z genem *Lr63*, co może świadczyć o eliminacji tego genu. Dalsze analizy *Xbarc57* wykazały brak oczekiwanych produktów w mieszańcu pochodzenia Mantra × PI 675464 69e9, w pozostałych roślinach uzyskanego pokolenia F<sub>2</sub> amplifikował się oczekiwany produkt 240 pz. (Tabela 12).

Form mieszańcowych F<sub>2</sub> Mantra × PI 614023 nie uzyskano z samozapylen z pokolenia F<sub>1</sub>.

## 7.4.5 Pokolenie F<sub>3</sub> z formami akceptorowymi KWS Carusum i Mantra

W celu dalszych badań wybrane formy mieszańcowe pokolenia F<sub>2</sub>: 130b7, 130c4, 109f3, 106b1, 114a1, 89d1 oraz 94a1 wybrano do samozapylenia. Każda forma została wysiana w 6 powtórzeniach, a następnie przeanalizowana markerami molekularnymi (Tabela 13).

Tabela 13. Analiza molekularna pokolenia F<sub>3</sub>

Genotyp	Gen (sprzężony marker molekularny)						
	<i>Lr19</i> ( <i>Xwmc221</i> )	<i>Lr24</i> ( <i>Sr24#12</i> )	<i>Lr26</i> ( <i>P6M12</i> )	<i>Lr38</i> ( <i>Xwmc773</i> ) ( <i>Xbarc273</i> )	<i>Lr63</i> ( <i>Xbarc57</i> ) ( <i>Xbarc321</i> )		
<b>KWS Carusum × PI 578204</b>							
<b>130b7.1</b>	+	-	Nd.	+	+	+	+
<b>130b7.2</b>	+	-	Nd.	+	+	+	+
130b7.3	+	-	Nd.	+	+	+	-
130b7.4	+	-	Nd.	+	-	+	+
130b7.5	+	-	Nd.	+	+	+	-
<b>130b7.6</b>	+	-	Nd.	+	+	+	+
<b>KWS Carusum × PI 578204</b>							
130c4.1	H	+	Nd.	+	+	+	-
130c4.2	-	-	Nd.	+	+	+	-
130c4.3	-	+	Nd.	+	+	+	-
<b>130c4.4</b>	H	+	Nd.	+	+	+	-
<b>130c4.5</b>	H	+	Nd.	+	+	+	-
<b>130c4.6</b>	H	+	Nd.	+	+	+	-
<b>KWS Carusum × PI 614023</b>							
<b>109f3.1</b>	-	+	+	-	+	+	-
<b>109f3.2</b>	-	+	+	-	+	+	-
<b>109f3.3</b>	-	+	+	-	+	+	-
<b>109f3.4</b>	-	+	+	-	+	+	+
<b>109f3.5</b>	-	+	+	-	+	+	+
<b>109f3.6</b>	-	+	+	-	+	+	+
<b>KWS Carusum × PI 675464</b>							
106b1.1	Nd.	+	+	+	+	+	-
<b>106b1.2</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
<b>106b1.3</b>	Nd.	+	+	+	+	+	+
106b1.4	Nd.	+	+	+	+	+	-
106b1.5	Nd.	+	+	+	+	-	+
106b1.6	Nd.	+	+	+	+	+	-
<b>Mantra × PI 578212</b>							
<b>114a1.1</b>	Nd.	Nd.	+	+	+	-	-
<b>114a1.2</b>	Nd.	Nd.	+	+	+	-	-
114a1.3	Nd.	Nd.	-	+	+	-	-
114a1.4	Nd.	Nd.	+	-	+	-	-
114a1.5	Nd.	Nd.	-	-	+	-	-
<b>114a1.6</b>	Nd.	Nd.	+	+	+	-	-
<b>Mantra × PI 675464</b>							
<b>89d1.1</b>	Nd.	+	+	-	+	-	+
<b>89d1.2</b>	Nd.	+	+	-	+	-	+
<b>89d1.3</b>	Nd.	+	+	-	+	-	+
89d1.4	Nd.	+	+	-	+	-	+
89d1.5	Nd.	+	+	-	+	-	+
89d1.6	Nd.	+	+	-	+	-	+
<b>Mantra × PI 675466</b>							
<b>94a1.1</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	-	-

<b>94a1.2</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	-	-
<b>94a1.3</b>	Nd.	+	Nd.	+	+	-	-
94a1.4	Nd.	+	Nd.	+	+	-	-
94a1.5	Nd.	+	Nd.	-	+	-	-
94a1.6	Nd.	-	Nd.	+	+	-	-

Pokolenie F<sub>3</sub> poddano analizom molekularnym w celu potwierdzenia piramidyzacji genów głównych, do dalszych analiz poziomu ekspresji genów dla 8 form mieszańcowych F<sub>3</sub> (Tabela 13).

U form mieszańcowych uzyskanych z KWS Carusum × PI 578204 zidentyfikowano gen *Lr19*. W pokoleniu genotypu 130b7 stwierdzono obecność formy homozygotycznej, natomiast w pokoleniu 130c4 formę heterozygotyczną u 4 roślin, w 2 próbach doszło do eliminacji segmentu niosącego analizowany gen. Rośliny 130b7.1,2,3 amplifikowały oczekiwane długości produktów dla markerów związanych z genami *Lr38* oraz *Lr63*. W analizowanych roślinach doszło do eliminacji genu *Lr24*. U roślin 130c4.4,5,6 gen *Lr24* jest obecny, reakcja PCR z wykorzystaniem markera *Xbarc321* nie amplifikowała produktów o długości 191 pz.

W uzyskanych mieszańcach F<sub>3</sub> z KWS Carusum × PI 614023 109f3 zidentyfikowano geny *Lr24* i *Lr26*, a także marker *Xbarc273* sprzężony z genem *Lr38* oraz *Xbarc57* sprzężony z genem *Lr63*. U roślin 109f3.1,2,3 doszło do eliminacji fragmentu z markerem *Xbarc321* związanego z genem *Lr63*.

Analizy mieszańców F<sub>3</sub> KWS Carusum × PI 678564 106b1 wykazały, że tylko u 2 roślin 106b1.2,3 zostały utrzymane geny *Lr24*, *Lr26*, *Lr38* oraz *Lr63* w identycznej formie porównując do pokolenia F<sub>2</sub>.

Forma 114a1, która pochodzi od Mantra × PI 578212, charakteryzuje się obecnością genów *Lr26* i *Lr38* u roślin 114a1.1,2,6, W analizowanym pokoleniu doszło do eliminacji genu *Lr63*.

Rośliny F<sub>3</sub> (89d1) pochodzące z krzyżowania Mantra × PI 675464 cechują się obecnością genów *Lr24* i *Lr26*, oraz amplifikują produkty markerów *Xbarc273* (*Lr38*) i *Xbarc321* (*Lr63*).

U mieszańców 94a1.1,2,3 zidentyfikowano geny *Lr24* i *Lr38*. W pokoleniu F<sub>3</sub> doszło do eliminacji genu *Lr63*.

## 7.5 Obserwacje po inokulacji mieszaniną zarodników

Pokolenie F<sub>3</sub> wybrane do dalszych analiz, formy donorowe, akceptorowe oraz linie Thatcher z badanymi genami głównymi w powyższej pracy doktorskiej infekowano mieszaniną zarodników *Puccinia triticina*. Obserwacje przeprowadzono 14 dni po inokulacji patogenem, podane wartości są średnią uzyskaną z trzech powtórzeń (Tabela 14). Obserwacje przeprowadzono w skali 9°, gdzie 9 – stan najlepszy (najkorzystniejszy), 5 – stan średni (przeciętny), 1 – stan najgorszy (najmniej korzystny). Uzyskane formy mieszańcowe charakteryzowały się zróżnicowaną odpornością.

Największą odporność obserwowano w formie 109f31, która pochodzi od KWS Carusum oraz PI614023, Największe porażenie zidentyfikowano na liściach formy 130b7, uzyskaną z krzyżowania KWS Carusum × PI578204.

Wśród form donorowych wykorzystanych w powyższych analizach obserwowano odporność na poziomie 7,5; jedynie genotyp PI578212 charakteryzował wyższą odpornością. U form akceptorowych Mantra oraz KWS Carusum odporność oceniono na 7.

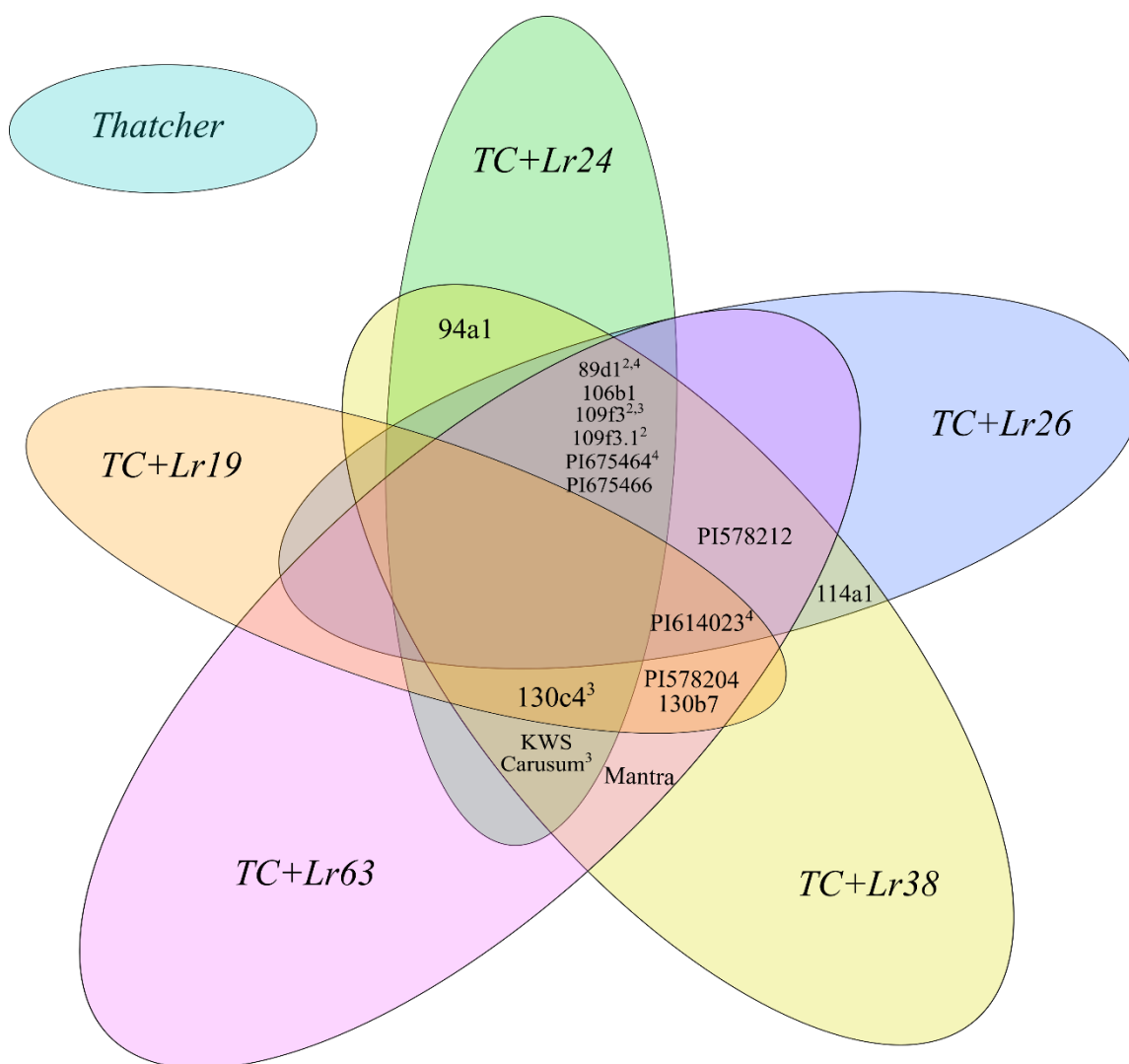
Tabela 14. Obserwacja badanych genotypów 14 dni po inokulacji patogenem *Puccinia triticinia*

<b>Genotyp</b>	<b>Obserwacje</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Obserwacje</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Obserwacje</b>
89d1	6	KWS Carusum	7	Thatcher + <i>Lr19</i>	6
94a1	7,5	Mantra	7	Thatcher + <i>Lr24</i>	7
114a1	6,5	PI 578204	7,5	Thatcher + <i>Lr26</i>	7
130b7	5,5	PI 578212	8,5	Thatcher + <i>Lr38</i>	7
106b1	6,5	PI 614023	7,5	Thatcher + <i>Lr63</i>	8
109f3	8	PI 675464	7,5		
109f31	8,5	PI 675466	7,5		
130c4	8	Thatcher	6,5		

## 7.6 Analiza poziomu ekspresji genów

Ekspresję genów *TaLr19TLP1*, PR2, PR9 i *TaPrx107* na inokulację patogenem *P. triticinia* analizowano u 8 form mieszańcowych, 2 odmian pszenicy jarej, 5 genotypów wykorzystanych jako formy donorowe, 5 genotypów Thatcher (TC) z pojedynczymi genami odporności oraz Thatcher (Rycina 9).

Rycina 9. Diagram Venna przedstawiający obecność markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności u form mieszańcowych, donorowych i akceptorowych; <sup>1,2</sup> – obecność markerów *Xwmc773*, *Xbarc273*; <sup>3,4</sup> – obecność markerów *Xbarc57*, *Xbarc321*



Analizę ekspresji genów przeprowadzono w 6 punktach czasowych (0, 6, 12, 24, 48, 72 hpi). Wyniki przedstawiono za pomocą map cieplnych, gdzie każda mapa przedstawia formę mieszańcową, donorową, akceptorową, linię Thatcher z pojedynczymi genami odporności, które są w danej formie mieszańcowej oraz genotyp Thatcher bez genów głównych. Dodatkowo znormalizowane ekspresje genów zestawiono w Tabeli 15 i 16.

Tabela 15. Znormalizowana ekspresja genów badanych po porażeniu patogenem *Puccinia triticina*

Genotyp	Czas	Gen				Genotyp	Czas	Gen			
		<i>TaLr19TLPI</i>	PR2	PR9	<i>TaPrx107</i>			<i>TaLr19TLPI</i>	PR2	PR9	<i>TaPrx107</i>
89d1	0 h	6,273	12,961	11,745	3,688	109f3	0 h	10,773	17,174	12,370	4,441
	6 h	58,842	5,280	141,759	16,452		6 h	48,074	32,703	81,586	14,225
	12 h	11,938	2,369	41,710	8,786		12 h	11,399	11,903	14,839	5,396
	24 h	3,568	2,499	19,894	2,060		24 h	15,179	7,746	40,125	6,457
	48 h	7,430	4,819	17,912	5,066		48 h	17,949	7,960	19,146	7,732
	72 h	14,569	2,340	17,082	8,917		72 h	16,536	6,588	16,427	6,278
94a1	0 h	14,593	15,059	4,733	1,778	109f3.1	0 h	12,628	11,846	28,021	4,632
	6 h	81,986	6,755	46,937	7,751		6 h	40,918	18,079	63,660	17,470
	12 h	6,081	27,387	15,883	6,708		12 h	15,367	9,342	13,409	4,850
	24 h	7,161	5,511	18,309	4,480		24 h	12,357	8,427	18,264	6,717
	48 h	8,920	6,202	8,069	3,108		48 h	21,821	10,868	16,652	12,066
	72 h	15,280	10,036	16,437	4,333		72 h	19,863	6,231	19,437	8,573
114a1	0 h	12,658	0,509	5,070	2,836	130c4	0 h	4,775	43,079	4,752	2,273
	6 h	59,525	0,085	53,660	7,901		6 h	46,562	33,024	95,802	9,152
	12 h	10,334	0,119	18,541	6,117		12 h	23,572	7,861	15,075	8,044
	24 h	8,162	0,096	31,888	1,557		24 h	9,942	8,538	16,423	3,936
	48 h	19,016	0,053	14,299	4,318		48 h	15,046	9,050	20,349	5,167
	72 h	15,841	0,063	8,774	3,669		72 h	17,900	5,604	18,339	7,650
130b7	0 h	6,139	25,181	14,602	4,498	KWS Carusum	0 h	9,831	20,490	2,895	1,424
	6 h	73,911	20,217	68,733	8,564		6 h	65,558	21,488	149,598	10,988
	12 h	7,581	13,895	17,178	4,003		12 h	8,030	6,281	10,892	2,978
	24 h	16,113	5,950	29,759	9,358		24 h	13,762	5,352	69,608	5,676
	48 h	22,923	6,069	17,288	9,441		48 h	15,596	8,819	17,324	9,473
	72 h	20,622	7,340	20,555	10,624		72 h	21,552	4,960	21,577	7,055
106b1	0 h	11,453	19,314	15,899	8,847	Mantra	0 h	9,933	8,182	3,000	0,498
	6 h	46,201	18,352	148,998	8,828		6 h	71,752	19,954	103,064	8,848
	12 h	8,180	10,309	34,756	4,135		12 h	13,080	10,890	22,017	4,907
	24 h	14,071	2,496	45,042	4,010		24 h	8,078	9,668	18,928	2,232
	48 h	8,467	10,980	14,174	4,539		48 h	18,479	5,246	23,962	5,355
	72 h	16,116	2,854	12,194	5,533		72 h	17,583	8,879	12,365	1,163

Tabela 16. Znormalizowana ekspresja genów badanych po porażeniu patogenem *Puccinia triticina*

Genotyp	Czas	Gen				Genotyp	Czas	Gen			
		<i>TaLr19TLP1</i>	PR2	PR9	<i>TaPrx107</i>			<i>TaLr19TLP1</i>	PR2	PR9	<i>TaPrx107</i>
PI578204	0 h	16,035	13,566	3,624	1,326	Thatcher	0 h	12,887	2,792	4,535	0,980
	6 h	60,067	22,134	32,230	17,156		6 h	116,475	4,267	21,130	6,585
	12 h	5,271	13,569	13,687	7,334		12 h	0,112	4,912	16,712	1,603
	24 h	8,120	13,282	49,262	5,248		24 h	45,372	7,232	24,559	10,336
	48 h	23,648	7,773	30,868	10,293		48 h	65,235	1,723	20,711	2,516
	72 h	23,718	8,625	14,286	14,942		72 h	50,693	7,939	23,024	10,045
PI578212	0 h	9,188	6,694	4,927	3,865	Thatcher+Lr19	0 h	31,013	11,356	9,894	5,878
	6 h	91,088	12,809	22,436	11,061		6 h	74,646	17,732	27,324	3,589
	12 h	0,855	8,337	21,161	8,316		12 h	0,818	12,915	19,389	8,300
	24 h	18,431	6,991	23,461	5,869		24 h	25,884	5,091	30,997	3,062
	48 h	13,598	11,663	17,431	12,219		48 h	25,896	8,044	12,810	3,611
	72 h	25,463	5,875	10,311	9,724		72 h	50,267	7,983	13,990	7,725
PI614023	0 h	11,765	4,222	3,131	2,850	Thatcher+Lr24	0 h	15,010	0,100	10,019	6,958
	6 h	39,707	12,696	12,066	4,148		6 h	207,247	0,360	50,954	9,717
	12 h	0,576	5,115	6,473	3,932		12 h	0,329	0,033	6,679	3,022
	24 h	47,720	9,730	51,002	13,159		24 h	21,079	0,028	28,422	2,545
	48 h	13,503	9,676	9,775	3,884		48 h	40,884	0,047	18,125	3,139
	72 h	37,840	2,388	3,960	3,606		72 h	28,568	0,082	54,817	4,860
PI675464	0 h	7,190	0,073	4,063	2,505	Thatcher+Lr26	0 h	16,048	29,859	203,391	11,666
	6 h	48,452	0,105	51,860	12,436		6 h	87,752	15,677	171,934	5,324
	12 h	0,122	0,086	7,829	1,591		12 h	0,630	18,676	49,705	2,217
	24 h	38,904	0,146	41,033	13,298		24 h	24,820	12,163	45,639	2,908
	48 h	3,713	0,279	8,526	2,717		48 h	28,499	6,104	25,358	5,866
	72 h	25,728	0,159	8,286	8,098		72 h	51,546	5,251	12,145	2,504
PI675466	0 h	5,019	0,083	1,047	1,406	Thatcher+Lr38	0 h	23,338	6,902	11,802	7,465
	6 h	82,394	0,069	10,796	9,596		6 h	88,039	13,509	30,069	10,258
	12 h	0,431	0,155	20,872	5,544		12 h	1,360	8,544	22,053	6,649
	24 h	25,593	0,077	22,676	8,423		24 h	69,244	6,148	20,366	6,717
	48 h	23,729	0,076	15,966	8,488		48 h	33,474	6,422	11,776	4,230
	72 h	21,072	0,114	17,672	7,581		72 h	30,979	4,466	13,934	5,176
	0 h					Thatcher+Lr63	0 h	8,155	14,153	10,949	6,119
	6 h						6 h	136,727	22,088	69,150	3,836
	12 h						12 h	1,143	6,495	25,572	4,624
	24 h						24 h	24,009	3,356	21,324	3,241
	48 h						48 h	16,432	9,475	53,515	6,039
	72 h						72 h	47,606	6,303	18,386	2,459

### 7.6.1 Analiza genu *TaLr19TLP1* (PR5)

Wszystkie badane genotypy natychmiast po inokulacji (6 hpi) wykazywały znaczny wzrost poziomu ekspresji genu (Rycina 10) (Tabela 17) (Tabela 18). W 12 hpi wartości ekspresji w genotypach PI578204, PI578212, PI675466, PI675464, PI614023, TC+Lr19, TC+Lr24, TC+Lr38, TC+63, KWS Carusum, 94a1 obserwowano najniższe poziomy ekspresji genu *TaLr19TLP1*. U pozostałych roślin poziomy ekspresji również reagowały spadkiem wartości. Warto zaznaczyć, że pomimo znacznej redukcji wartości w 12 hpi po inokulacji, ekspresja poziomu u form mieszańcowych nie spadła poniżej poziomu genotypu Thatcher (genotyp podatny). W kolejnych godzinach obserwowano wzrost poziomu u form: 94a1, 130b7, 106b1, 109f3. U mieszańców: 114a1, 89d1, 130c4, 109f31 wykazano dalszy powolny spadek poziomu ekspresji genu. W godzinie 48, 72 hpi poziomy ekspresji stopniowo wzrastały u roślin: 89d1, 130c4, 106b1. U pozostałych mieszańców w 72 hpi obserwowano spadek wartości.

Zastosowany Test Kołmogorowa-Smirnowa został zaliczony dla wszystkich kombinacji gen  $\times$  genotyp z wyjątkiem 89d1, 94a1, Mantra, Thatcher + Lr24 (wartości  $p$  wyniosły odpowiednio: 0,01119; 0,01619; 0,03014; 0,01228) (Tabela 16) (Tabela 17).

Wzrost poziomu ekspresji po inokulacji mieszaniną zarodników w 6 hpi był istotny statystycznie dla genotypów: 89d1, 114a1, 130b7, 106b1, 109f31, KWS Carusum, Mantra, PI578204, PI578212, PI614023, TC+Lr26, TC+Lr38 (Tabela 16) (Tabela 17).

Porównanie profili ekspresji genu *TaLr19TLP1* między mieszańcami przeprowadzono za pomocą analizą korelacji (Rycina 10i). Spośród badanych mieszańców wykazano bardzo silne korelacje dla wszystkich form mieszańcowych. Korelację idealną równą 1 z poziomem istotności  $p < 0,001$  zaobserwowano między 130b7 a 109f3. Bardzo silne korelacje (0,98 i 0,97,  $p < 0,001$ ) występowały między mieszańcami: 89d1 i 94a1, 89d1 i 114a1, 94a1 i 114a1, 94a1 i 106b1, 114a1 i 130b, 114a1 i 109f3, 114a1 i 109f31.

Rycina 10. Mapy ciepła przedstawiające profile ekspresji genu *TaLr19TLP1* po inokulacji patogenem. Każda mapa przedstawia formę mieszańcową, formę akceptorową, donorową, linie izogeniczne Thatcher z genami które są obecne w formie mieszańcowej oraz linie Thatcher; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

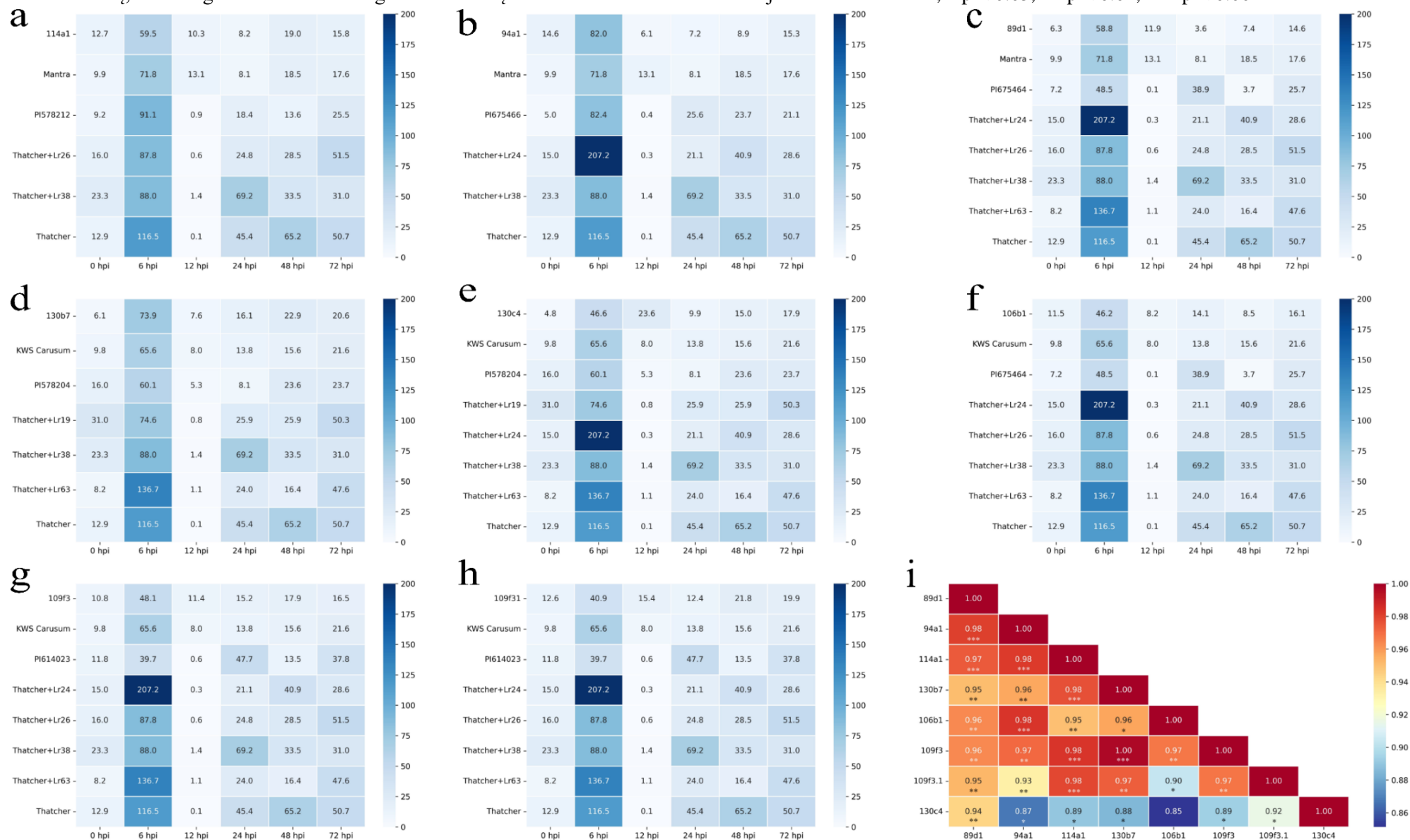


Tabela 17. Zmiany poziomu ekspresji genu *TaLr19TLP1* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji ( <i>TaLr19TLP1</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji ( <i>TaLr19TLP1</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
89d1	0 h		0,01119			109f3	0 h		0,08934		
	6 h	9,38		0.1968	0,022832		6 h	4,46		0.1904	0,084408
	12 h	1,90		0.7056	0,152746		12 h	1,06		0.8983	0,834859
	24 h	0,57		0.6269	0,433857		24 h	1,41		0.8567	0,134053
	48 h	1,18		0.9825	0,771887		48 h	1,67		0.4877	0,141203
	72 h	2,32		0.1992	0,034437		72 h	1,53		0.9294	0,098893
94a1	0 h		0,01619			109f3.1	0 h		0,524		
	6 h	5,62		0.4119	0,091881		6 h	3,24		0.5242	0,00009
	12 h	0,42		0.6129	0,066505		12 h	1,22		0.5285	0,633568
	24 h	0,49		0.7257	0,107926		24 h	0,98		0.5044	0,939263
	48 h	0,61		0.7593	0,19821		48 h	1,73		0.1766	0,403264
	72 h	1,05		0.8261	0,890584		72 h	1,57		0.994	0,037014
114a1	0 h		0,24191			130c4	0 h		0,06734		
	6 h	4,70		0.8076	0,000427		6 h	9,75		0.2768	0,139903
	12 h	0,82		0.5691	0,581717		12 h	4,94		0.414	0,148493
	24 h	0,64		0.6923	0,520726		24 h	2,08		0.2421	0,370719
	48 h	1,50		0.6785	0,342708		48 h	3,15		0.3044	0,070946
	72 h	1,25		0.9404	0,555478		72 h	3,75		0.9234	0,003145
130b7	0 h		0,14112			KWS Carusum	0 h		0,03694		
	6 h	12,04		0.1508	0,034666		6 h	6,67		0.3435	0,010938
	12 h	1,23		0.7067	0,619845		12 h	0,82		0.821	0,769116
	24 h	2,62		0.7122	0,063538		24 h	1,40		0.7717	0,520395
	48 h	3,73		0.3653	0,054824		48 h	1,59		0.4479	0,298259
	72 h	3,36		0.7494	0,019616		72 h	2,19		0.4136	0,069927
106b1	0 h		0,11395			Mantra	0 h		0,03014		
	6 h	4,03		0.485	0,00241		6 h	7,22		0.952	0,000861
	12 h	0,71		0.5132	0,560252		12 h	1,32		0.8082	0,642628
	24 h	1,23		0.5534	0,642844		24 h	0,81		0.8806	0,789358
	48 h	0,74		0.5268	0,594755		48 h	1,86		0.2754	0,164888
	72 h	1,41		0.3951	0,398993		72 h	1,77		0.8048	0,381193

Tabela 18. Zmiany poziomu ekspresji genu *TaLr19TLP1* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji ( <i>TaLr19TLP</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji ( <i>TaLr19TLP</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
PI578204	0 h		0,54426			Thatcher	0 h		0,45644		
	6 h	3,75		0,9073	0,03121		6 h	9,04		0,324	0,122782
	12 h	0,33		0,4905	0,379603		12 h	0,01		0,2937	0,062337
	24 h	0,51		0,4164	0,495155		24 h	3,52		0,9265	0,007722
	48 h	1,47		0,357	0,501851		48 h	5,06		0,3511	0,027956
	72 h	1,48		0,7151	0,562445		72 h	3,93		0,3021	0,063064
PI578212	0 h		0,12351			Thatcher+Lr19	0 h		0,51556		
	6 h	9,91		0,2771	0,003445		6 h	2,41		0,1822	0,065509
	12 h	0,09		0,5198	0,007642		12 h	0,03		0,2586	0,000086
	24 h	2,01		0,3214	0,287544		24 h	0,83		0,4272	0,438501
	48 h	1,48		0,4449	0,340747		48 h	0,83		0,6814	0,228041
	72 h	2,77		0,411	0,166744		72 h	1,62		0,6622	0,009281
PI614023	0 h		0,85109			Thatcher+Lr24	0 h		0,01228		
	6 h	3,38		0,9023	0,013912		6 h	13,81		0,2031	0,066265
	12 h	0,05		0,2156	0,062779		12 h	0,02		0,1987	0,005969
	24 h	4,06		0,3707	0,078308		24 h	1,40		0,3249	0,482118
	48 h	1,15		0,6672	0,754604		48 h	2,72		0,8809	0,002259
	72 h	3,22		0,5651	0,034124		72 h	1,90		0,9022	0,035298
PI675464	0 h		0,28152			Thatcher+Lr26	0 h		0,58999		
	6 h	6,74		0,3384	0,055596		6 h	5,47		0,4306	0,004317
	12 h	0,02		0,1217	0,087426		12 h	0,04		0,3946	0,03017
	24 h	5,41		0,2675	0,089633		24 h	1,55		0,5505	0,598065
	48 h	0,52		0,5901	0,404551		48 h	1,78		0,7048	0,194004
	72 h	3,58		0,5719	0,070002		72 h	3,21		0,5301	0,01813
PI675466	0 h		0,27603			Thatcher+Lr38	0 h		0,26394		
	6 h	16,42		0,3448	0,087369		6 h	3,77		0,3795	0,048133
	12 h	0,09		0,3494	0,001434		12 h	0,06		0,1577	0,026768
	24 h	5,10		0,1658	0,057004		24 h	2,97		0,3161	0,3719
	48 h	4,73		0,3555	0,264954		48 h	1,43		0,7094	0,458427
	72 h	4,20		0,1501	0,042567		72 h	1,33		0,8178	0,530206
						Thatcher+Lr63	0 h		0,18127		
					6 h		16,77		0,2931	0,078188	
					12 h		0,14		0,3832	0,290209	
					24 h		2,94		0,4523	0,276349	
					48 h		2,02		0,9688	0,351218	
					72 h		5,84		0,5791	0,036381	

## 7.6.2 Analiza genu PR2

Profile poziomu ekspresji genu PR2 były zróżnicowane u analizowanych genotypów. Formy 114a1, 89d1, 130b7, 130c4, 106b1, TC+Lr26 wykazywały najwyższy poziom ekspresji przed inokulacją (Rycina 11) (Tabela 19) (Tabela 20). W dalszych godzinach obserwowano spadek poziomu ekspresji genu natomiast w 48 hpi i 72 hpi dochodziło do delikatnego wzrostu wartości, oprócz linii TC+Lr26. U form 130b7, 130c4, 106b1 w 6 hpi mimo spadku wartość ekspresji genu była on zbliżona do wyjściowego poziomu. Genotypy: 114a1, PI675464, PI6754466, TC+Lr24 charakteryzowały się najniższą wartością w obrębie badanych form, w 6 hpi zaobserwowano spadek poziomu ekspresji i utrzymywała się do 72 hpi. Formy 109f3, 109f31, KWS Carusum, PI578204, PI578212, PI614023, TC+Lr19, TC+Lr38, TC+Lr63 charakteryzowały się podniesieniem wartości ekspresji po inokulacji w 6 hpi, a następnie następowało obniżenie poziomu ekspresji genu. Genotyp 94a1 tuż po stresie (6 hpi) zareagował spadkiem wartości, w 12 hpi nastąpił wzrost, znacznie przekraczając wartość przed inokulacją.

Test Kołmogorowa-Smirnowa został zaliczony dla wszystkich kombinacji gen  $\times$  genotyp z wyjątkiem 94a1, 114a1, 130c4 (wartości  $p$  wyniosły odpowiednio: 0,03949; 0,02482; 0,02506) (Tabela 18) (Tabela 19).

Porównanie profili ekspresji genu PR2 między mieszańcami przeprowadzono za pomocą analizą korelacji (Rycina 11i). Spośród badanych mieszańców wykazano zróżnicowane korelacje dla form mieszańcowych. Korelacja bardzo silna ( $p < 0,01$ ) występuje między 89d1 i 114a1 (0,92), 130b7 i 130c4 (0,93) oraz 109f3 i 109f31 (0,94). Warto zauważyć, że formy 109f3, 109f31 i 130b7, 130c4 posiadają wspólne formy donorowe. Słabe korelacje wykazano pomiędzy mieszańcem 94a1 i pozostałymi mieszańcami, oraz między 114a1 i 109f31, 114 i 109f3, 89d1 i 109f31, 89d1 i 109f3.

Rycina 11. Mapy ciepła przedstawiające profile ekspresji genu PR2 po inokulacji patogenem. Każda mapa przedstawia formę mieszańcową, formę akceptorową, donorową, linie izogeniczne Thatcher z genami które są obecne w formie mieszańcowej oraz linie Thatcher; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

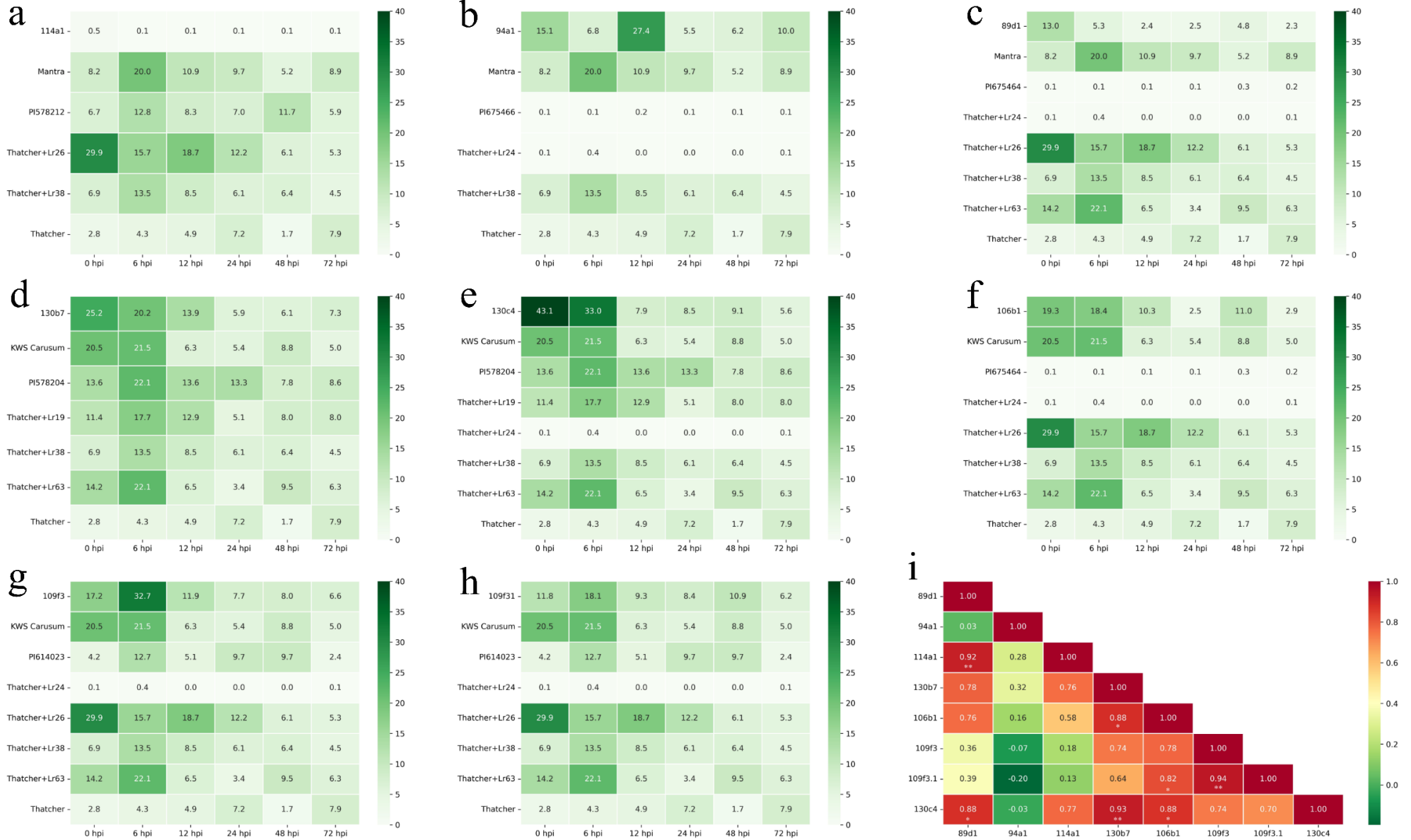


Tabela 19. Zmiany poziomu ekspresji genu PR2 po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji (PR2) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji (PR2) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
89d1	0 h		0,23457			109f3	0 h		0,19529		
	6 h	0,41		0.3216	0,352662		6 h	1,90		0.7011	0,200879
	12 h	0,18		0.2069	0,205027		12 h	0,69		0.4299	0,359616
	24 h	0,19		0.1878	0,206983		24 h	0,45		0.3656	0,131045
	48 h	0,37		0.3822	0,339028		48 h	0,46		0.5082	0,154841
	72 h	0,18		0.1776	0,200268		72 h	0,38		0.6776	0,135344
94a1	0 h		0,03949			109f3.1	0 h		0,60729		
	6 h	0,45		0.4236	0,275425		6 h	1,53		0.7389	0,213162
	12 h	1,82		0.4526	0,451397		12 h	0,79		0.3242	0,518066
	24 h	0,37		0.3588	0,215829		24 h	0,71		0.8444	0,481971
	48 h	0,41		0.5282	0,26589		48 h	0,92		0.9562	0,853025
	72 h	0,67		0.7965	0,552064		72 h	0,53		0.4073	0,197334
114a1	0 h		0,02482			130c4	0 h		0,02506		
	6 h	0,17		0.2965	0,373233		6 h	0,77		0.8337	0,60851
	12 h	0,23		0.372	0,414301		12 h	0,18		0.1712	0,040038
	24 h	0,19		0.3497	0,386585		24 h	0,20		0.1899	0,042936
	48 h	0,10		0.3191	0,342005		48 h	0,21		0.2315	0,046569
	72 h	0,12		0.3335	0,335821		72 h	0,13		0.2349	0,035154
130b7	0 h		0,326			KWS Carusum	0 h		0,15626		
	6 h	0,80		0.6854	0,623209		6 h	1,05		0.859	0,92231
	12 h	0,55		0.9847	0,363813		12 h	0,31		0.329	0,130668
	24 h	0,24		0.1472	0,063514		24 h	0,26		0.3377	0,114063
	48 h	0,24		0.1522	0,06476		48 h	0,43		0.3662	0,198173
	72 h	0,29		0.3451	0,092801		72 h	0,24		0.4629	0,118277
106b1	0 h		0,25453			Mantra	0 h		0,66986		
	6 h	0,95		0.7134	0,963139		6 h	2,44		0.6179	0,009388
	12 h	0,53		0.5103	0,639793		12 h	1,33		0.5696	0,592101
	24 h	0,13		0.37	0,380022		24 h	1,18		0.8251	0,684751
	48 h	0,57		0.526	0,666223		48 h	0,64		0.8116	0,34808
	72 h	0,15		0.343	0,387565		72 h	1,09		0.5351	0,925945

Tabela 20. Zmiany poziomu ekspresji genu PR2 po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji (PR2) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji (PR2) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
PI578204	0 h		0,74286			Thatcher	0 h		0,22863		
	6 h	1,63		0,828	0,392994		6 h	1,53		0,2415	0,591357
	12 h	1,00		0,9743	0,999783		12 h	1,76		0,367	0,6324
	24 h	0,98		0,6064	0,965592		24 h	2,59		0,1878	0,331275
	48 h	0,57		0,2049	0,335091		48 h	0,62		0,7988	0,387745
	72 h	0,64		0,3153	0,421353		72 h	2,84		0,386	0,266049
PI578212	0 h		0,83535			Thatcher+Lr19	0 h		0,78445		
	6 h	1,91		0,6275	0,095353		6 h	1,56		0,7026	0,228999
	12 h	1,25		0,6795	0,601245		12 h	1,14		0,4202	0,601232
	24 h	1,04		0,534	0,917713		24 h	0,45		0,3847	0,08282
	48 h	1,74		0,4609	0,405716		48 h	0,71		0,9188	0,409273
	72 h	0,88		0,9559	0,817149		72 h	0,70		0,8056	0,364884
PI614023	0 h		0,39292			Thatcher+Lr24	0 h		0,06188		
	6 h	3,01		0,2426	0,115575		6 h	3,60		0,2871	0,210554
	12 h	1,21		0,5155	0,608787		12 h	0,33		0,4743	0,231804
	24 h	2,30		0,2298	0,156336		24 h	0,28		0,3266	0,17731
	48 h	2,29		0,2103	0,07403		48 h	0,47		0,4543	0,322766
	72 h	0,57		0,4979	0,159038		72 h	0,82		0,9585	0,780275
PI675464	0 h		0,4876			Thatcher+Lr26	0 h		0,23732		
	6 h	1,45		0,8275	0,581352		6 h	0,53		0,1469	0,371493
	12 h	1,19		0,7098	0,825952		12 h	0,63		0,4299	0,511687
	24 h	2,01		0,6165	0,139226		24 h	0,41		0,2241	0,285855
	48 h	3,83		0,4005	0,134221		48 h	0,20		0,1941	0,170682
	72 h	2,19		0,4908	0,085355		72 h	0,18		0,1622	0,156502
PI675466	0 h		0,30941			Thatcher+Lr38	0 h		0,72957		
	6 h	0,83		0,3887	0,756275		6 h	1,96		0,3992	0,0245
	12 h	1,87		0,3898	0,403946		12 h	1,24		0,6912	0,17417
	24 h	0,93		0,6892	0,860186		24 h	0,89		0,4261	0,637419
	48 h	0,91		0,6172	0,705126		48 h	0,93		0,4236	0,865652
	72 h	1,37		0,4335	0,626197		72 h	0,65		0,4776	0,116626
						Thatcher+Lr63	0 h		0,23681		
							6 h	1,56		0,4072	0,408695
							12 h	0,46		0,3409	0,41342
							24 h	0,24		0,2762	0,259648
							48 h	0,67		0,2635	0,598496
							72 h	0,45		0,3781	0,408496

### 7.6.3 Analiza genu PR9

Profil ekspresji genu PR9 w analizowanych charakteryzował się u wszystkich genotypów w podobny wzorce (Rycina 12) W odpowiedzi na stres (6 hpi) następował nagły wzrost poziomu ekspresji genu, z wyjątkiem TC+Lr26 gdzie poziom przed inokulacją był wyższy niż po inokulacji. Największy przyrost obserwowano u odmian Mantra i KWS Carusum (istotne statystycznie  $p < 0,01$ ) (Tabela 20.). W kolejnym punkcie czasowym wśród badanych roślin następował znaczny spadek poziomu ekspresji genu u analizowanych roślin, po czym ponownie w 24 hpi obserwowano wzrost wartości poziomu ekspresji, z wyjątkiem genotypów 89d1, TC+Lr38, które charakteryzowały się stałym spadkiem poziomu ekspresji genu od 12 hpi (istotne statystycznie  $p < 0,01$ ) (Tabela 21) (Tabela 22). Analiza genu PR9 u form otrzymanych w wyniku krzyżowania w 6 hpi wykazywała wyższe poziomy od linii podatnej Thatcher.

Test Kołmogorowa-Smirnowa został zaliczony dla wszystkich kombinacji gen  $\times$  genotyp z wyjątkiem 109f3, 130c4, KWS Carusum, Mantra, TC+Lr26 (wartości  $p$  wyniosły odpowiednio: 0,03378; 0,00113; 0,01085; 0,01413; 0,01413) (Tabela 21) (Tabela 22).

Porównanie profili ekspresji genu PR9 między mieszańcami przeprowadzono za pomocą analizą korelacji (Rycina 12i). Spośród badanych mieszańców wykazano silne korelacje dla analizowanych form mieszańcowych. Najsilniejsza korelacja występuje pomiędzy 130b7 i 109f3 oraz 130b7 i 106b1 ( $p < 0,001$ ). Korelacja umiarkowana wynosząca 0,76 występuje pomiędzy mieszańcami 114a1 i 109f31.

Rycina 12. Mapy ciepła przedstawiające profile ekspresji genu PR9 po inokulacji patogenem. Każda mapa przedstawia formę mieszańcową, formę akceptorową, donorową, linie izogeniczne Thatcher z genami które są obecne w formie mieszańcowej oraz linie Thatcher; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

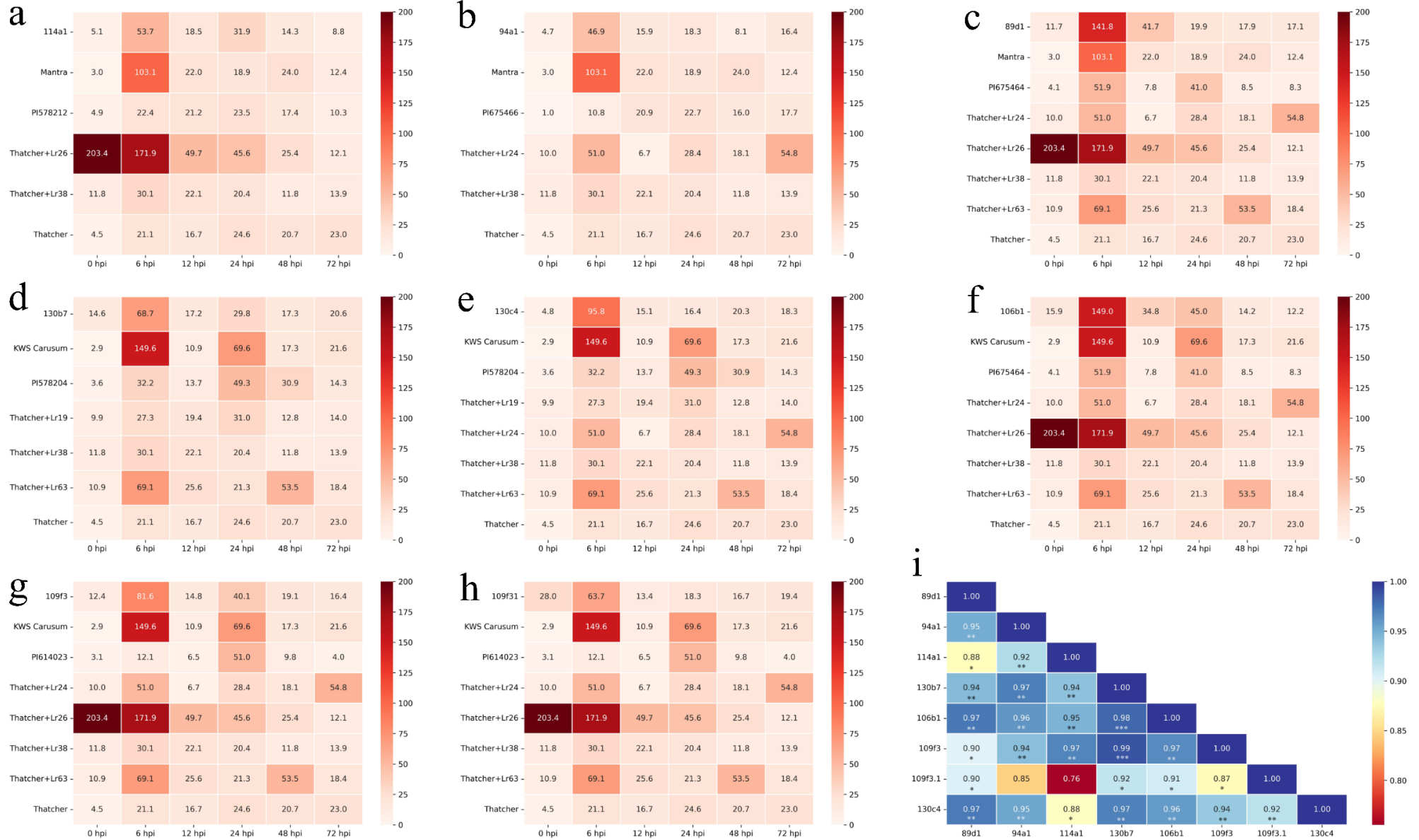


Tabela 21. Zmiany poziomu ekspresji genu PR9 po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji (PR9) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji (PR9) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
89d1	0 h		0,05559			109f3	0 h		0,03378		
	6 h	12,07		0.1345	0,097255		6 h	6,60		0.1655	0,148758
	12 h	3,55		0.5766	0,027835		12 h	1,20		0.7244	0,734382
	24 h	1,69		0.4206	0,593334		24 h	3,24		0.3605	0,83122
	48 h	1,53		0.9415	0,325214		48 h	1,55		0.8546	0,275374
	72 h	1,45		0.8248	0,334825		72 h	1,33		0.6989	0,550867
94a1	0 h		0,39021			109f3.1	0 h		0,20568		
	6 h	9,92		0.1807	0,038209		6 h	2,27		0.7747	0,043737
	12 h	3,36		0.3425	0,189078		12 h	0,48		0.6534	0,275799
	24 h	3,87		0.3789	0,154672		24 h	0,65		0.7324	0,462204
	48 h	1,70		0.648	0,298115		48 h	0,59		0.541	0,360298
	72 h	3,47		0.6681	0,065583		72 h	0,69		0.6921	0,507394
114a1	0 h		0,09194			130c4	0 h		0,00113		
	6 h	10,58		0.1928	0,141218		6 h	20,16		0.3506	0,339068
	12 h	3,66		0.7	0,041436		12 h	3,17		0.2153	0,086977
	24 h	6,29		0.529	0,081346		24 h	3,46		0.2266	0,114033
	48 h	2,82		0.7269	0,119247		48 h	4,28		0.2318	0,037595
	72 h	1,73		0.9338	0,514507		72 h	3,86		0.3079	0,074899
130b7	0 h		0,36627			KWS Carusum	0 h		0,01085		
	6 h	4,71		0.478	0,068949		6 h	51,67		0.1243	0,005973
	12 h	1,18		0.602	0,81119		12 h	3,76		0.3416	0,076307
	24 h	2,04		0.4455	0,184308		24 h	24,04		0.1294	0,080647
	48 h	1,18		0.6374	0,806295		48 h	5,98		0.2051	0,027121
	72 h	1,41		0.7213	0,606821		72 h	7,45		0.9597	0,0001
106b1	0 h		0,08655			Mantra	0 h		0,01413		
	6 h	9,37		0.1387	0,07596		6 h	34,36		0.1723	0,099179
	12 h	2,19		0.2161	0,362845		12 h	7,34		0.3991	0,032945
	24 h	2,83		0.3917	0,096554		24 h	6,31		0.4246	0,032233
	48 h	0,89		0.8159	0,588462		48 h	7,99		0.1703	0,013959
	72 h	0,77		0.7135	0,452518		72 h	4,12		0.1615	0,080308

Tabela 22. Zmiany poziomu ekspresji genu PR9 po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji (PR9) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji (PR9) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
PI578204	0 h		0,87937			Thatcher	0 h		0,66103		
	6 h	8,89		0,2897	0,002218		6 h	4,66		0,155	0,199362
	12 h	3,78		0,5668	0,01335		12 h	3,68		0,1894	0,164027
	24 h	13,59		0,1741	0,055723		24 h	5,41		0,1892	0,007861
	48 h	8,52		0,324	0,001549		48 h	4,57		0,4333	0,00281
	72 h	3,94		0,3019	0,033591		72 h	5,08		0,3952	0,020418
PI578212	0 h		0,52975			Thatcher+Lr19	0 h		0,90185		
	6 h	4,55		0,3745	0,007327		6 h	2,76		0,2198	0,104006
	12 h	4,29		0,2344	0,032347		12 h	1,96		0,2935	0,046625
	24 h	4,76		0,3432	0,111898		24 h	3,13		0,201	0,005349
	48 h	3,54		0,2126	0,133435		48 h	1,29		0,2868	0,602284
	72 h	2,09		0,5148	0,181556		72 h	1,41		0,1584	0,548016
PI614023	0 h		0,11982			Thatcher+Lr24	0 h		0,18255		
	6 h	3,85		0,3569	0,16164		6 h	5,09		0,2931	0,150889
	12 h	2,07		0,7949	0,35678		12 h	0,67		0,7233	0,364073
	24 h	16,29		0,9396	0,000069		24 h	2,84		0,5103	0,175359
	48 h	3,12		0,7804	0,14042		48 h	1,81		0,777	0,073389
	72 h	1,26		0,395	0,702637		72 h	5,47		0,2547	0,187968
PI675464	0 h		0,43105			Thatcher+Lr26	0 h		0,01413		
	6 h	12,77		0,5173	0,000737		6 h	0,85		0,8484	0,903372
	12 h	1,93		0,5236	0,550684		12 h	0,24		0,4672	0,481459
	24 h	10,10		0,2796	0,009615		24 h	0,22		0,4072	0,465224
	48 h	2,10		0,5248	0,368124		48 h	0,12		0,4151	0,414585
	72 h	2,04		0,5991	0,210975		72 h	0,06		0,377	0,382459
PI675466	0 h		0,89854			Thatcher+Lr38	0 h		0,96477		
	6 h	10,32		0,1486	0,189718		6 h	2,55		0,3668	0,036845
	12 h	19,94		0,3862	0,054407		12 h	1,87		0,5919	0,045117
	24 h	21,66		0,8463	0,000036		24 h	1,73		0,5456	0,044364
	48 h	15,25		0,2937	0,176499		48 h	1,00		0,3966	0,996754
	72 h	16,88		0,2236	0,068332		72 h	1,18		0,4472	0,804732
						Thatcher+Lr63	0 h		0,08117		
					6 h		6,32		0,2383	0,096919	
					12 h		2,34		0,8508	0,282808	
					24 h		1,95		0,6636	0,261232	
					48 h		4,89		0,3568	0,071866	
					72 h		1,68		0,8973	0,517559	

#### 7.6.4 Analiza genu *TaPrx107* (PRA2)

Profile poziomu ekspresji genu *TaPrx107* w analizowanym pokoleniu F<sub>3</sub> ułożyły się w 3 wzorce (Rycina 13). W pierwszym widoczny jest wzrost wartości tuż po zainfekowaniu roślin (6 hpi), następnie dochodzi do obniżenia wartości zbliżonych do poziomu wyjściowego, po czym w 24 hpi obserwowane jest zwielokrotnienie ekspresji genu i jej utrzymanie na stałym poziomie. Profil ten widoczny jest u mieszańca 130b7. Drugim schematem występującym wśród badanych form mieszańcowych jest znaczny wzrost poziomu ekspresji genu w 6 godzinie oraz 72 godzinie po inokulacji. Wzorzec ten widoczny jest w genotypach: 94a1, 89d1, 130c4, 106b1, a także w liniach TC+Lr24, TC+Lr38, PI578204. Trzecim wzorcem obserwowanym podczas analiz jest wzrost wartości ekspresji genu po przebytych stresie (6 hpi), następnie obniżenie w punkcie czasowym 24 hpi, natomiast po 24 godzinach dochodzi do kolejnego podniesienia poziomu ekspresji genu, po czym w 72 hpi obserwowany jest spadek. Taki profil obserwowano u genotypów: 109f31, 109f3, 114a1 oraz pozostałych badanych roślin z wyjątkiem linii podatnej Thatcher, gdzie wzrost poziomu ekspresji następował w 6, 24, 72 hpi.

Test Kołmogorowa-Smirnowa został zaliczony dla wszystkich kombinacji gen × genotyp, spełniając hipotezę zerową o rozkładzie zbliżonego do normalnego dla zestawu znormalizowanych wartości ekspresji danego genu (Tabela 23) (Tabela 24).

Porównanie profili ekspresji genu *TaPrx107* między mieszańcami przeprowadzono za pomocą analizą korelacji (Rycina 13i) Spośród badanych mieszańców wykazano zróżnicowane korelacje dla analizowanych form mieszańcowych. Najsilniejsza korelacja występuje pomiędzy 109f3 i 109f31 ze współczynnikiem 0,95 ( $p < 0,01$ ).

Rycina 13. Mapy ciepła przedstawiające profile ekspresji genu *TaPrx107* po inokulacji patogenem. Każda mapa przedstawia formę mieszańcową, formę akceptorową, donorową, linie izogeniczne Thatcher z genami które są obecne w formie mieszańcowej oraz linie Thatcher; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

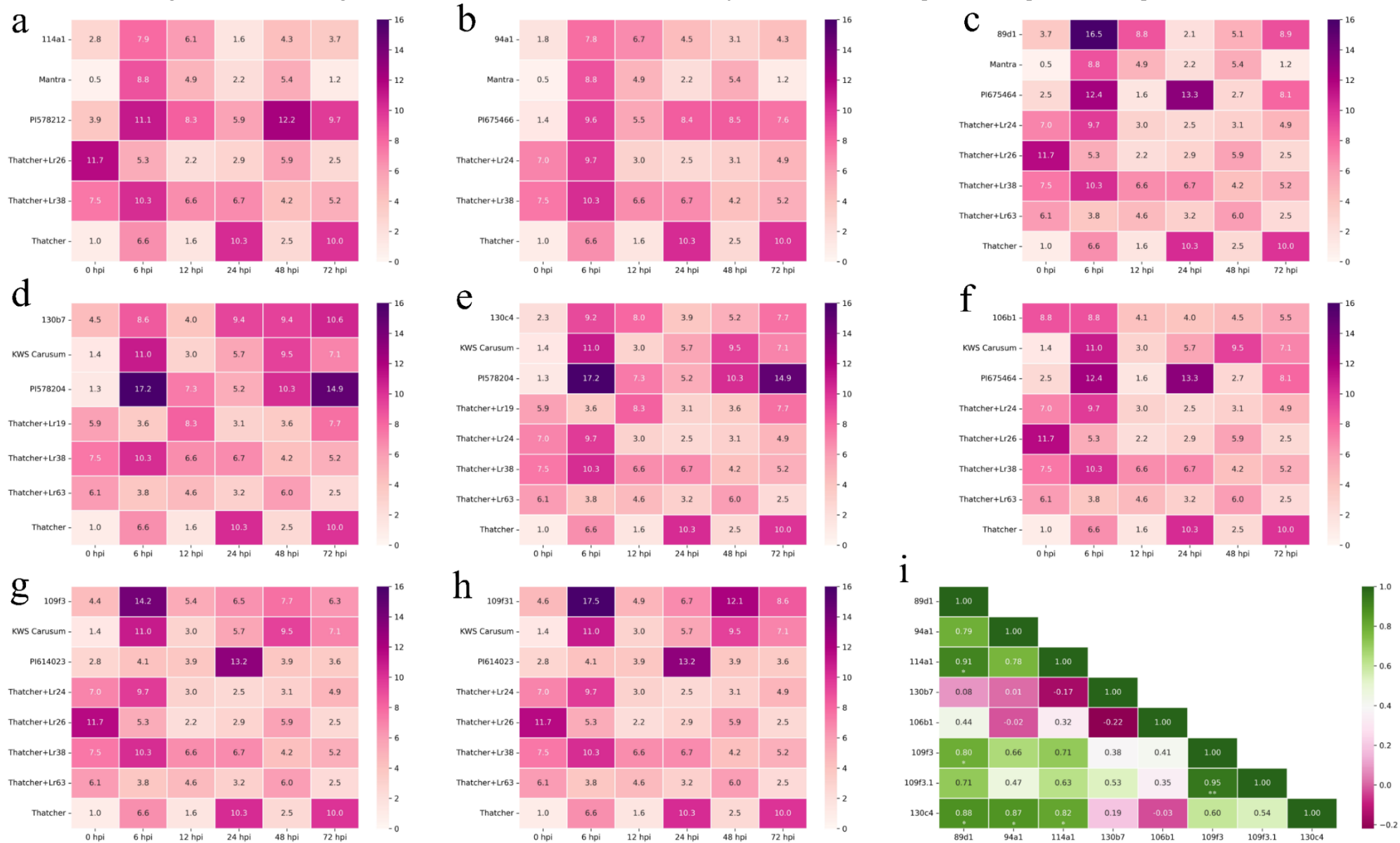


Tabela 23. Zmiany poziomu ekspresji genu *TaPrx107* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji ( <i>TaPrx107</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji ( <i>TaPrx107</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
89d1	0 h		0,61277			109f3	0 h		0,26208		
	6 h	4,46		0.1653	0,061738		6 h	3,20		0.6185	0,055481
	12 h	2,38		0.2777	0,093457		12 h	1,21		0.7802	0,676304
	24 h	0,56		0.6101	0,331464		24 h	1,45		0.7267	0,383263
	48 h	1,37		0.398	0,523122		48 h	1,74		0.5628	0,435791
	72 h	2,42		0.9738	0,004833		72 h	1,41		0.8058	0,566029
94a1	0 h		0,88143			109f3.1	0 h		0,62633		
	6 h	4,36		0.5009	0,010528		6 h	3,77		0.2024	0,029146
	12 h	3,77		0.4339	0,098114		12 h	1,05		0.5303	0,945722
	24 h	2,52		0.4996	0,12152		24 h	1,45		0.5844	0,280232
	48 h	1,75		0.875	0,063594		48 h	2,61		0.1916	0,201018
	72 h	2,44		0.467	0,03458		72 h	1,85		0.7726	0,03789
114a1	0 h		0,93563			130c4	0 h		0,51778		
	6 h	2,79		0.8243	0,116093		6 h	4,03		0.3202	0,053893
	12 h	2,16		0.8154	0,178015		12 h	3,54		0.4615	0,100291
	24 h	0,55		0.5405	0,507245		24 h	1,73		0.4361	0,38894
	48 h	1,52		0.8569	0,516781		48 h	2,27		0.532	0,120503
	72 h	1,29		0.4798	0,654985		72 h	3,37		0.3375	0,18302
130b7	0 h		0,91448			KWS Carusum	0 h		0,28251		
	6 h	1,90		0.993	0,200449		6 h	7,72		0.2937	0,221754
	12 h	0,89		0.9705	0,849779		12 h	2,09		0.2182	0,20136
	24 h	2,08		0.9156	0,1107		24 h	3,99		0.3916	0,071595
	48 h	2,10		0.4145	0,058163		48 h	6,65		0.3817	0,007815
	72 h	2,36		0.503	0,183156		72 h	4,96		0.1977	0,082827
106b1	0 h		0,73864			Mantra	0 h		0,67187		
	6 h	1,00		0.4871	0,996737		6 h	17,75		0.1684	0,003022
	12 h	0,47		0.5097	0,110648		12 h	9,84		0.2044	0,096992
	24 h	0,45		0.3559	0,089548		24 h	4,48		0.1666	0,130406
	48 h	0,51		0.6961	0,159299		48 h	10,74		0.1987	0,026414
	72 h	0,63		0.3563	0,201513		72 h	2,33		0.291	0,138775

Tabela 24. Zmiany poziomu ekspresji genu *TaPrx107* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji ( <i>TaPrx107</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Zmiana po inokulacji ( <i>TaPrx107</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
PI578204	0 h		0,96653			Thatcher	0 h		0,09027		
	6 h	12,94		0,2991	0,001382		6 h	6,72		0,2729	0,14672
	12 h	5,53		0,4311	0,041033		12 h	1,64		0,6682	0,145443
	24 h	3,96		0,2881	0,111578		24 h	10,55		0,1394	0,163389
	48 h	7,76		0,4425	0,027787		48 h	2,57		0,2335	0,192008
	72 h	11,27		0,2508	0,013041		72 h	10,25		0,1643	0,102514
PI578212	0 h		0,38118			Thatcher+Lr19	0 h		0,79155		
	6 h	2,86		0,3542	0,065471		6 h	0,61		0,9131	0,117316
	12 h	2,15		0,3624	0,177857		12 h	1,41		0,5236	0,348762
	24 h	1,52		0,702	0,303758		24 h	0,52		0,8481	0,082945
	48 h	3,16		0,1977	0,161631		48 h	0,61		0,6949	0,147386
	72 h	2,52		0,2415	0,326294		72 h	1,31		0,3438	0,609681
PI614023	0 h		0,0777			Thatcher+Lr24	0 h		0,31502		
	6 h	1,46		0,4663	0,502332		6 h	1,40		0,8677	0,367646
	12 h	1,38		0,9533	0,680362		12 h	0,43		0,4145	0,093508
	24 h	4,62		0,438	0,219662		24 h	0,37		0,4277	0,071237
	48 h	1,36		0,351	0,573349		48 h	0,45		0,3719	0,096797
	72 h	1,27		0,3844	0,680565		72 h	0,70		0,6849	0,495855
PI675464	0 h		0,48226			Thatcher+Lr26	0 h		0,11855		
	6 h	4,97		0,3506	0,032872		6 h	0,46		0,3349	0,395504
	12 h	0,64		0,9815	0,329975		12 h	0,19		0,2825	0,226516
	24 h	5,31		0,3029	0,010089		24 h	0,25		0,2983	0,256831
	48 h	1,08		0,5557	0,906009		48 h	0,50		0,4358	0,447895
	72 h	3,23		0,265	0,088289		72 h	0,21		0,3075	0,239501
PI675466	0 h		0,97514			Thatcher+Lr38	0 h		0,80749		
	6 h	6,83		0,3909	0,002074		6 h	1,37		0,4813	0,261704
	12 h	3,94		0,1824	0,104078		12 h	0,89		0,617	0,375045
	24 h	5,99		0,2745	0,010345		24 h	0,90		0,2913	0,670119
	48 h	6,04		0,3598	0,23129		48 h	0,57		0,3332	0,047215
	72 h	5,39		0,4024	0,024525		72 h	0,69		0,2643	0,294595
						Thatcher+Lr63	0 h		0,22989		
							6 h	0,63		0,4082	0,658936
							12 h	0,76		0,378	0,769344
							24 h	0,53		0,5157	0,593006
							48 h	0,99		0,7769	0,989511
							72 h	0,40		0,3568	0,483752

### 7.6.5 Analiza genów referencyjnych

Do przetestowania stabilności genów referencyjnych *ARF* i *TUB* wykorzystano wartości cT przed i po inokulacji (Tabela 25) (Tabela 26) (Tabela 27) (Tabela 28) (Tabela 29). Test ten wykazał wzrost wartości cT, głównie w początkowych punktach czasowych, co mogłoby skutkować wzrostem obliczonej wartości ekspresji genów. W analizowanych punktach poziom ekspresji nie był zwiększony, wskazując, że krótkotrwała niestabilność genów referencyjnych, nie spowodowała uzyskania wyników fałszywie dodatnich.

Tabela 25. Zmiany poziomu ekspresji genu referencyjnego *ARF* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Różnica	Zmiana	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Różnica	Zmiana	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
		po inokulacji ( <i>ARF</i> ) T-0h	po inokulacji ( <i>ARF</i> ) T/0h						po inokulacji ( <i>ARF</i> ) T-0h	po inokulacji ( <i>ARF</i> ) T/0h			
89d1	0 h			0,95706			109f3	0 h			0,85617		
	6 h	2,347	1,101705		0,6518	0,105885		6 h	1,153	1,045455		0,6837	0,409569
	12 h	2,483	1,107628		0,8545	0,025701		12 h	-0,697	0,972543		0,818	0,632611
	24 h	-0,220	0,990465		0,4397	0,864105		24 h	0,637	1,025092		0,4441	0,599628
	48 h	1,140	1,049408		0,892	0,190957		48 h	-0,050	0,998029		0,9115	0,976293
	72 h	3,340	1,144756		0,4773	0,005191		72 h	0,147	1,00578		0,6583	0,910393
94a1	0 h			0,45621			109f31	0 h			0,99773		
	6 h	1,250	1,052462		0,4594	0,524389		6 h	2,080	1,081976		0,2799	0,140751
	12 h	-0,407	0,982932		0,4315	0,708871		12 h	-1,417	0,944167		0,4073	0,37521
	24 h	0,930	1,039032		0,5469	0,427403		24 h	0,740	1,029164		0,4036	0,381886
	48 h	0,010	1,00042		0,4207	0,993081		48 h	0,717	1,028245		0,372	0,565903
	72 h	0,923	1,038752		0,7841	0,097262		72 h	0,097	1,00381		0,547	0,875064
114a1	0 h			0,92531			130c4	0 h			0,98321		
	6 h	0,773	1,032389		0,4694	0,431183		6 h	0,933	1,03979		0,4292	0,41394
	12 h	0,300	1,012565		0,46	0,750268		12 h	2,313	1,098622		0,5964	0,076178
	24 h	0,070	1,002932		0,5103	0,941535		24 h	1,240	1,052863		0,5185	0,340726
	48 h	-0,410	0,982828		0,7224	0,699804		48 h	0,740	1,031548		0,7793	0,2746
	72 h	-0,350	0,985341		0,5218	0,71808		72 h	1,560	1,066506		0,418	0,125806
130b7	0 h			0,29837			KWS Carusum	0 h			0,97329		
	6 h	1,937	1,081441		0,5117	0,247447		6 h	0,577	1,024609		0,7573	0,671941
	12 h	0,147	1,006168		0,6648	0,928889		12 h	0,040	1,001707		0,9121	0,97119
	24 h	2,383	1,100224		0,4136	0,158061		24 h	2,203	1,094026		0,3098	0,050284
	48 h	1,567	1,065882		0,3361	0,307457		48 h	2,590	1,110526		0,3822	0,033782
	72 h	3,017	1,126857		0,3686	0,089462		72 h	1,807	1,077098		0,8485	0,148123
106b1	0 h			0,66286			Mantra	0 h			0,88943		
	6 h	-2,113	0,920671		0,4774	0,181761		6 h	3,673	1,15707		0,8308	0,000236
	12 h	-2,447	0,908158		0,7257	0,173007		12 h	1,250	1,053449		0,187	0,387462
	24 h	-1,847	0,930681		0,5215	0,238066		24 h	0,593	1,025371		0,2603	0,618767
	48 h	-3,160	0,881381		0,8705	0,116062		48 h	1,460	1,062429		0,4209	0,026238
	72 h	-1,397	0,947573		0,5676	0,362977		72 h	0,837	1,035775		0,6681	0,070819

Tabela 26. Zmiany poziomu ekspresji genu referencyjnego *ARF* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Różnica	Zmiana	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Różnica	Zmiana	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
		po inokulacji ( <i>ARF</i> ) T-0h	po inokulacji ( <i>ARF</i> ) T/0h						po inokulacji ( <i>ARF</i> ) T-0h	po inokulacji ( <i>ARF</i> ) T/0h			
PI578204	0 h			0,7637			Thatcher	0 h			0,74081		
	6 h	4,393	1,185843		0,4572	0,00595		6 h	1,507	1,066159		0,6732	0,214478
	12 h	1,713	1,072476		0,5496	0,115616		12 h	-0,080	0,996487		0,3219	0,886113
	24 h	2,263	1,095742		0,9378	0,100236		24 h	5,853	1,257026		0,5544	0,016562
	48 h	2,207	1,093345		0,9623	0,112441		48 h	2,237	1,098214		0,4045	0,151155
	72 h	3,360	1,142132		0,4517	0,014911		72 h	3,810	1,167301		0,9198	0,006866
PI578212	0 h			0,99312			Thatcher+ Lr19	0 h			0,99594		
	6 h	1,367	1,052931		0,3265	0,058863		6 h	-0,757	0,970304		0,5142	0,310941
	12 h	-0,430	0,983346		0,3852	0,692711		12 h	0,237	1,009288		0,4033	0,789801
	24 h	0,017	1,000645		0,2952	0,987173		24 h	-0,810	0,96821		0,3888	0,458986
	48 h	0,750	1,029047		0,2155	0,425128		48 h	-1,150	0,954867		0,637	0,168028
	72 h	1,277	1,049445		0,2275	0,157757		72 h	0,830	1,032575		0,3988	0,534845
PI614023	0 h			0,75388			Thatcher+ Lr24	0 h			0,77514		
	6 h	-0,617	0,97443		0,488	0,595532		6 h	1,197	1,045832		0,6649	0,37884
	12 h	-0,077	0,996821		0,8702	0,912761		12 h	-2,800	0,892761		0,1848	0,011186
	24 h	3,243	1,134485		0,5584	0,046911		24 h	-0,970	0,962849		0,7714	0,28793
	48 h	0,437	1,018106		0,8709	0,590677		48 h	-2,283	0,912549		0,3429	0,026485
	72 h	1,053	1,043677		0,5726	0,133678		72 h	-1,597	0,938848		0,9815	0,151659
PI675464	0 h			0,71963			Thatcher+ Lr26	0 h			0,97026		
	6 h	1,033	1,045137		0,4025	0,557968		6 h	-0,950	0,962886		0,7034	0,491254
	12 h	-1,380	0,93972		0,459	0,051192		12 h	-2,313	0,909624		0,7749	0,150746
	24 h	4,410	1,192632		0,4966	0,001576		24 h	-0,550	0,978513		0,3363	0,637796
	48 h	0,813	1,035527		0,3292	0,364306		48 h	-0,550	0,978513		0,8129	0,700899
	72 h	2,653	1,1159		0,3384	0,060128		72 h	-1,427	0,944264		0,589	0,297185
PI675466	0 h			0,76731			Thatcher+ Lr38	0 h			0,79997		
	6 h	2,367	1,104489		0,5123	0,11905		6 h	0,610	1,023256		0,4785	0,427684
	12 h	1,813	1,080059		0,7751	0,171605		12 h	-0,690	0,973694		0,8921	0,092998
	24 h	3,707	1,16365		0,8319	0,009749		24 h	-0,400	0,98475		0,6911	0,405216
	48 h	2,337	1,103164		0,5377	0,131399		48 h	-1,107	0,957809		0,8283	0,049019
	72 h	2,150	1,094923		0,8427	0,053555		72 h	-0,887	0,966196		0,2047	0,507813
							Thatcher+ Lr63	0 h			0,75579		
								6 h	-2,320	0,915493		0,3435	0,254158
								12 h	-2,820	0,89728		0,3707	0,184523
								24 h	-1,890	0,931156		0,6622	0,395764
								48 h	-1,483	0,945969		0,876	0,551412
								72 h	-2,693	0,901894		0,4555	0,212432

Tabela 27. Zmiany poziomu ekspresji genu referencyjnego *TUB* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Genotyp	Czas	Różnica po inokulacji ( <i>TUB</i> ) T-0h	Zmiana po inokulacji ( <i>TUB</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta	Genotyp	Czas	Różnica po inokulacji ( <i>TUB</i> ) T-0h	Zmiana po inokulacji ( <i>TUB</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa-Smirnowa	Test Levene'a	Test t-Studenta
89d1	0 h			0,96178			109f3	0 h			0,23371		
	6 h	0,040	1,001427		0,2606	0,983446		6 h	0,577	1,020348		0,3027	0,606489
	12 h	-0,733	0,973834		0,3746	0,717953		12 h	-1,653	0,941661		0,4435	0,002073
	24 h	-3,277	0,883088		0,6976	0,205094		24 h	-0,943	0,966714		0,4702	0,006766
	48 h	-1,357	0,951594		0,3188	0,50635		48 h	-1,333	0,952952		0,6403	0,002487
	72 h	-0,573	0,979543		0,1909	0,762001		72 h	-1,510	0,946718		0,4421	0,00373
94a1	0 h			0,9963			109f31	0 h			0,24794		
	6 h	-1,897	0,935546		0,6338	0,257484		6 h	-2,117	0,928772		0,2042	0,139648
	12 h	-0,647	0,978024		0,7035	0,437157		12 h	-3,907	0,868536		0,6661	0,047532
	24 h	-2,900	0,90145		0,7218	0,054898		24 h	-2,427	0,91834		0,2681	0,107884
	48 h	-3,197	0,891368		0,6	0,059965		48 h	-2,947	0,900841		0,2368	0,06434
	72 h	-2,530	0,914024		0,3233	0,016984		72 h	-2,623	0,911722		0,2676	0,089393
114a1	0 h			0,1163			130c4	0 h			0,81329		
	6 h	-0,530	0,981676		0,3861	0,873538		6 h	1,707	1,065041		0,1989	0,168562
	12 h	-2,320	0,919788		0,4287	0,502252		12 h	0,847	1,032266		0,2405	0,196937
	24 h	-2,613	0,909646		0,3833	0,449759		24 h	0,320	1,012195		0,2593	0,750362
	48 h	-2,973	0,897199		0,4404	0,400006		48 h	0,820	1,03125		0,2729	0,255393
	72 h	-2,860	0,901118		0,3648	0,410788		72 h	0,827	1,031504		0,4533	0,065356
130b7	0 h			0,92502			KWS Carusum	0 h			0,84947		
	6 h	-0,273	0,990608		0,8447	0,678564		6 h	0,157	1,005673		0,92	0,904388
	12 h	-3,403	0,88306		0,5004	0,012522		12 h	-2,490	0,909837		0,835	0,076811
	24 h	-1,813	0,937693		0,599	0,014836		24 h	-0,287	0,98962		0,465	0,763616
	48 h	-1,637	0,943764		0,613	0,021116		48 h	-0,527	0,980929		0,3101	0,56357
	72 h	0,160	1,005498		0,3021	0,901958		72 h	-0,390	0,985878		0,2373	0,658425
106b1	0 h			0,12456			Mantra	0 h			0,44203		
	6 h	-2,793	0,909317		0,7843	0,007406		6 h	2,480	1,094741		0,787	0,016085
	12 h	-5,043	0,836273		0,9921	0,000268		12 h	-0,483	0,981536		0,5107	0,55467
	24 h	-3,750	0,87826		0,2683	0,000225		24 h	0,080	1,003056		0,8649	0,898941
	48 h	-3,653	0,881398		0,8017	0,000589		48 h	0,760	1,029033		0,7023	0,390133
	72 h	-3,230	0,895141		0,5818	0,004058		72 h	0,733	1,028015		0,5799	0,52274

Tabela 28. Zmiany poziomu ekspresji genu referencyjnego *TUB* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Odmiana	Czas	Różnica po inokulacji ( <i>TUB</i> ) T-0h	Zmiana po inokulacji ( <i>TUB</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa- Smirnowa	Test Levene'a	Test t- Studenta	Odmiana	Czas	Różnica po inokulacji ( <i>TUB</i> ) T-0h	Zmiana po inokulacji ( <i>TUB</i> ) T/0h	Test Kolmogorowa- Smirnowa	Test Levene'a	Test t- Studenta
PI578204	0 h			0,96328			Thatcher	0 h			0,92877		
	6 h	0,257	1,009241		0,6303	0,82788		6 h	1,600	1,059613		0,2375	0,525397
	12 h	-0,940	0,966155		0,3644	0,397136		12 h	-1,713	0,936165		0,4879	0,047137
	24 h	-0,020	0,99928		0,9529	0,989116		24 h	4,297	1,160084		0,5878	0,046736
	48 h	0,297	1,010682		0,371	0,780124		48 h	1,523	1,056756		0,7297	0,250551
	72 h	-0,380	0,986318		0,3053	0,716485		72 h	2,087	1,077745		0,8658	0,077531
PI578212	0 h			0,41949			Thatcher+ Lr19	0 h			0,88183		
	6 h	0,627	1,02197		0,4006	0,439929		6 h	0,187	1,006689		0,8976	0,809158
	12 h	-1,610	0,943555		0,6205	0,095589		12 h	-1,423	0,948997		0,8228	0,110411
	24 h	-0,473	0,983405		0,332	0,60431		24 h	-0,833	0,970139		0,8856	0,309357
	48 h	-0,197	0,993105		0,5768	0,616763		48 h	-1,097	0,960702		0,4773	0,143124
	72 h	-0,413	0,985509		0,7363	0,552619		72 h	-0,217	0,992236		0,9301	0,788123
PI614023	0 h			0,89163			Thatcher+ Lr24	0 h			0,91122		
	6 h	-0,593	0,978151		0,8783	0,300314		6 h	1,747	1,059424		0,61	0,306544
	12 h	-1,080	0,960231		0,6572	0,071897		12 h	-3,367	0,885462		0,159	0,007399
	24 h	1,460	1,053762		0,8295	0,085767		24 h	-0,983	0,966546		0,5691	0,278019
	48 h	0,573	1,021112		0,7141	0,425113		48 h	-2,373	0,919256		0,8166	0,053342
	72 h	-0,213	0,992144		0,927	0,693074		72 h	-1,943	0,933885		0,7519	0,148323
PI675464	0 h			0,73736			Thatcher+ Lr26	0 h			0,93343		
	6 h	-0,333	0,987561		0,4373	0,846185		6 h	-1,523	0,947113		0,5848	0,148323
	12 h	-3,197	0,880707		0,581	0,000175		12 h	-2,953	0,897466		0,5139	0,078115
	24 h	2,030	1,075756		0,7324	0,008007		24 h	-1,273	0,955792		0,5309	0,370489
	48 h	-0,107	0,996019		0,5834	0,873302		48 h	-1,827	0,936581		0,6339	0,238671
	72 h	1,140	1,042543		0,4866	0,283998		72 h	-1,727	0,940053		0,2995	0,208338
PI675466	0 h			0,82572			Thatcher+ Lr38	0 h			0,70043		
	6 h	1,603	1,061627		0,5421	0,279466		6 h	-1,590	0,944593		0,7827	0,004153
	12 h	0,820	1,031518		0,9609	0,433187		12 h	-0,873	0,969567		0,5867	0,111586
	24 h	2,357	1,090583		0,4966	0,025319		24 h	-1,490	0,948078		0,7754	0,014731
	48 h	1,897	1,072902		0,77	0,148613		48 h	-0,900	0,968637		0,5541	0,13495
	72 h	0,890	1,034209		0,6531	0,289437		72 h	-0,230	0,991985		0,3213	0,905585
							Thatcher+ Lr63	0 h			0,47319		
								6 h	-2,110	0,931957		0,2713	0,359227
								12 h	-2,670	0,913899		0,5203	0,300928
								24 h	-3,173	0,897667		0,4092	0,214447
								48 h	-2,583	0,916694		0,6258	0,333545
								72 h	-3,293	0,893798		0,4657	0,20835

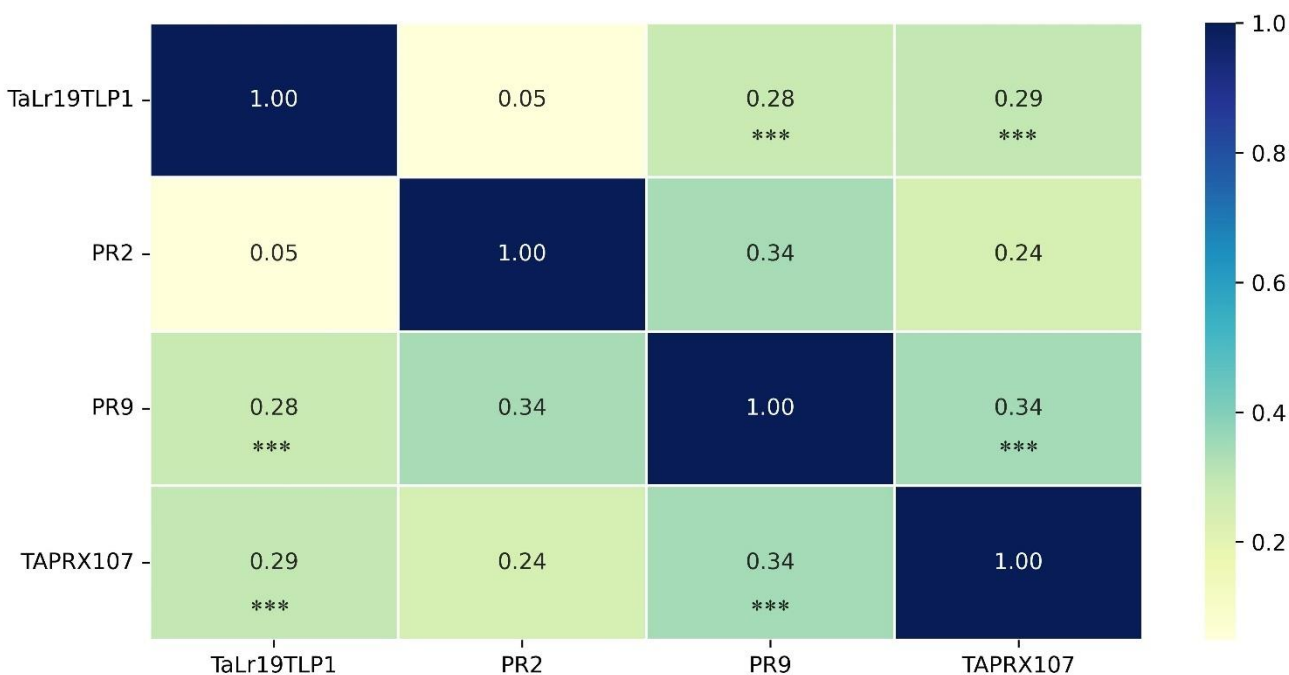
Tabela 29. Analiza Testem t-studenta dla genów referencyjnych *ARF* i *TUB*

Genotyp	Czas	Test t-Studenta (ARF i TUB)	Genotyp	Czas	Test t-Studenta (ARF i TUB)	Genotyp	Czas	Test t-Studenta (ARF i TUB)	Genotyp	Czas	Test t-Studenta (ARF i TUB)	Genotyp	Czas	Test t-Studenta (ARF i TUB)
89d1	0 h		109f3	0 h		PI578204	0 h		Thatcher	0 h		Thatcher+ Lr63	0 h	
	6 h	0,429186		6 h	0,439057		6 h	0,050546		6 h	0,388866		6 h	0,301063
	12 h	0,532702		12 h	0,192293		12 h	0,680824		12 h	0,169848		12 h	0,233728
	24 h	0,341048		24 h	0,816371		24 h	0,354535		24 h	0,018064		24 h	0,286632
	48 h	0,935583		48 h	0,456457		48 h	0,232426		48 h	0,186047		48 h	0,41741
	72 h	0,299909		72 h	0,388463		72 h	0,154361		72 h	0,005329		72 h	0,207628
94a1	0 h		109f3,1	0 h		PI578212	0 h		Thatcher+ Lr19	0 h			0 h	
	6 h	0,845882		6 h	0,984084		6 h	0,097648		6 h	0,649542			
	12 h	0,53318		12 h	0,099542		12 h	0,29142		12 h	0,412086			
	24 h	0,386459		24 h	0,344782		24 h	0,79821		24 h	0,355233			
	48 h	0,225552		48 h	0,287115		48 h	0,606699		48 h	0,118104			
	72 h	0,127178		72 h	0,161658		72 h	0,533347		72 h	0,75865			
114a1	0 h		130c4	0 h		PI614023	0 h		Thatcher+ Lr24	0 h			0 h	
	6 h	0,954788		6 h	0,192333		6 h	0,442414		6 h	0,083658			
	12 h	0,639819		12 h	0,096261		12 h	0,195679		12 h	0,000346			
	24 h	0,559331		24 h	0,486226		24 h	0,004466		24 h	0,121303			
	48 h	0,455049		48 h	0,191838		48 h	0,459286		48 h	0,008364			
	72 h	0,46625		72 h	0,06107		72 h	0,374101		72 h	0,051356			
130b7	0 h		KWS Carusum	0 h		PI675464	0 h		Thatcher+ Lr26	0 h			0 h	
	6 h	0,442235		6 h	0,762973		6 h	0,839002		6 h	0,360304			
	12 h	0,215218		12 h	0,256658		12 h	0,002283		12 h	0,099956			
	24 h	0,768817		24 h	0,19366		24 h	0,002031		24 h	0,453541			
	48 h	0,968639		48 h	0,187557		48 h	0,643093		48 h	0,407169			
	72 h	0,173892		72 h	0,368826		72 h	0,121424		72 h	0,232474			
106b1	0 h		Mantra	0 h		PI675466	0 h		Thatcher+ Lr38	0 h			0 h	
	6 h	0,020249		6 h	0,002493		6 h	0,181645		6 h	0,20084			
	12 h	0,00744		12 h	0,720226		12 h	0,258658		12 h	0,024756			
	24 h	0,008177		24 h	0,697087		24 h	0,011574		24 h	0,06026			
	48 h	0,006815		48 h	0,086393		48 h	0,135874		48 h	0,073656			
	72 h	0,030951		72 h	0,296234		72 h	0,106578		72 h	0,730762			

## 7.6.6 Analiza korelacji

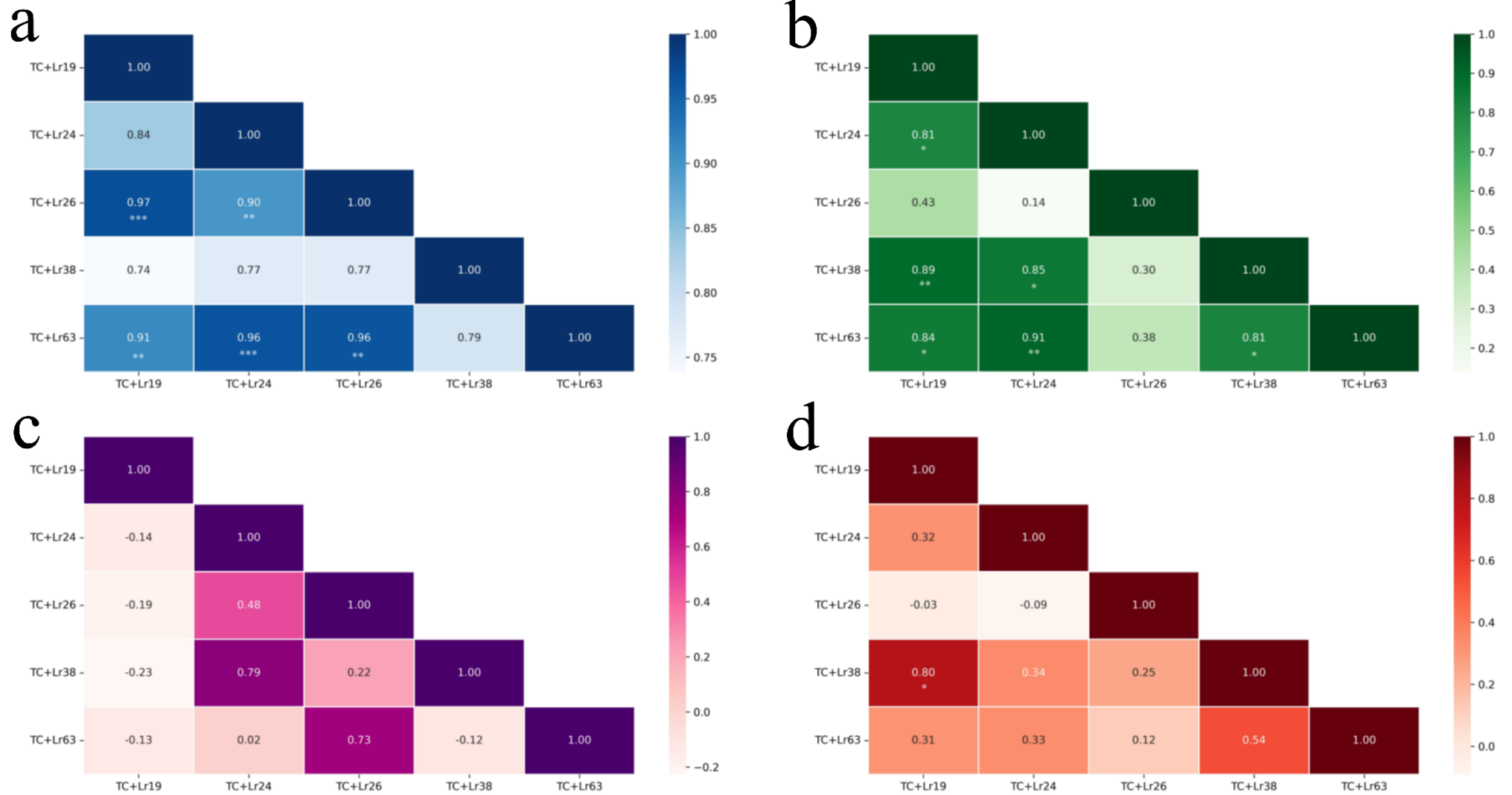
Dodatkowo przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy poszczególnymi genami badanymi (Rycina 14) Najwyższy współczynnik korelacji o wartości 0,34 wystąpiły między genami: PR9 i *TaPrx107* ( $p < 0,001$ ) oraz PR9 i PR2. Podobne poziomy uzyskano pomiędzy analizowanymi genami *TaLr19TLP1* i *TaPrx107* ( $p < 0,001$ ), *TaLr19TLP1* i PR9 ( $p < 0,001$ ) oraz PR2 i *TaPrx107*. Jednak uzyskane wartości wskazują na niską korelację lub jej brak w obrębie badanych genów.

Rycina 14. Analiza korelacji Pearsona między badanymi genami \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$



Ponadto przeprowadzono analizę korelacji Pearsona dla poszczególnych genów w odniesieniu do linii izogenicznych Thatcher (Rycina 15). W obrębie analizowanego genu *TaLr19TLP1* (Rycina 15a) pozytywna korelacja (0,96 i 0,97;  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ) występuje pomiędzy genotypami: TC+Lr19 i TC+Lr26, TC+Lr24 i TC+Lr26, TC+Lr26 i TC+Lr63. W pozostałych kombinacjach korelacja osiąga równie wysokie wartości  $\sim 0,8$ , świadczące o wzajemnych zależnościach. Analiza współczynnika korelacji dla genu PR2 (Rycina 15b) wykazała największe wartości dla następujących linii izogenicznych: TC+Lr19, TC+Lr63, TC+Lr38, TC+Lr24 osiągając poziom  $> 0,8$ . Brak korelacji wystąpił pomiędzy genotypami: TC+Lr19, TC+Lr24, TC+Lr26, TC+Lr38. W obrębie genu *TaPrX107* (Rycina 15c) najsilniejsza korelacja wystąpiła między liniami TC+Lr24 i TC+Lr38 oraz TC+Lr26 i TC+Lr63. U pozostałych nie wykazano wspólnych zależności. Dla genu PR9 (Rycina 15d) najwyższą korelację obserwujemy dla linii TC+Lr19 i TC+Lr38 (0,80;  $p < 0,05$ ).

Rycina 15. Analiza korelacji Pearsona między liniami izogenicznymi w obrębie badanych genów a) *TaLr19TLP1* b) PR2 c) *TaPrx107* d) PR9 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$



## 8. Dyskusja

Wprowadzona przez Komisję Europejską polityka Green Deal (Europejski Zielony Ład), określa cel, którym jest osiągnięcie neutralności klimatycznej do 2050 roku, a także zakłada zmniejszenie zużycia chemicznych środków ochrony roślin o 50%. Postępujące w szybkim tempie zmiany klimatyczne i degradacja środowiska to kluczowe wyzwania dla współczesnego świata. Zrównoważone rolnictwo jako działania ograniczające wpływ rolnictwa na środowisko mają kluczowe znaczenie, a o jego potencjale decyduje między innymi postęp biologiczny.

Określenie w jaki sposób przechodził proces udomawiania roślin oraz selekcja, wiąże się z przepływem genów i ma kluczowe znaczenie dla obszaru hodowli odpornościowej. Pszenica jest gatunkiem alloheksaploidalnym, powstałym w wyniku hybrydyzacji 3 genomów diploidalnych (Venske i in., 2019). Długa historia uprawy pszenicy doprowadziła do powstania ogromnej różnorodności genetycznej w obrębie gatunków udomowionych, dzikich, populacji miejscowych, elitarnych odmian, ponadto podobne genomy występują w gatunkach u różnych poziomach ploidalności. Takie zbiory przechowywane w bankach genów, umożliwiają prowadzenie badań dotyczących ewolucji i polimorfizmów w obrębie genów (Krattinger i Keller, 2016).

Gatunki diploidalne *T. monococcum subsp. aegiloides*, *T. monococcum subsp. monococcum* i *T. urartu* posiadają genom A, który jest jednym z subgenomem pszenicy zwyczajnie (Venske i in., 2019). Geny z tych gatunków mogą być wprowadzane do pszenicy za pomocą bezpośredniego krzyżowania i rekombinacji genetycznej. Udomowienie pszenicy *T. monococcum ssp. aegilopoides* miało miejsce w rejonie góry wulkanicznej Karaca Dağ (Karacadag), obecnie zlokalizowanej w południowo wschodniej Turcji. Dzika forma pszenicy była zbierana, następnie transportowana do dalszych regionów i tam uprawiana. Transport wiązał się z migracją rolników lub handlem na inne dobra materialne, ponieważ nie wszystkie gleby na obszarze „Żywnego Półksiężyca” były odpowiednie do upraw. Kierunki rozpowszechniania obejmowały obszary dzisiejszej Turcji, Iraku, Syrii i Iranu. W późniejszych fazach ewolucji rolniczej, rośliny eksportowane były w początkowych procesach udomowienia (Kilian i in., 2007). Na krótkim ramieniu chromosomu 3A zlokalizowany jest tylko jeden gen odporności na rdzę brunatną *Lr63* (Kolmer i in., 2010). Według badań Kolmer i in. (2010) rośliny z pojedynczym genem charakteryzowały się średnim poziomem odporności, jednak w połączeniu z innymi genami wykazano odporność na wyższym poziomie. Dodatkowo w obrębie *locus* genu odporności znajdują się QTL kontrolujące spoczynek nasion (Nakamura i in., 2011; L. Zhang i in., 2010). Wymienione wyżej cechy agronomiczne są częścią udomowienia, można zatem stwierdzić, że presja selekcyjna mogła znacząco wpłynąć na ten region chromosomu. W analizach struktury chromosomu 3A, wykonanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, wykazano obecność produktów amplifikacji dwóch markerów sprzężonych z genem *Lr63* (*Xbarc321*

i *Xbarc57*), a także dodatkowe sygnały hybrydyzacji sondy pTa-535 u odmian udomowionych diploidalnych pszenic *T. monococcum* pochodzących z regionu udomowienia *T. monococcum* (Turcja), a także Europie Środkowej (Węgry, była Czechosłowacja i Albania) oraz Gruzji. Formy te były bardziej podatne na selekcje i wykazywały pożądane cechy udomowienia. Według Anker i Niks, (2001) formy udomowione *T. monococcum* są bardziej odporne na rdzę brunatną w porównaniu do formy dzikiej oraz *T. urartu*.

Gatunki obce stanowią dodatkowe źródło genów do ulepszania odmian pszenicy. Potencjał do poprawy odporności pszenicy na choroby mają wieloletnie gatunki płemienia Triticeae w tym *Thinopyrum elongatum*, *Thinopyrum intermedium* oraz *Secale cereale*. Do tej pory kilka ważnych cech zostało przeniesionych poprzez substytucje, addycje i translokacje. Translokacje chromosomowe są skuteczną metodą przenoszenia genów, jednak wiele z nich dotąd nie zostało wykorzystanych w odmianach. Jednym z przykładów jest gen *Pm12* nadający odporność na mączniaka prawdziwego. Zlokalizowany na chromosomie 6S *Ae. speltoides* został wprowadzony do pszenicy poprzez translokację T6BS-6SS-6SL, która niestety skutkuje negatywną korelacją z cechami agronomicznymi (Song i in., 2007; Tang i in., 2014). Z gatunku *Thinopyrum* cztery geny przeniesiono do pszenicy: *Lr19*, *Lr24*, *Lr29* i *Lr38*, natomiast wskaźnik rekombinacji między chromosomami z gatunków obcych i chromosomami pszenicy jest niski (Xu i in., 2023). Translokacja 7DL.Ag niosąca gen *Lr19* związana jest dodatkowo ze zwiększonym plonem ziarna (Gupta i in., 2006). Wprowadzenie ramieniu krótkiego chromosomu 1RS pochodzącego z żyta niesie ze sobą geny odporności *Lr26/Yr9/Sr31/Pm8*, a także związane jest ze zwiększoną biomasa i wysokimi plonami pszenicy, jednak negatywnie wpływa na cechy jakościowe podczas produkcji chleba, ze względu na obecność genu sekaliny *Sec-1* i utraty loci *Glu-B3/Gli-B1* (Sharma i in., 2018). Mieszanie międzygatunkowe często wykazują niestabilność genomu, mechanizm tego zjawiska nie jest do końca poznany. Niestabilność może skutkować zmniejszoną koniugacją w mejozie jednego z genomów rodzicielskich, powodując stopniową eliminację z hybrydy (Perničková i in., 2019).

Liczne analizy dotyczące analizy ras *P. triticinia* wskazują na wysoki poziom różnorodności patogenicznej na całym świecie. Efektywność genów odporności zależna jest od składu populacji patogenów, z uwagi na dynamiczne zmiany, pojawianie się nowych patotypów, odporność danej odmiany pszenicy nie jest cechą stałą. Posiadając pojedynczy gen odporność może być przełamana w krótkim czasie, bardziej trwałą odporność możemy osiągnąć poprzez włączanie kilku genów *Lr* do danego genotypu (Vida i in., 2009).

W ramach powyższej pracy doktorskiej podjęto próbę: piramidyzacji genów: *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr38*, *Lr63* w dwóch odmianach pszenicy jarej; opracowania metody multilplex PCR dla powyższych genów; badania markerów związanych z loci *Lr63*; badania cytogenetycznego genotypów niosących geny warunkujących odporność na rdzę brunatną; analizy poziomu ekspresji

genów związanych z odpowiedzią na infekcję.

Z sukcesem opracowano 6 protokołów multiplex dla genów *Lr19* (*Xwmc221*), *Lr24* (*Sr24#12*), *Lr26* (*P6M12*) i *Lr38* (*Xwmc773*). Optymalizacja powyższych reakcji jest złożoną procedurą, która opiera się głównie na metodzie prób i błędów. Do tej pory nieliczne prace opisują proces przygotowania protokołów multiplex PCR (Chamberlain i Chamberlain, 1994; Henegariu i in., 1997). Reakcje te są szeroko stosowane w hodowli roślin do m.in. charakterystyki plazmy zarodkowej i MAS (Yap i in., 2016), identyfikacji organizmów zmodyfikowanych genetycznie (Bak i Emerson, 2019) oraz testów patologicznych (Otti i in., 2016). Szybkość metody oraz zredukowane koszty badań sprawiają, że metoda ta jest korzystna. Do tej pory opracowano kilka protokołów umożliwiających jednoczesne analizy genów odporności na rdzę brunatną. Sumíková i Hanzalová (2010) opracowały protokół do wykrywania genów *Lr26* i *Lr37*. W ramach badań Aybeke (2015) opisywał próbę uzyskania protokołu do identyfikacji genów: *Lr9*, *Lr19*, *Lr24* i *Lr28*. Z sukcesem otrzymano jedynie reakcję, w ramach której możliwa jest identyfikacja genów *Lr19*, *Lr24* i *Lr28*, gdyż produkt amplifikacji markera sprzężonego z genem *Lr9* był zbliżony do produktu *Lr28*. W powyższej rozprawie doktorskiej do analizy genu *Lr38* wykorzystywano sprzężone markery *Xwmc773* oraz *Xbarc273*, jednak wielkości produktu amplifikacji markera *Xbarc273* oraz markerów sprzężonych z genem *Lr63* są zbyt podobne do pozostałych długości wykorzystywanych markerów, co uniemożliwiło zaprojektowanie wspólnych protokołów. Większa ilość starterów w reakcji PCR zwiększa ryzyko uzyskania niespecyficznego produktu amplifikacji, głównie spowodowane tworzeniem się dimerów starterów (Brownie i in., 1997). Podczas analiz markera sprzężonego z genem *Lr24* amplifikowały produkty niespecyficzne, wyróżnione bardziej niż pożądaný produkt, prowadząc do zużycia składników reakcji i powodując zaburzenia w przyłączaniu oraz wydłużaniu starterów. Dlatego optymalizacja protokołów multiplex PCR prowadzi do zminimalizowania niespecyficznego produktu. Tomkowiak i in. (2021) do analiz otrzymanych kolekcji pszenic zaprojektowali reakcję multiplex PCR dla genów APR: *Lr34* i *Lr46* odpowiedzialnych za odpowiedź na reakcję patogenu w stadium dorosłej rośliny. Wykorzystanie markerów sprzężonych z genami głównymi oraz genami APR do jednoczesnej analizy zaprojektowali Lata i in. (2022). Do reakcji zastosowano marker *Sr24#50* sprzężony z genem *Lr24* oraz *csGS* sprzężony z genem *Lr68*. Powyżej opisywane reakcje multiplex PCR wykorzystują markery, które są związane z efektywnymi genami odporności i mogą być z powodzeniem stosowane w programach hodowlanych.

Genom pszenicy ze względu na swoją złożoność, obecność elementów transpozycyjnych oraz występujących powtórzeń stawia przed naukowcami wiele wyzwań. Analizy genomu prowadzone przez Międzynarodowe Konsorcjum Sekwencjonowania Genomu Pszenicy (IWGSC, ang. *International Wheat Genome Sequencing Consortium*) ujawniły łącznie 88733 homologicznych genów wśród subgenomów A, B i D. W 2018 roku Konsorcjum przedstawiło genom pszenicy tym

samym udostępniając lokalizacje 107897 genów (Alonge i in., 2020; IWGSC i in., 2018). Do tej pory liczba sklonowanych genów warunkujących odporność na rdzę brunatną jest ograniczona, optymistyczne perspektywy przewidują, że w ciągu najbliższych 15 lat możliwe będzie sklonowanie większości genów, jednak może być to spore wyzwanie. W szczególności wyzwaniem są geny odporności pochodzące z gatunków pokrewnych, gdzie rekombinacja w regionach obejmujących obce introgresje jest tłumiona (Kumar i in., 2022). Klonowanie genów *Lr* niezbędne jest do dywersyfikacji kombinacji genów w celu uzyskania trwałej odporności, a brak sekwencji danych genów jest czynnikiem limitującym dokładniejsze poznanie mechanizmów odpornościowych (Li i in., 2023). U roślin podczas niekompatybilnej interakcji gen (R) rozpoznaje cząsteczki efektorowe inicjując dalszą odporność w tym zwiększoną ekspresję genów PR (Jain i Khurana, 2018). Białka PR wytwarzane przez rośliny w odpowiedzi na infekcję patogenem są częścią mechanizmu obronnego. W powyższej pracy przeprowadzono analizę ekspresji genów PR2, PR5, PR9 i PRA2 związanych z obroną podczas pierwszych etapów infekcji *Puccinia triticinia* u 2 odmian pszenicy jarej: Mantra, KWS Carusum; podatnej formie Thatcher; liniach izogenicznych Thatcher + Lr19, Thatcher + Lr24, Thatcher + Lr26, Thatcher + Lr38, Thatcher + Lr63; formach niosących translokacje z genami odporności: PI578204, PI578212, PI614023, PI675464, PI675466 oraz pokoleniu F<sub>3</sub> z piramidyzacją genów R uzyskanych mieszańców: 94a1, 114a1, 89d1, 106b1, 130c4, 130b7, 109f3, 103f31.

Infekcja *P. triticinia* następuje poprzez wniknięcie do tkanek liści pszenicy przez aparaty szparkowe, urediniospory kielkują na powierzchni liścia tworząc apressorium w ciągu 3 godzin po kontakcie z organizmem żywiciela. W kolejnych godzinach wnika do tkanki poprzez strzępkę infekcyjną. Po kontakcie z komórkami w środkowej warstwie tkanki liściowej około 12 godzin po infekcji rozpoczyna się różnicowanie komórek haustorium. W 24 godzinie utworzone ssawki pobierają substancje pokarmowe z organizmu żywiciela (Casassola i in., 2015).

Białka PR5 wykazują kluczową rolę w tolerancji na stres biotyczny i abiotyczny (Das i in., 2011), ulegają ekspresji w wielu organach, mogą być zlokalizowane w cytoplazmie, wakuolach lub być wydzielane na zewnątrz komórki, Gen *TaLr19TLP1* ulega ekspresji w korzeniach, łodygach, a także liściach pszenicy, traktowanie liści MeJa, SA, ABA indukuje akumulację transkryptu. W swoich badaniach Y. Zhang i in. (2017) w transformowanych komórkach zidentyfikowali białko *TaLr19TLP1-GFP* w apoplazmie. Białko PR5 w tytoniu indukowane stresem abiotycznym oraz biotycznym, oraz jego homologi w pomidorach i ziemniakach wykazywały wysokie poziomy ekspresji, natomiast nadekspresja białka u tytoniu skutkowałą zwiększoną odpornością (Zhang i in., 2019). Ekspresja genu *TaLr19TLP1* wykazywała zwiększony poziom podczas niezgodnej interakcji, zgodna interakcja charakteryzowała się niskimi wartościami (Nawrot i in., 2021). Analizy transkryptów u roślin z wyciszonym genem *TaLr19TLP1* prowadzone przez Zhang i in. (2017) wykazały, że reakcja odporności hamuje wzrost i rozwój grzybów. Badania białka PR5 *ObTLP1*

u *O. basilicum* po infekcji *S. sclerotiorum* wykazywały podobne wzorce jak u pszenicy (Misra i in., 2016). Jednak w obu badaniach po traktowaniu MeJA obserwowano nagły wzrost w 6 hpi, a w dalszych godzinach powolne obniżenie poziomu ekspresji. Analizowane genotypy w powyższej pracy doktorskiej charakteryzowały się stałym wzorcem, potwierdzonym w testach statystycznych, gdzie w 6 hpi następował nagły wzrost poziomu ekspresji, a następnie nagły spadek wartości. Punkt czasowy 48 hpi charakteryzował się ponownie skokiem poziomu ekspresji. Wyjątkiem był mieszaniec, 130c4 charakteryzujący się piramidyzacją genów: *Lr19*, *Lr24*, *Lr38* oraz *Lr63* u którego po nagłym wzroście w 6 hpi, spadek następował stopniowo.

Białko PR2, należy do grupy enzymów, które w reakcji na stres regulują odkładanie kalozy.  $\beta$ -1,3-glukanaza może hydrolizować  $\beta$ -1,3-glukany zlokalizowane w ścianie komórkowej grzybów. Degradacja ściany komórkowej oraz jej dezorganizacja prowadzi do śmierci patogenu (Farrakh i in., 2018). Prasad i in. (2019) analizowali poziom ekspresji genu PR2 w linii podatnej oraz odpornej z genem *Lr24* po inokulacji patogenem *Pt*. Poziom ekspresji w niezgodnej interakcji w porównaniu z interakcją zgodną był wyższy podczas początkowych godzin (do 3 hpi) a także późniejszych: od 24 do 48 godzin po inokulacji, natomiast w 6 i 12 godzinie poziomy były niższe. U roślin zainfekowanych patogenem *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) odpowiedź była odwrotna, to rośliny podatne wykazywały wyższe wartości ekspresji PR2 w 6 hpi w porównaniu do roślin odpornych (Lata i in., 2022). Badania poziomu  $\beta$ -1,3-glukanazy u *Cajanus caja* po infekcji patogenem *Fusarium udum* u odmian odpornych w 2 i 24 hpi obserwowano poziom najwyższy, u odmian podatnych gen ulegał ekspresji później i w mniejszym stopniu (Patil i in., 2021). Podobne wzorce obserwowano u kukurydzy podczas infekcji *Fusarium verticillioides* (Lanubile i in., 2012). Analizy mieszańców oraz pozostałych genotypów wskazują, że poziom ekspresji badanego genu PR2 osiągał swoje maksymalne wartości przed inokulacją oraz 6 hpi, natomiast spadki od 12 do 24 hpi. Wysokie wartości tuż po zastosowaniu stresu, świadczą o działaniu  $\beta$ -1,3-glukanazy we wczesnych etapach infekcji, katalizując hydrolizę wiązań 1,3- $\beta$ -D-glikozydowych osłabiając ściany patogenu, zapobiegając tworzeniu ssawek. Genotypy Thatcher oraz Thatcher + *Lr24* charakteryzowały się niskimi poziomami ekspresji tego genu, co może świadczyć o interakcji zgodnej. Kumulacje genów R w przeprowadzonych analizach sugerują zwiększony poziom ekspresji w początkowych fazach po infekcji patogenem w porównaniu do linii izogenicznych z pojedynczymi genami *Lr* oraz linii podatnej.

Peroksydazy (PRA2 i PR9) to szeroka grupa enzymów katalizujących redukcję nadtlenu. Białka te odgrywają kluczową rolę w tworzeniu bariery wzmacniając ścianę komórkową, w celu zapobiegnięcia rozprzestrzeniania się patogenu (Lata i in., 2022). Geny zaangażowane w wybuch oksydacyjny są silnie indukowane już w szóstej godzinie po interakcji z patogenem. U roślin podatnych i odpornych obserwowana jest pierwsza reakcja w ciągu kilku minut, natomiast druga

reakcja następuje w ciągu kilku godzin od infekcji tylko u roślin odpornych (Farrakh i in., 2018). W badaniach Prasad i in. (2019) inokulacja patogenem *Pt* u roślin podatnych powodowała wzrost ekspresji PR9 na wczesnych etapach i spadek od 12 godziny, podczas gdy genotyp odporny charakteryzował się stabilnym profilem ekspresji we wszystkich punktach czasowych. Infekcja pszenicy patogenem *Pst* w interakcji niekompatybilnej powodowała znaczący wzrost w początkowych fazach infekcji, po czym obserwowano spadek w 12 i 24 godzinie. Ponowny wysoki poziom identyfikowano w 48 hpi związany z drugim wybuchem oksydacyjnym (Lata i in., 2022). W badanych genotypach u odmiany podatnej Thatcher poziom ekspresji był stały po pierwszej odpowiedzi genu PR9. Największą odpowiedź obserwowano u linii Thatcher + Lr26, jego początkowa ekspresja oraz tuż po infekcji była 40 krotnie wyższa od linii podatnej. Mieszańce, u których doszło do piramidyzacji genów charakteryzowały się podobnym profilem, w którym obserwowano wzrost w 6 hpi, spadek w następnych godzinach oraz ponowny wzrost w 24 i 48 hpi, co może świadczyć o drugiej reakcji w odpowiedzi na infekcję patogenem. Badania PRA2 wykazują podobne wzorce profilów ekspresji u Dmochowska-Boguta i in. (2013) do reakcji genu PR9. W odpornych (Thatcher + Lr9 i Thatcher + Lr26) liniach druga reakcja na infekcję w 48 hpi następowała tuż po pierwszej reakcji w 6 hpi. Jednak wykazano, że w linii Thatcher + Lr26 aktywność oksydazy NADPH ma większą rolę niż peroksydaza podczas infekcji *Pt*. Może być to związane z translokacją pochodzącą z żyta, a wzorzec odpowiedzi może być podstawową odpornością żyta przeniesionego do pszenicy (Dmochowska-Boguta i in., 2013). Poziom ekspresji genu PRA2 badanego przez Prasad i in. (2019) w odpowiedzi na stres wywoływany patogenem *Pt* u roślin podatnych był wysoki w porównaniu z roślinami odpornymi. Prowadzone badania na mieszańcach wykazały, że ekspresja poziomu genów PR9 i PRA2 podczas pierwszej reakcji na patogen jest większa niż w liniach z pojedynczym genem odporności.

W powyżej rozprawie doktorskiej przeanalizowano poziom ekspresji czterech genów białek PR w genotypach z pojedynczymi genami *Lr* oraz z piramidyzacją genów R po infekcji patogenem *Pt*. Analizy ekspresji genów wykazały, że poziom transkryptów PR2, PR9 był wyższy u roślin z piramidyzacją genów w porównaniu z linią Thatcher, gen PRA2 ulegał znacznym wahaniom, natomiast poziom ekspresji genu PR5 u roślin z większą ilością genów R, wiązał się z niższą wartością od genotypu Thatcher. Różne szlaki sygnałowe mogą regulować geny odporności, które oddziałują na siebie w celu uzyskania odporności. Poziomy ekspresji badanych genów różniły się znacząco w obrębie punktów czasowych oraz między liniami z genami *Lr*. Wskazywać to może, że odporność nadawana przez gen główny (*Lr*) wynika z działania różnych genów związanych z obroną, które mogą być regulowane przez szlaki sygnałowe. Białka PR są obiecującymi kandydatami w odpowiedzi obronnej roślin, wykazując udział w stresach biotycznych i abiotycznych. Jednak wymagają dalszego poznania wzajemnych interakcji oraz oddziaływania z genami.

## 9. Podsumowanie i wnioski

Badania nad genetycznymi mechanizmami odporności pszenicy są istotne, szczególnie w kontekście Europejskiego Zielonego Ładu, który promuje zrównoważone rolnictwo i redukcję chemicznych środków ochrony roślin. W niniejszej pracy analizie poddano różnorodność genetyczną pszenicy, jej udomowienie oraz rolę genów odpornościowych w hodowli odmian odpornych na choroby, takie jak rdza brunatna. Analiza procesu udomowienia pszenicy, w tym przepływu genów, ma kluczowe znaczenie dla hodowli odpornościowej. Różne gatunki pszenicy i pokrewne rośliny z rodziny Triticeae, jak również gatunki diploidalne, stanowią cenne źródło genów odpornościowych. Proces ten jest wspomagany przez zaawansowane techniki genetyczne, takie jak translokacje chromosomowe i multipleks PCR, które umożliwiają identyfikację i przenoszenie pożądanych genów do uprawianych odmian. Analizy cytogenetyczne oraz molekularne wskazują, że istnieje związek między wielkością translokacji a jej dziedziczeniem. Małe translokacje przekazywane są w sposób bardziej stabilny, w przeciwieństwie do większych translokacji, które mogą prowadzić do niepłodności lub zaburzenia w rozwoju roślin potomnych. Jednak dziedziczenie jest procesem złożonym, na którego wpływ mogą mieć czynniki genetyczne i środowiskowe. Dodatkowo optymalizacja metod multipleks PCR, umożliwiająca jednoczesną analizę kilku genów odporności, jest ważnym krokiem w programach hodowlanych, pozwalając na efektywną selekcję odmian o wysokiej odporności na patogeny. Badania nad ekspresją genów PR (ang. *Pathogenesis-Related*) wykazują ich kluczową rolę w obronie roślin przed infekcjami, szczególnie w odpowiedzi na stres biotyczny. Wprowadzenie kilku genów odporności jednocześnie (piramidyzacja genów) zwiększa skuteczność obrony roślin. Badania nad ekspresją genów warunkujących odporność u różnych genotypów pszenicy wskazują na złożoność reakcji obronnych i potencjalne korzyści wynikające z kumulacji genów R, co sugeruje kierunek przyszłych badań w kontekście rozwijania zrównoważonego rolnictwa.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Piramidyżacja genów głównych *Lr*, zwłaszcza kombinacje z genami *Lr24* i *Lr26*, mają wpływ na podwyższenie poziomu odporności roślin na infekcję patogenem *P. triticinia*.
2. Opracowanie i optymalizacja protokołów PCR multipleks dla analizy genów odpornościowych (*Lr19*, *Lr24*, *Lr26* i *Lr38*) są istotne dla skutecznego monitorowania i selekcji genotypów w hodowli pszenicy. Metoda ta jest korzystna ze względu na szybkość i redukcję kosztów badań.
3. Jednoczesna identyfikacja obcych segmentów chromatyny za pomocą metody GISH umożliwia śledzenie wielkości dziedziczonych fragmentów.
4. Im większa translokacja tym częściej dochodzi do eliminacji fragmentów pochodzących z obcych gatunków.
5. Polimorfizmy krótkiego ramienia chromosomu 3A pszenic diploidalnych, spowodowane są rozproszeniem geograficznym i adaptacją do lokalnych warunków środowiska.
6. Do identyfikacji obecności genu *Lr63* możliwe jest wykorzystanie sprzężonych markerów molekularnych *Xbarc57* i *Xbarc321*.
7. Geny *ARF* i *TUB* są stabilnymi genami referencyjnymi dla metody qPCR podczas analizy pszenicy po porażeniu patogenem *P. triticinia*.
8. Poziom ekspresji genów białek PR różni się w zależności od genotypu i liczby genów R w roślinach po infekcji patogenem *Pt*.
9. Geny PR2, PRA2, PR5 i PR9 związane są z szybką reakcją odpornościową na patogen, ich najwyższe poziomy ekspresji obserwowano w 6 godzinie po infekcji.
10. Geny PR2 i PR9 wykazują wyższy poziom ekspresji u roślin z piramidyżacją genów, podczas gdy gen PR5 wykazuje niższą ekspresję w tych samych roślinach.
11. Wahania poziomu ekspresji genu PRA2 i różnice między liniami z genami *Lr* sugerują, że odporność roślinna jest regulowana przez różne szlaki sygnałowe i geny związane z obroną.
12. Wyniki pracy wskazują na konieczność dalszych badań dotyczących reakcji odpornościowej związanej z genami PR oraz ich oddziaływania z genami głównymi odporności na rdze brunatną.

## 10. Bibliografia

1. Aktar-Uz-Zaman, M., Tuhina-Khatun, M., Hanafi, M. M., & Sahebi, M. (2017). Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: An overview. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 431–445. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1304180>
2. Alonge, M., Shumate, A., Puiu, D., Zimin, A. V., & Salzberg, S. L. (2020). Chromosome-Scale Assembly of the Bread Wheat Genome Reveals Thousands of Additional Gene Copies. *Genetics*, 216(2), 599–608. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303501>
3. Anker, C. C., & Niks, R. E. (2001). Prehaustorial resistance to the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*, in *Triticum monococcum* (s.s.). *Euphytica*, 117(3), 209–215. <https://doi.org/10.1023/A:1026577307163>
4. Aybeke, M. (2015). Screening of *Lr* genes providing resistance to leaf rust in wheat using multiplex pcr method. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 16(1): 45-49, 2015
5. Bak, A., & Emerson, J. B. (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 Biotechnology*, 19(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0571-1>
6. Baker, L., Grewal, S., Yang, C., Hubbart-Edwards, S., Scholefield, D., Ashling, S., Burridge, A. J., Przewieslik-Allen, A. M., Wilkinson, P. A., King, I. P., & King, J. (2020). Exploiting the genome of *Thinopyrum elongatum* to expand the gene pool of hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 133(7), 2213–2226. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03591-3>
7. Balfourier, F., Bouchet, S., Robert, S., De Oliveira, R., Rimbart, H., Kitt, J., Choulet, F., International Wheat Genome Sequencing Consortium, BreedWheat Consortium, & Paux, E. (2019). Worldwide phylogeography and history of wheat genetic diversity. *Science Advances*, 5(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0536>
8. Banasiak, J. (2022). System odpornościowy roślin – model zygzakowy. *Postępy Biochemii*. [https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_427](https://doi.org/10.18388/pb.2021_427)
9. Brandolini, A., Vaccino, P., Boggini, G., Ozkan, H., Kilian, B., & Salamini, F. (2006). Quantification of genetic relationships among A genomes of wheats. *Genome*, 49(4), 297–305. <https://doi.org/10.1139/g05-110>
10. 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>
11. Cai, X., Jones, S. S., Murray, T. D., & Weber, W. E. (2001). Molecular cytogenetic characterization of *Thinopyrum* genomes conferring perennial growth habit in wheat-

- Thinopyrum amphiploids. *Plant Breeding*, 120(1), 21–26. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00560.x>
12. Casassola, A., Brammer, S. P., Chaves, M. S., Martinelli, J. A., Stefanato, F., & Boyd, L. A. (2015). Changes in gene expression profiles as they relate to the adult plant leaf rust resistance in the wheat cv. Toropi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.12.004>
  13. Chamberlain, J. S., & Chamberlain, J. R. (1994). Optimization of Multiplex PCRs. W K. B. Mullis, F. Ferré, & R. A. Gibbs (Red.), *The Polymerase Chain Reaction* (s. 38–46). [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0257-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0257-8_3)
  14. Conrath, U. (2006). Systemic Acquired Resistance. *Plant Signaling & Behavior*, 1(4), 179–184. <https://doi.org/10.4161/psb.1.4.3221>
  15. Crespo-Herrera, L. A., Garkava-Gustavsson, L., & Åhman, I. (2017). A systematic review of rye (*Secale cereale* L.) as a source of resistance to pathogens and pests in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Hereditas*, 154(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s41065-017-0033-5>
  16. Das, M., Chauhan, H., Chhibbar, A., Rizwanul Haq, Q. M., & Khurana, P. (2011). High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin. *Transgenic Research*, 20(2), 231–246. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9405-6>
  17. Dmochowska-Boguta, M., Nadolska-Orczyk, A., & Orczyk, W. (2013). Roles of peroxidases and NADPH oxidases in the oxidative response of wheat (*Triticum aestivum*) to brown rust (*Puccinia triticina*) infection. *Plant Pathology*, 62(5), 993–1002. <https://doi.org/10.1111/ppa.12009>
  18. dos Santos, C., & Franco, O. L. (2023). Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. *Plants*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/plants12112226>
  19. El Baidouri, M., Murat, F., Veyssiere, M., Molinier, M., Flores, R., Burlot, L., Alaux, M., Quesneville, H., Pont, C., & Salse, J. (2017). Reconciling the evolutionary origin of bread wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist*, 213(3), 1477–1486. <https://doi.org/10.1111/nph.14113>
  20. El-kereamy, A., El-sharkawy, I., Ramamoorthy, R., Taheri, A., Errampalli, D., Kumar, P., & Jayasankar, S. (2011). *Prunus domestica* Pathogenesis-Related Protein-5 Activates the Defense Response Pathway and Enhances the Resistance to Fungal Infection. *PLOS ONE*, 6(3), e17973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017973>
  21. Ellis, J. G., Lagudah, E. S., Spielmeyer, W., & Dodds, P. N. (2014). The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in Plant Science*, 5, 641. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00641>
  22. Ellstrand, N. C. (2014). Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *American*

*Journal of Botany*, 101(5), 737–753. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400024>

23. Faris, J. D. (2014). Wheat Domestication: Key to Agricultural Revolutions Past and Future. W R. Tuberosa, A. Graner, & E. Frison (Red.), *Genomics of Plant Genetic Resources: Volume 1. Managing, sequencing and mining genetic resources* (s. 439–464). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7572-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7572-5_18)
24. Farrakh, S., Wang, M., & Chen, X. (2018). Pathogenesis-related protein genes involved in race-specific all-stage resistance and non-race specific high-temperature adult-plant resistance to *Puccinia striiformis* f. Sp. *Tritici* in wheat. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(11), 2478–2491. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61853-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61853-7)
25. Feldman, M., & Levy, A. A. (2015). Origin and Evolution of Wheat and Related Triticeae Species. W M. Molnár-Láng, C. Ceoloni, & J. Doležal (Red.), *Alien Introgression in Wheat* (s. 21–76). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6_2)
26. Feldman, M., & Levy, A. A. (2023). Evolution of Wheat Under Cultivation. W M. Feldman & A. A. Levy (Red.), *Wheat Evolution and Domestication* (s. 605–663). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-30175-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-031-30175-9_13)
27. Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
28. Gao, L., Wang, S., Zhang, Y., Li, X., Wang, H., & Liu, D. (2016). Identification and characterization of a  $\beta$ -1, 3-glucanase gene, *TcLr19Glu*, involved in wheat resistance against *Puccinia triticina*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 25(3), 319–326. <https://doi.org/10.1007/s13562-015-0344-4>
29. Gupta, P. K. (2016). Use of Alien Genetic Variation for Wheat Improvement. W V. R. Rajpal, S. R. Rao, & S. N. Raina (Red.), *Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement* (T. 11, s. 1–30). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27090-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27090-6_1)
30. Gupta, S. K., Charpe, A., Prabhu, K. V., & Haque, Q. M. R. (2006). Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(6), 1027–1036. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0362-7>
31. Han, F. P., Fedak, G., Benabdelmouna, A., Armstrong, K., & Ouellet, T. (2003). Characterization of six wheat  $\times$  *Thinopyrum intermedium* derivatives by GISH, RFLP, and multicolor GISH. *Genome*, 46(3), 490–495. <https://doi.org/10.1139/g03-032>
32. Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23(3), 504–511. <https://doi.org/10.2144/97233rr01>
33. Igrejas, G., & Branlard, G. (2020). The Importance of Wheat. W G. Igrejas, T. M. Ikeda, & C. Guzmán (Red.), *Wheat Quality For Improving Processing And Human Health* (s. 1–7). Springer

International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-34163-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-34163-3_1)

34. Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. W A. Singh & I. K. Singh (Red.), *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (s. 265–281). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12)
35. Jensen, K. B., Yan, X., Larson, S. R., Wang, R. R.-C., & Robins, J. G. (2016). Agronomic and genetic diversity in intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). *Plant Breeding*, *135*(6), 751–758. <https://doi.org/10.1111/pbr.12420>
36. Jiao, Y., Lv, W., Teng, W., Li, L., Lan, H., Bai, L., Li, Z., Lian, Y., Wang, Z., Xin, Z., Ren, Y., & Lin, T. (2024). Peroxidase gene *TaPrx109-B1* enhances wheat tolerance to water deficit via modulating stomatal density. *Plant, Cell & Environment*, *47*(8), 2954–2970. <https://doi.org/10.1111/pce.14918>
37. Katamadze, A., Vergara-Díaz, O., Uberegui, E., Yoldi-Achalandabaso, A., Araus, J. L., & Vicente, R. (2023). Evolution of wheat architecture, physiology, and metabolism during domestication and further cultivation: Lessons for crop improvement. *The Crop Journal*, *11*(4), 1080–1096. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2023.06.006>
38. Kidwai, M., Ahmad, I. Z., & Chakrabarty, D. (2020). Class III peroxidase: An indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement. *Plant Cell Reports*, *39*(11), 1381–1393. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02588-y>
39. Kilian, B., Ozkan, H., Walther, A., Kohl, J., Dagan, T., Salamini, F., & Martin, W. (2007). Molecular Diversity at 18 Loci in 321 Wild and 92 Domesticated Lines Reveal No Reduction of Nucleotide Diversity during *Triticum monococcum* (Einkorn) Domestication: Implications for the Origin of Agriculture. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(12), 2657–2668. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm192>
40. Kolmer, J. A., Anderson, J. A., & Flor, J. M. (2010). Chromosome Location, Linkage with Simple Sequence Repeat Markers, and Leaf Rust Resistance Conditioned by Gene *Lr63* in Wheat. *Crop Science*, *50*(6), 2392–2395. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.01.0005>
41. Krattinger, S. G., & Keller, B. (2016). Molecular genetics and evolution of disease resistance in cereals. *New Phytologist*, *212*(2), 320–332. <https://doi.org/10.1111/nph.14097>
42. Kumar, A., Choudhary, A., Kaur, H., & Mehta, S. (2022). A walk towards Wild grasses to unlock the clandestine of gene pools for wheat improvement: A review. *Plant Stress*, *3*, 100048. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100048>
43. Kumar, K., Jan, I., Saripalli, G., Sharma, P. K., Mir, R. R., Balyan, H. S., & Gupta, P. K. (2022). An Update on Resistance Genes and Their Use in the Development of Leaf Rust Resistant Cultivars in Wheat. *Frontiers in Genetics*, *13*, 816057. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.816057>

44. Kwiatek, M., Majka, M., Majka, J., Belter, J., Suchowilska, E., Wachowska, U., Wiwart, M., & Wiśniewska, H. (2016). Intraspecific Polymorphisms of Cytogenetic Markers Mapped on Chromosomes of *Triticum polonicum* L. *PLOS ONE*, *11*(7), e0158883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158883>
45. Kwiatek, M. T., Wiśniewska, H., Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Majka, J., Majka, M., Belter, J., & Pudelska, H. (2017). Gametocidal Factor Transferred from *Aegilops geniculata* Roth Can Be Adapted for Large-Scale Chromosome Manipulations in Cereals. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00409>
46. Lanubile, A., Bernardi, J., Battilani, P., Logrieco, A., & Marocco, A. (2012). Resistant and susceptible maize genotypes activate different transcriptional responses against *Fusarium verticillioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *77*(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.12.002>
47. Lata, C., Kumar, A., Gangwar, O. P., Prasad, P., Adhikari, S., Kumar, S., Kulshreshtha, N., & Bhardwaj, S. C. (2022). Multiplex PCR assay for the detection of *Lr24* and *Lr68* in salt tolerant wheat genotypes. *Cereal Research Communications*, *50*(4), 1019–1027. <https://doi.org/10.1007/s42976-021-00218-1>
48. Lata, C., Prasad, P., Gangwar, O. P., Adhikari, S., Thakur, R. K., Savadi, S., Kumar, K., Kumar, S., Singh, G. P., & Bhardwaj, S. C. (2022). Temporal behavior of wheat – *Puccinia striiformis* interaction prompted defense-responsive genes. *Journal of Plant Interactions*, *17*(1), 674–684. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2082570>
49. Li, D., Li, T., Wu, Y., Zhang, X., Zhu, W., Wang, Y., Zeng, J., Xu, L., Fan, X., Sha, L., Zhang, H., Zhou, Y., & Kang, H. (2018). FISH-Based Markers Enable Identification of Chromosomes Derived From Tetraploid *Thinopyrum elongatum* in Hybrid Lines. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00526>
50. Li, H., Hua, L., Zhao, S., Hao, M., Song, R., Pang, S., Liu, Y., Chen, H., Zhang, W., Shen, T., Gou, J.-Y., Mao, H., Wang, G., Hao, X., Li, J., Song, B., Lan, C., Li, Z., Deng, X. W., Chen, S. (2023). Cloning of the wheat leaf rust resistance gene *Lr47* introgressed from *Aegilops speltoides*. *Nature Communications*, *14*(1), 6072. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41833-2>
51. Li, X.-Y., Gao, L., Zhang, W.-H., Liu, J.-K., Zhang, Y.-J., Wang, H.-Y., & Liu, D.-Q. (2015). Characteristic expression of wheat PR5 gene in response to infection by the leaf rust pathogen, *Puccinia triticina*. *Journal of Plant Interactions*, *10*(1), 132–141. <https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1036140>
52. Linton, S. M. (2020). Review: The structure and function of cellulase (endo- $\beta$ -1,4-glucanase) and hemicellulase ( $\beta$ -1,3-glucanase and endo- $\beta$ -1,4-mannase) enzymes in invertebrates that consume materials ranging from microbes, algae to leaf litter. *Comparative Biochemistry and Physiology*

<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.110354>

53. Liu, R., Lu, J., Zhou, M., Zheng, S., Liu, Z., Zhang, C., Du, M., Wang, M., Li, Y., Wu, Y., & Zhang, L. (2020). Developing stripe rust resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with gene pyramiding strategy and marker-assisted selection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67(2), 381–391. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00868-5>
54. Loon, L. C. van, Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44(Volume 44, 2006), 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
55. Mago, R., Bariana, H. S., Dundas, I. S., Spielmeyer, W., Lawrence, G. J., Pryor, A. J., & Ellis, J. G. (2005). Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(3), 496–504. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2039-z>
56. Mago, R., Miah, H., Lawrence, G. J., Wellings, C. R., Spielmeyer, W., Bariana, H. S., McIntosh, R. A., Pryor, A. J., & Ellis, J. G. (2005). High-resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes *Sr31*, *Lr26* and *Yr9* on the short arm of rye chromosome 1. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(1), 41–50. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0098-9>
57. Mahelka, V., Kopecký, D., & Paštová, L. (2011). On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 127. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-127>
58. Mebrate, S. A., Oerke, E. C., Dehne, H. W., & Pillen, K. (2008). Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers. *Euphytica*, 162(3), 457–466. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9615-z>
59. Misra, R. C., Sandeep, Kamthan, M., Kumar, S., & Ghosh, S. (2016). A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic Arabidopsis. *Scientific Reports*, 6(1), 25340. <https://doi.org/10.1038/srep25340>
60. Mundt, C. C. (2018). Pyramiding for Resistance Durability: Theory and Practice. *Phytopathology*®, 108(7), 792–802. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0426-RVW>
61. Nakamura, S., Abe, F., Kawahigashi, H., Nakazono, K., Tagiri, A., Matsumoto, T., Utsugi, S., Ogawa, T., Handa, H., Ishida, H., Mori, M., Kawaura, K., Ogihara, Y., & Miura, H. (2011). A Wheat Homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 Acts in the Regulation of Germination. *The Plant Cell*, 23(9), 3215–3229. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088492>
62. Nawracała J., (2004). Genetyczne podstawy hodowli pszenicy. W: Zarys Genetyki Zbóż. Tom 1: Jęczmień, pszenica i żyto. Red.: Górny A. G.; wyd. IGR PAN, Poznań..
63. Nawrot, R., Musidlak, O., Barylski, J., Nowicki, G., Bałdysz, S., Czerwoniec, A., & Goździcka-

- Józefiak, A. (2021). Characterization and expression of a novel thaumatin-like protein (CcTLP1) from papaveraceous plant *Corydalis cava*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *189*, 678–689. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.067>
64. Noweiska, A., Bobrowska, R., & Kwiatek, M. T. (2022). Structural Polymorphisms of Chromosome 3A<sup>m</sup> Containing *Lr63* Leaf Rust Resistance Loci Reflect the Geographical Distribution of *Triticum monococcum* L. and Related Diploid Wheats. *Agriculture*, *12*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/agriculture12070966>
65. Noweiska, A., Bobrowska, R., Sychała, J., Tomkowiak, A., & Kwiatek, M. T. (2023). Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics*, *64*(1), 55–64. <https://doi.org/10.1007/s13353-022-00745-5>
66. Otti, G., Bouvaine, S., Kimata, B., Mkamillo, G., Kumar, P. L., Tomlins, K., & Maruthi, M. N. (2016). High-throughput multiplex real-time PCR assay for the simultaneous quantification of DNA and RNA viruses infecting cassava plants. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(5), 1346–1356. <https://doi.org/10.1111/jam.13043>
67. Patil, V. R., Patel, R. M., Parekh, V. B., Pathak, J., & Saripalli, G. (2021). Differential gene expression analyses of ten defence response genes during *Fusarium wilt* infection in resistant and susceptible pigeonpea cultivars. *Plant Stress*, *2*, 100043. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100043>
68. Pei, Y., Cui, Y., Zhang, Y., Wang, H., Bao, Y., & Li, X. (2018). Molecular cytogenetic identification of three rust-resistant wheat-*Thinopyrum ponticum* partial amphiploids. *Molecular Cytogenetics*, *11*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13039-018-0378-0>
69. Perníčková, K., Koláčková, V., Lukaszewski, A. J., Fan, C., Vrána, J., Duchoslav, M., Jenkins, G., Phillips, D., Šamajová, O., Sedlářová, M., Šamaj, J., Doležel, J., & Kopecký, D. (2019). Instability of Alien Chromosome Introgressions in Wheat Associated with Improper Positioning in the Nucleus. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms20061448>
70. Prasad, P., Savadi, S., Bhardwaj, S. C., & Gupta, P. K. (2020a). The progress of leaf rust research in wheat. *Fungal Biology*, *124*(6), 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.013>
71. Prasad, P., Savadi, S., Bhardwaj, S. C., & Gupta, P. K. (2020b). The progress of leaf rust research in wheat. *Fungal Biology*, *124*(6), 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.013>
72. Prasad, P., Savadi, S., Bhardwaj, S. C., Kashyap, P. L., Gangwar, O. P., Khan, H., Kumar, S., Kumar, R., & Patil, V. (2019). Stage-specific reprogramming of defense responsive genes during *Lr24*-mediated leaf rust resistance in wheat. *Journal of Plant Pathology*, *101*(2), 283–293. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00199-x>

73. Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., & Perrotta, C. (2006). Drought stress response in wheat: Physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, Cell & Environment*, 29(12), 2143–2152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01588.x>
74. Ren, X., Wang, C., Ren, Z., Wang, J., Zhang, P., Zhao, S., Li, M., Yuan, M., Yu, X., Li, Z., Chen, S., & Wang, X. (2023). Genetics of Resistance to Leaf Rust in Wheat: An Overview in a Genome-Wide Level. *Sustainability*, 15(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/su15043247>
75. Rychel-Bielska, S., Plewiński, P., Kozak, B., Galek, R., & Książkiewicz, M. (2020). Photoperiod and Vernalization Control of Flowering-Related Genes: A Case Study of the Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572135>
76. Salina, E. A., Adonina, I. G., Badaeva, E. D., Kroupin, P. Yu., Stasyuk, A. I., Leonova, I. N., Shishkina, A. A., Divashuk, M. G., Starikova, E. V., Khuat, T. M. L., Syukov, V. V., & Karlov, G. I. (2015). A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. *Euphytica*, 204(1), 91–101. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1344-5>
77. Schachermayr, G. M., Messmer, M. M., Feuillet, C., Winzeler, H., Winzeler, M., & Keller, B. (1995). Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(7), 982–990. <https://doi.org/10.1007/BF00222911>
78. Scholtz, J. J., & Visser, B. (2013). Reference gene selection for qPCR gene expression analysis of rust-infected wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81, 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.10.006>
79. Sharma, A., Sharma, H., Rajput, R., Pandey, A., & Upadhyay, S. K. (2022). Molecular Characterization Revealed the Role of Thaumatin-Like Proteins of Bread Wheat in Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.807448>
80. Sharma, A., Sheikh, I., Kumar, R., Kumar, K., Vyas, P., & Dhaliwal, H. S. (2018). Evaluation of end use quality and root traits in wheat cultivars associated with 1RS.1BL translocation. *Euphytica*, 214(4), 62. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2144-0>
81. Song, W., Xie, H., Liu, Q., Xie, C., Ni, Z., Yang, T., Sun, Q., & Liu, Z. (2007). Molecular identification of *Pm12*-carrying introgression lines in wheat using genomic and EST-SSR markers. *Euphytica*, 158(1), 95–102. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9432-4>
82. Sychała, J., Tomkowiak, A., Noweiska, A., Bobrowska, R., Bocianowski, J., Książkiewicz, M., Sobiech, A., & Kwiatek, M. T. (2023). Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance Genes *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Associated miRNAs Patterns. *Genes*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/genes14071376>

83. Sumíková, T., & Hanzalová, A. (2010). Multiplex PCR assay to detect rust resistance genes *Lr26* and *Lr37* in wheat. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, *46*(2), 85–89. <https://doi.org/10.17221/32/2010-CJGPB>
84. Tang, X., Shi, D., Xu, J., Li, Y., Li, W., Ren, Z., & Fu, T. (2014). Molecular cytogenetic characteristics of a translocation line between common wheat and *Thinopyrum intermedium* with resistance to powdery mildew. *Euphytica*, *197*(2), 201–210. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-1059-z>
85. The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), Appels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Pozniak, C. J., Choulet, F., Distelfeld, A., Poland, J., Ronen, G., Sharpe, A. G., Barad, O., Baruch, K., Keeble-Gagnère, G., Mascher, M., Ben-Zvi, G., Josselin, A.-A., ... Wang, L. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, *361*(6403), eaar7191. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
86. Tomkowiak, A., Skowrońska, R., Kwiatek, M., Spychała, J., Weigt, D., Kurasiak-Popowska, D., Niemann, J., Mikołajczyk, S., Nawracała, J., Kowalczewski, P. Ł., & Khan, K. (2021). Identification of leaf rust resistance genes *Lr34* and *Lr46* in common wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *Aestivum*) lines of different origin using multiplex PCR. *Open Life Sciences*, *16*(1), 172–183. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0018>
87. Venske, E., Schreinert dos Santos, R., Busanello, C., Gustafson, P., & Costa de Oliveira, A. (2019). Bread wheat: A role model for plant domestication and breeding. *Hereditas*, *156*. <https://doi.org/10.1186/s41065-019-0093-9>
88. Vergauwen, D., & De Smet, I. (2017). From early farmers to Norman Borlaug—The making of modern wheat. *Current Biology*, *27*(17), R858–R862. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.061>
89. Vida, G., Gál, M., Uhrin, A., Veisz, O., Syed, N. H., Flavell, A. J., Wang, Z., & Bedő, Z. (2009). Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica*, *170*(1), 67–76. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9945-0>
90. Zhao, X., Fu, X., Yin, C. et al. (2021). Wheat speciation and adaptation: perspectives from reticulate evolution. *aBIOTECH 2*, 386–402. <https://doi.org/10.1007/s42994-021-00047-0>
91. Wyniki porejestrowych doświadczeń odmianowych. Zboża jare 2023. Najewski A., Madajska K., Skrzypek A., Szarzyńska J. (2024) Słupia Wielka [dostęp: 05 maj 2024]
92. Wulff, B. B., & Krattinger, S. G. (2022). The long road to engineering durable disease resistance in wheat. *Current Opinion in Biotechnology*, *73*, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.09.002>
93. Xu, S., Lyu, Z., Zhang, N., Li, M., Wei, X., Gao, Y., Cheng, X., Ge, W., Li, X., Bao, Y., Yang,

- Z., Ma, X., Wang, H., & Kong, L. (2023). Genetic mapping of the wheat leaf rust resistance gene *Lr19* and development of translocation lines to break its linkage with yellow pigment. *Theoretical and Applied Genetics*, *136*(9), 200. <https://doi.org/10.1007/s00122-023-04425-8>
94. Xu, X. F., Li, D. D., Liu, Y., Gao, Y., Wang, Z. Y., Ma, Y. C., Yang, S., Cao, Y. Y., Xuan, Y. H., & Li, T. Y. (2017). Evaluation and identification of stem rust resistance genes *Sr2*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr31* and *Sr38* in wheat lines from Gansu Province in China. *PeerJ*, *5*, e4146. <https://doi.org/10.7717/peerj.4146>
95. Yadav, P. K., Tiwari, S., Kushwah, A., Tripathi, M. K., Gupta, N., Tomar, R. S., & Kandalkar, V. S. (2021). Morpho-physiological characterization of bread wheat genotypes and their molecular validation for rust resistance genes *Sr2*, *Sr31* and *Lr24*. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, *87*(3), 534–545. <https://doi.org/10.1007/s43538-021-00049-y>
96. Yan, J., Su, P., Li, W., Xiao, G., Zhao, Y., Ma, X., Wang, H., Nevo, E., & Kong, L. (2019). Genome-wide and evolutionary analysis of the class III peroxidase gene family in wheat and *Aegilops tauschii* reveals that some members are involved in stress responses. *BMC Genomics*, *20*(1), 666. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6006-5>
97. Yap, R., Hsu, Y.-C., Wu, Y.-P., Lin, Y.-R., & Kuo, C.-W. (2016). Multiplex PCR genotyping for five bacterial blight resistance genes applied to marker-assisted selection in rice (*Oryza sativa*). *Plant Breeding*, *135*(3), 309–317. <https://doi.org/10.1111/pbr.12368>
98. Zaharieva, M., & Monneveux, P. (2014). Cultivated einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. *subsp. monococcum*): The long life of a founder crop of agriculture. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *61*(3), 677–706. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0084-7>
99. Zhang, L., Wang, S., Li, H., Deng, Q., Zheng, A., Li, S., Li, P., Li, Z., & Wang, J. (2010). Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F2 populations. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, *121*(6), 1071–1082. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1372-z>
100. Zhang, W., Zhang, M., Zhu, X., Cao, Y., Sun, Q., Ma, G., Chao, S., Yan, C., Xu, S. S., & Cai, X. (2018). Molecular cytogenetic and genomic analyses reveal new insights into the origin of the wheat B genome. *Theoretical and Applied Genetics*, *131*(2), 365–375. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-3007-0>
101. Zhang, Y., Gao, Y., Liang, Y., Dong, Y., Yang, X., & Qiu, D. (2019). *Verticillium dahliae* *PevDI*, an Alt a 1-like protein, targets cotton PR5-like protein and promotes fungal infection. *Journal of Experimental Botany*, *70*(2), 613–626. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery351>
102. Zhang, Y., Yan, H., Wei, X., Zhang, J., Wang, H., & Liu, D. (2017). Expression analysis and functional characterization of a pathogen-induced thaumatin-like gene in wheat conferring enhanced resistance to *Puccinia triticina*. *Journal of Plant Interactions*, *12*(1), 332–339.

## 11. Spis tabel oraz rycin

- Tabela 1. Genotypy pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) oraz form diploidalnych
- Tabela 2. Markery molekularne sprzężone z genami odporności na rdzę brunatną
- Tabela 3. Sekwencje starterów genów badanych oraz genów referencyjnych, wydajność reakcji RT-qPCR
- Tabela 4. Składy mieszanin dla reakcji nick translacji
- Tabela 5. Skład mieszaniny hybrydyzacyjnej
- Tabela 6. Analiza molekularna markerów sprzężonych z *loci* genu *Lr63* u pszenic diploidalnych
- Tabela 7. Objętości starterów oraz kombinacje reakcji multipleks PCR
- Tabela 8. Analiza molekularna form donorowych i akceptorowych
- Tabela 9. Analiza molekularna pokolenia F<sub>1</sub> uzyskanych z formą akceptorową KWS Carusum
- Tabela 10. Analiza molekularna pokolenia F<sub>1</sub> uzyskanych z formą akceptorową Mantra
- Tabela 11. Analiza molekularna pokolenia F<sub>2</sub> uzyskanych z formą akceptorową KWS Carusum
- Tabela 12. Analiza molekularna pokolenia F<sub>2</sub> uzyskanych z formą akceptorową Mantra
- Tabela 13. Analiza molekularna pokolenia F<sub>3</sub>
- Tabela 14. Obserwacja badanych genotypów 14 dni po inokulacji patogenem *Puccinia triticina*
- Tabela 15. Znormalizowana ekspresja genów badanych po porażeniu patogenem *Puccinia triticina*
- Tabela 16. Znormalizowana ekspresja genów badanych po porażeniu patogenem *Puccinia triticina*
- Tabela 17. Zmiany poziomu ekspresji genu *TaLr19TLP1* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0
- Tabela 18. Zmiany poziomu ekspresji genu *TaLr19TLP1* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0
- Tabela 19. Zmiany poziomu ekspresji genu PR2 po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0
- Tabela 20. Zmiany poziomu ekspresji genu PR2 po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0
- Tabela 21. Zmiany poziomu ekspresji genu PR9 po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0
- Tabela 22. Zmiany poziomu ekspresji genu PR9 po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0
- Tabela 23. Zmiany poziomu ekspresji genu *TaPrx107* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0
- Tabela 24. Zmiany poziomu ekspresji genu *TaPrx107* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Tabela 25. Zmiany poziomu ekspresji genu referencyjnego *ARF* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Tabela 26. Zmiany poziomu ekspresji genu referencyjnego *ARF* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Tabela 27. Zmiany poziomu ekspresji genu referencyjnego *TUB* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Tabela 28. Zmiany poziomu ekspresji genu referencyjnego *TUB* po porażeniu patogenem *Puccinia triticina* w odniesieniu do czasu 0

Tabela 29. Analiza Testem t-studenta dla genów referencyjnych *ARF* i *TUB*

Rycina 1. Teoria pochodzenia pszenicy, na podstawie Vergauwen & De Smet (2017)

Rycina 2. Schemat pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej puli genowej

Rycina 3. Zarodniki *Puccinia triticina* wykorzystane do przygotowania mieszaniny inokulacyjnej

Rycina 4. Płytki metafazowa genotypu PI578204 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone

Rycina 5. Płytki metafazowa genotypu PI578212 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone f) dodatkowy chromosom

Rycina 6. Płytki metafazowa genotypu PI614023 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone

Rycina 7. Płytki metafazowa genotypu PI675464 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone

Rycina 8. Płytki metafazowa genotypu PI675466 z wykorzystaniem genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) a) DAPI b) *Thinopyrum intermedium* (digoksygenina) c) *Secale cereale* (rodamina) d) *Thinopyrum elongatum* (Atto647N) e) scalone f) chromosom z translokacją

Rycina 9. Diagram Venna przedstawiający obecność markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności u form mieszańcowych, donorowych i akceptorowych; <sup>1,2</sup> – obecność markerów *Xwmc773*, *Xbarc273*; <sup>3,4</sup> – obecność markerów *Xbarc57*, *Xbarc321*

Rycina 10. Mapy ciepła przedstawiające profile ekspresji genu *TaLr19TLP1* po inokulacji patogenem. Każda mapa przedstawia formę mieszańcową, formę akceptorową, donorową, linie izogeniczne Thatcher z genami które są obecne w formie mieszańcowej oraz linie Thatcher; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Rycina 11. Mapy ciepła przedstawiające profile ekspresji genu PR2 po inokulacji patogenem. Każda mapa przedstawia formę mieszańcową, formę akceptorową, donorową, linie izogeniczne Thatcher z genami które są obecne w formie mieszańcowej oraz linie Thatcher; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Rycina 12. Mapy ciepła przedstawiające profile ekspresji genu PR9 po inokulacji patogenem. Każda mapa przedstawia formę mieszańcową, formę akceptorową, donorową, linie izogeniczne Thatcher z genami które są obecne w formie mieszańcowej oraz linie Thatcher; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Rycina 13. Mapy ciepła przedstawiające profile ekspresji genu *TaPrx107* po inokulacji patogenem. Każda mapa przedstawia formę mieszańcową, formę akceptorową, donorową, linie izogeniczne Thatcher z genami które są obecne w formie mieszańcowej oraz linie Thatcher; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Rycina 14. Analiza korelacji Pearsona między badanymi genami \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Rycina 15. Analiza korelacji Pearsona między liniami izogenicznymi w obrębie badanych genów a) *TaLr19TLP1* b) PR2 c) *TaPrx107* d) PR9 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

**12. Opublikowane prace wchodzące w skład zbioru**

**P1. Structural Polymorphisms of Chromosome  
3A<sup>m</sup> Containing *Lr63* Leaf Rust Resistance Loci Reflect the  
Geographical Distribution of *Triticum monococcum* L. and Related  
Diploid Wheats**

**Noweiska A., Bobrowska R., Kwiatek M.T.**

*Agriculture*. 12(7) 966; (2022).

<https://doi.org/10.3390/agriculture12070966>

Article

# Structural Polymorphisms of Chromosome 3A<sup>m</sup> Containing *Lr63* Leaf Rust Resistance Loci Reflect the Geographical Distribution of *Triticum monococcum* L. and Related Diploid Wheats

Aleksandra Noweiska, Roksana Bobrowska and Michał Tomasz Kwiatek \* 

Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str., 60-632 Poznań, Poland; aleksandra.noweiska@up.poznan.pl (A.N.); roksana.bobrowska@up.poznan.pl (R.B.)

\* Correspondence: michal.kwiatek@up.poznan.pl

**Abstract:** Wheat is one of the world's crucial staple food crops. In turn, einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.) is considered a wild relative of wheat (*Triticum aestivum* L.) and can be used as a source of agronomically important genes for breeding purposes. Cultivated *T. monococcum* subsp. *monococcum* originated from *T. monococcum* subsp. *aegilopoides* (syn. *T. boeoticum*). For the better utilization of valuable genes from these species, it is crucial to discern the genetic diversity at their cytological and molecular levels. Here, we used a fluorescence in situ hybridization toolbox and molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr63* (located on the short arm of the 3A<sup>m</sup> chromosome—3A<sup>m</sup>S) to track the polymorphisms between *T. monococcum* subsp. *monococcum*, *T. boeoticum* and *T. urartu* (A-genome donor for hexaploid wheat) accessions, which were collected in different regions of Europe, Asia, and Africa. We distinguished three groups of accessions based on polymorphisms of cytomolecular and leaf rust resistance gene *Lr63* markers. We observed that the cultivated forms of *T. monococcum* revealed additional marker signals, which are characteristic for genomic alternations induced by the domestication process. Based on the structural analysis of the 3A<sup>m</sup>S chromosome arm, we concluded that the polymorphisms were induced by geographical dispersion and could be related to adaptation to local environmental conditions.

**Keywords:** chromosome alternations; diploid wheat; species dispersion; domestication; einkorn; leaf rust resistance



**Citation:** Noweiska, A.; Bobrowska, R.; Kwiatek, M.T. Structural Polymorphisms of Chromosome 3A<sup>m</sup> Containing *Lr63* Leaf Rust Resistance Loci Reflect the Geographical Distribution of *Triticum monococcum* L. and Related Diploid Wheats. *Agriculture* **2022**, *12*, 966. <https://doi.org/10.3390/agriculture12070966>

Academic Editors: Edyta Paczos-Grzeda, Volker Mohler and Sylwia Sowa

Received: 9 June 2022

Accepted: 2 July 2022

Published: 5 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Crop wild relatives (CWRs) are considered wild species that have sufficient levels of interfertility with other crops [1]. CWRs carry many beneficial traits for breeding, especially those, which have been lost during domestication and breeding selection, as well as novel adaptive alleles that can enhance crop diversity and productivity [2]. Initially, the classification for CWRs was established through the empirical crossing that resulted in four major germplasm categories: primary (no crossing barriers), secondary (benign crossing barriers), tertiary (requires special methods to obtain hybrid organisms, such as embryo rescue), and quaternary (genetic engineering technics are necessary to be performed) [1]. *Triticum monococcum* L. (2n = 2x = 14 chromosomes; A<sup>m</sup>A<sup>m</sup>) is closely related to *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan (2n = 2x = 14; A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>), which has been reported as one of the primary gene pool ancestors of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.; 2n = 6x = 42; BBAADD) from which the A-genome originated [3]. *T. monococcum* presents a high genetic variability, making it a significant gene pool for other species. Due to its close affinity to common wheat, it has been reported as a source of valuable genes, i.e., disease resistance genes, including leaf rust resistance genes [4]. Leaf rust (*Lr*) is a fungal disease caused by *Puccinia triticina* Eriksson. It is the most widespread of the wheat rust diseases, which

occurs in almost all growing areas and limits wheat production worldwide. The disease can take the form of an epidemic, which can lead to severe economic losses [5]. Until now, over 80 *Lr* resistance genes have been identified within the Triticeae tribe [6]. Some of these genes have been used to develop resistance to leaf rust in wheat varieties [5], including the *Lr63* gene, which is located on a short arm of chromosome 3A<sup>m</sup> (3A<sup>m</sup>S) of *T. monococcum*. It is the only mapped leaf rust resistance gene on the distal part of chromosome 3A<sup>m</sup>S, and is linked with microsatellites locus *Xbarc321* and *Xbarc57* markers (2.9 cM) [7].

Crop domestication is a process inseparably linked to the transition from hunter-gatherer societies to settled agriculture (the ‘Neolithic revolution’; [8]), which independently appeared over a dozen times in various regions around the world from 10,000 to 12,000 years ago (ya) ca., to as recently as 3000–4000 ya [9–11]. This process can be called a conscious artificial selection of plants used in order to enhance their relevance to human demands, such as flavor, harvest, preservation, and methods of breeding. However, this process has been reported to be unconscious as well [12]. It is claimed that the factors which are responsible for early domestication include (1) the relocation of plants to new environmental niches, (2) human migration, and (3) genetic and genomic alternations, which are specific to selection [12]. Demographic effects often associated with domestication resulted in conspicuous impacts on genomic architecture, such as reductions in ineffective population sizes, reductions in diversity, and changes in the mating system, as well as targeted selection of specific traits [13,14]. There are also a number of reports showing evidence of large-scale chromosomal structural changes [15], changes in repetitive sequence content [16], and changes in gene variations and their copy numbers [17]. Cultivated *T. monococcum* L. subsp. *monococcum* originated from *T. boeoticum* (syn. *T. monococcum* subsp. *aegilopoides*), which was widespread in southern Europe and western Asia. Even before domestication, *T. boeoticum* was divided by the strong genetic differentiation into three races: race  $\alpha$ , race  $\beta$ , and race  $\gamma$  [18]. However, only one race ( $\beta$ ) has been exploited by mankind [18]. Precisely, wild *T. boeoticum* was domesticated in the Karacadag mountains in southeast Turkey [19] and spread to several locations of the Fertile Crescent as the first cultivated wheat, called einkorn (*T. monococcum* L. subsp. *monococcum*) (Kilian et al. 2007). The common name was derived from the German “Einkorn”, which means ‘single grain’, and relates to the occurrence of only a single grain per spikelet [20]. However, the name einkorn is used sometimes for both the wild (subsp. *aegilopoides*) and the cultivated (subsp. *monococcum*) forms. This cereal was important in the early Neolithic agriculture, but now is extensively grown in western Turkey, the Balkans, Switzerland, Germany, Spain, and the Caucasus [21]. During the last 5000 years, einkorn was eradicated and replaced by tetra- and hexaploid wheat. What is interesting is that both *T. monococcum* and *T. boeoticum* (*T. monococcum* subsp. *aegilopoides*) are reproductively isolated from wild *T. urartu* (a progenitor of the A-genome of hexaploid wheat) with interspecific hybrids being sterile, although the two wild forms have comparable morphologies [22]. Cultivated einkorn is represented by a broad genetic variation [20]. This taxon includes nearly twenty identified botanical varieties [23] and six ecogeographical groups. The geographical diversification of *T. monococcum* from the domestication area was well restored through grain remains discovered in archaeological excavations [18,20], and is an example of well-documented speciation in the background of time and location.

What is interesting is that *T. monococcum*, *T. boeoticum*, and *T. urartu* are karyotypically similar and have similar Giemsa C-banding patterns [24]. However, it was reported that fluorescence in situ hybridization (FISH), which allows for the direct localization of DNA sequences on chromosomes, revealed a number of intra- and interspecific divergence within diploid species of wheat [4,25–28]. FISH in plants commonly involves the application of probes containing conservative high-copy sequences. One of them is the *Afa*-family DNA probe, which is one of the most useful ones for the chromosome identification of diploid A-genome wheats. The *Afa*-family probe allowed for the recognition of the majority of chromosomes of cultivated einkorn [28] and *T. urartu* [4]. Other repeat DNA families, which were isolated from the bread wheat genome, among others, include pTa-86, pTa-465, pTa-

535, and pTa-713 [29–31] which can also provide informative labelling patterns for wheat chromosome discrimination. Among them, the probe pTa-535 was reported to generate the largest number of signals on the A-genome chromosomes, which are chromosome-specific. This clone is a 342 bp tandemly repeated DNA sequence, showing ~80% homology with the clone pTa-173, a member of the *Afa*-family [29].

In this study, we used molecular cytogenetics to analyze the karyotypes of *T. monococcum* accessions originating from different regions of eastern Europe, western Asia, and North Africa. Precisely, we analyzed the structural changes of the short arm of chromosome 3A<sup>m</sup>, which were probably induced by geographical dispersion and adaptation to local environmental conditions using cytomolecular tools and molecular markers linked to the *Lr63* locus.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material

Sixteen diploid wheat genotypes (Table 1) collected from different geographical regions were used in this study. One hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*) ‘was the reference for the presence of locus *Lr63* (GSTR 444). Chinese Spring (CS) wheat was used as a standard control and for molecular probe generation as well. All accessions were provided by the National Small Grain Collection located at the Agricultural Research Station in Aberdeen, WA, USA.

**Table 1.** Origin and presence of *Xbarc321* and *Xbarc57* markers linked to *Lr63* locus in tested diploid wheat. “+”—presence of marker; “-”—absence of marker.

No.	Plant ID	Cultivar	Species	Origin	<i>Xbarc321</i>	<i>Xbarc57</i>
1.	GSTR 444	Lr63	<i>Triticum aestivum</i> subsp. <i>aestivum</i>	Canada	+	+
2.	CLTR17667	-	<i>Triticum urartu</i>	Turkey	-	+
3.	PI428316	G3220	<i>Triticum urartu</i>	Iran	-	+
4.	PI225164	Kaploutras	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	Greece	+	-
5.	PI428011	G3224	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i>	Azerbaijan	+	+
6.	PI554513	84TK154-028.00	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i>	Soviet Union	+	-
7.	PI668147	Kromeriz	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	Former Czechoslovakia	+	+
8.	PI277130	A TRI 613/59	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	Albania	+	+
9.	PI614649	UKR-99-075	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i>	Ukraine	+	-
10.	PI290508	V.J. 388	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	Hungary	+	+
11.	PI662221	GR05-052	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i>	Greece	+	-
12.	PI307984	K930	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	Morocco	-	+
13.	CLTR17664	-	<i>Triticum urartu</i>	Lebanon	-	-
14.	PI170196	2498	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	Turkey	+	+
15.	PI326317	WIR 18140	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	Azerbaijan	+	+
16.	PI591871	SN-264	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	Georgia	+	+
17.	PI487265	SY 20033	<i>Triticum urartu</i>	Syria	-	+

## 2.2. Identification of Molecular Markers Linked to Lr63

GeneMATRIX Plant and Fungi DNA Purification Kit was used to perform DNA isolation from the leaves of 10-day-old seedlings (EURx Ltd., Gdansk, Poland). DNA quality and concentration were measured using a DeNovix spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) at the spectral length of 260 and 280 nm. The samples were diluted with Tris buffer (EURx Ltd., Gdansk, Poland) to attain a concentration of 50 ng/μL. To identify gene *Lr63*, the molecular markers *Xbarc57* and *Xbarc321* [7] were used. PCR reaction was carried out in 25 μL volumes, consisting of the following: 1 μL of two primers (Sigma); 12.5 μL FastGene<sup>®</sup> Optima HotStart ReadyMix (NIPPON Genetics, Europe GmbH, Düren, Germany), which included FastGene<sup>®</sup> Optima DNA Polymerase blend (0.2 U per μL reaction), FastGene<sup>®</sup> Optima Buffer (1X), dNTPs (0.4 mM of each dNTP at 1X), MgCl<sub>2</sub> (4 mM at 1X), and stabilizers; 2 μL of DNA templates; and PCR-grade water. A PCR procedure was adjusted based on the standard protocol. The primer annealing temperatures of the marker primers were 52 °C for *Xbarc321* and 60 °C for *Xbarc57* [7]. The PCR final reaction included an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles (denaturation, 94 °C for 45 s; primer annealing, 52 or 60 °C for 30s; elongation, 72 °C for 1 min), followed by the final extension for 7 min at 72 °C and storage at 4 °C. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with the Labcycler thermocycler (SensoQuest GmbH, Göttingen, Germany). Amplification products were separated on 2% agarose gel (Bioshop, Canada Inc., Burlington, ON, Canada) in 1xTBE buffer (Bioshop, Canada Inc., Burlington, ON, Canada) for one and a half hours. Midori Green Advanced DNA Stain (Nippon Genetics Europe, Düren, Germany) was added to agarose gel. The UV Molecular Imager Gel Doc<sup>™</sup> XR system with Biorad Bio Image<sup>™</sup> software (Biorad, Berkeley, CA, USA) was used to visualize the amplification products.

## 2.3. Chromosome Preparation

Seeds were germinated in Petri dishes laid out with filter paper and flooded with water at room temperature (22 °C) for 4–6 days. After this time, root tips were cut off and stored in ice-cold water for 26 h. Fixation of the root tips was performed using ethanol and acetic acid (3:1, *v/v*). Mitotic preparations were created from root tips by digesting them with an enzyme mixture consisting of 20% (*v/v*) pectinase (Sigma), 1% (*w/v*) cellulose (Calbiochem), and 1% (*w/v*) cellulase 'Onozuka R-10' (Serva). By previously washing them with 0.01 M sodium citric buffer, slides were prepared according to the Kwiatek et al. [30] procedure.

## 2.4. DNA Molecular Probes

Genomic DNA from "CS" wheat was used to amplify the following repetitive sequences: pTa-86, pTa-535, and pTa-713, which were used as molecular probes (Table 2) [30]. According to Komuro et al. [30], two clones (pTa-535 and pTa-713) were determined to have especially valuable sequences for chromosome identification. In combination with pTa-86 (the pSc119 homologous sequence), these probes enabled the unambiguous discrimination of all wheat chromosomes, including orientation.

**Table 2.** Primer sequence and PCR terms for amplification of wheat repetitive sequences [29,30].

Clone	NCBI GenBank Sequence Number	Primer Sequences (5' to 3')	Annealing Temperature (°C)
pTa-86	KC290896	ACGATTGACCAATCTCGGGG ACCGACCCAAATTACGAGAGT	58.5
pTa-535	KC290894	GCATAGCATGTGCGAAAGAG TCGTCCGAAACCCTGATAC	59
pTa-535	KC290894	GGGGCGGACGTCGTTG CCGTAAGATAGACAGGGTGGG	59

The PCR mixture contained 12.5  $\mu$ L of TaqNovaHS Master Mix, 1  $\mu$ L of forward/reverse primers, 2  $\mu$ L of DNA, and 8.5  $\mu$ L of nuclease-free water. PCR reactions were performed under conditions of 95 °C for 3 min, 34 cycles of 95 °C for 30 s, annealing temperature at 59 °C for 30 s, 72 °C for 60 s, and 72 °C for 5 min. Labeling of molecular probes was performed using the nick translation method using the Nick Translation Kit (Roche/Merck). The pTa-535 sequence was labeled with tetramethyl-5-dUTP-rhodamine (Roche), whereas pTa-713 was labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche), and pTa-86 was labeled with Atto647 (Jena Bioscience, Jena, Germany).

### 2.5. DNA Molecular Probes

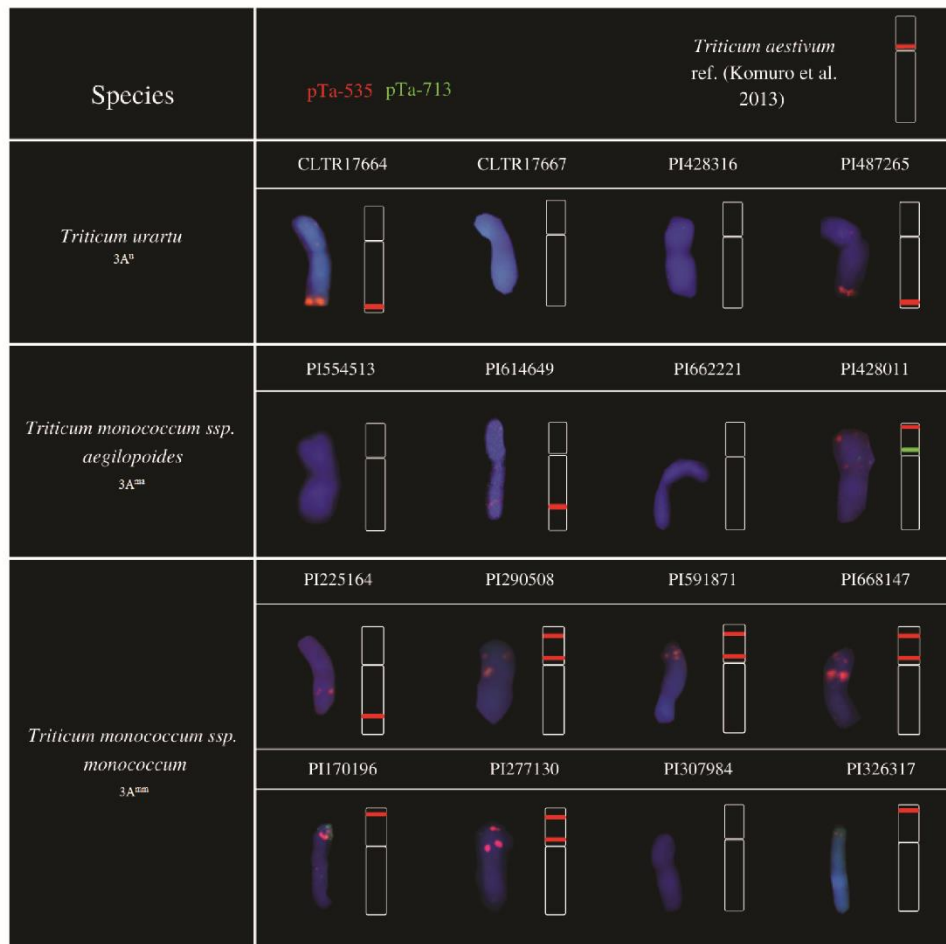
According to Kwiatek et al. [30], FISH was carried out with modifications. The repeat sequences of pTa-86, pTa-535, and pTa-713 were used as molecular probes. The hybridization mixture (10  $\mu$ L/slide) contained: 50% formamide, 20% dextran sulphate, 10% 20 $\times$ SSC, and 5% salmon sperm DNA and molecular probes. It was denatured at 70 °C for 10 min, 75 °C for 3 min, and then stored on ice for 10 min. Chromosomal DNA was denatured for 4 min at 70 °C with a hybridization mix and allowed to hybridize for 24 h at 37 °C. Digoxigenin-11-dUTP detection was conducted using antidigoxigenin-fluorescein antibody (Roche). Specific chromosomes were identified by comparing signal patterns and by comparing them to Komuro's et al. [29] work. Slides were analyzed at 1000 $\times$  using a Delta Optical FMA050 microscope with a DLT-Cam PRO 12MP camera and DLT-Cam Viewer software. Image editing and karyotyping were performed using Adobe Photoshop C6 software.

## 3. Results

### 3.1. Intraspecific Polymorphism of Chromosome Markers

We performed a cytogenetic analysis based on the following probes: pTa-713, pTa-535, and pTa-86. All molecular probes provided signals on chromosomes of diploid wheat. FISH-painted chromosomes were categorized according to Komuro et al. [29]. The hybridization of the pTa-535 probe to chromosomes of einkorn species revealed clear and highly specific labeling patterns. All chromosomes carried 1–2 hybridization sites in chromosome-specific positions, although some intraspecific variation in signal localization and intensity has been observed. Hybridization patterns of pTa-86 in *T. urartu*, *T. monococcum* ssp. *Aegilopoides*, and *T. monococcum* ssp. *Monococcum* were absent. In the *T. urartu* hybridization patterns of pTa-535, only two genotypes (CLTR17664 and PI487265) were observed on chromosome 3A<sup>u</sup> in distal regions of long arms (Figure 1). The hybridization of the pTa-535 probe on the *T. monococcum* ssp. *Aegilopoides* chromosome revealed one very small signal in the subtelomeric region of the long arm in accession PI614649. A similar pattern was observed in the distal part of the short arm in genotype PI428011 of *T. boeoticum*, and the additional hybridization sites of pTa-713 were found in the pericentromeric region (Figure 1).

Similar signal distributions of pTa-535 were observed in four accessions of *T. monococcum* ssp. *monococcum* (PI290508, PI591871, PI668147, and PI277130); one signal in the pericentromeric region of chromosome 3A in the hexaploid wheat overlap with sites of these accessions and the other pattern was noticed in the distal part of the short arms of chromosome 3A<sup>mm</sup>. Two accessions (PI170196 and PI326317) contained signals located in the subtelomeric region of the short arm. A weak signal was found in genotype PI225164 of einkorn in the subtelomeric region of chromosome 3A<sup>mmL</sup> (Figure 1). In accessions CLTR17667, PI428316 (*T. urartu*); PI554513, PI662221 (*T. monococcum* ssp. *aegilopoides*), and PI307984 (*T. monococcum* ssp. *monococcum*), we observed a lack of hybridization patterns of pTa-535 and pTa-713 (Figure 1).

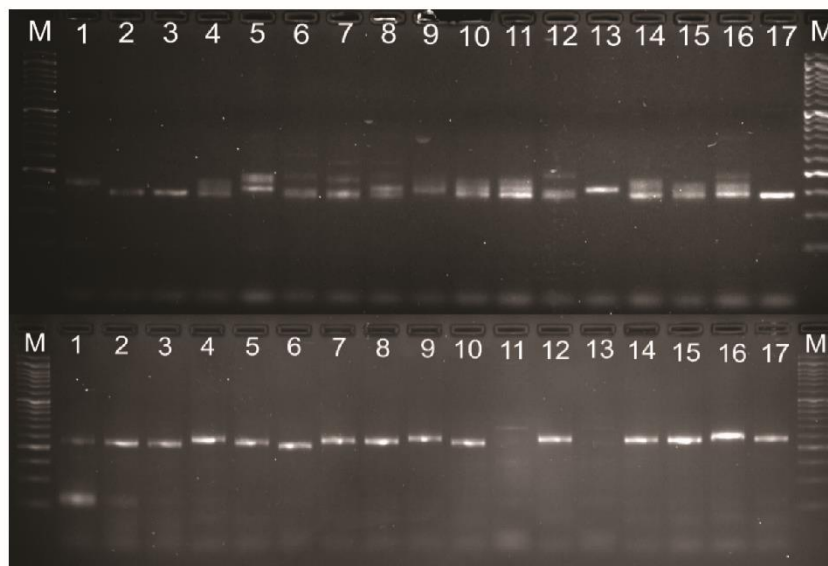


**Figure 1.** Chromosomes 3A after FISH with pTa-713 (green) and pTa-535 (red) probes of CLTR17664, CLTR17667, PI428316, PI487265, PI554513, PI614649, PI662221, PI428011, PI225164, PI290508, PI591871, PI668147, PI170196, PI277130, PI307984, and PI326317.

### 3.2. Polymorphism of *Lr63* Loci

In parallel to the cytogenetic analysis, we analyzed the allelic variation in the *Lr63* leaf rust resistance loci at chromosome 3A (Figure 2). The expected specific product for marker *Xbarc321* was 191 bp according to Kolmer et al. [7]. In this experiment, 11 genotypes (PI 225164, PI 428011, PI 554513, PI 668147, PI 277130, PI 614649, PI 290508, PI 662221, PI 170196, PI 326317, and PI 591871) revealed PCR products, which were identical to one specific to GSTR 444 (reference genotype to locus *Lr63*) (Table 1 and Figure 2). Moreover, *Xbarc57* was used as the second marker in order to analyze the *Lr63* locus. Compared to the reference genotype (GSTR 444), the expected 240 bp products were identified in 11 genotypes (CLTR 17667, PI 428316, PI 428011, PI 668147, PI 277130, PI 290508, PI 307984, PI 170196, PI 326317, PI 591871, and PI 487265) (Table 1, Figure 2). The comparison of *Xbarc321* and *Xbarc57* marker analyses showed that both markers allowed to identify the *Lr63* gene locus in seven genotypes. Among them, six genotypes were considered as domesticated forms (*Triticum monococcum* subsp. *monococcum*) (PI 668147, PI 277130, PI 290508, PI 170196, PI 326317,

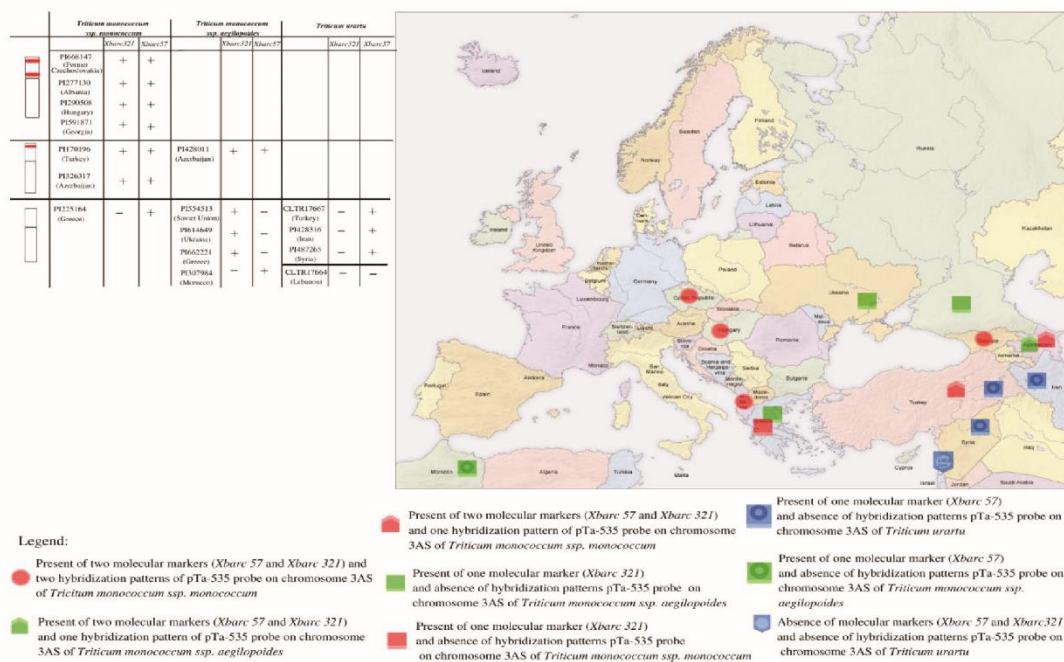
and PI 591871) and one was a nondomestication form (PI 428011) (*Triticum monococcum* subsp. *aegilopoides*).



**Figure 2.** PCR amplification products of wheat genotypes with *xbarc321* and *xbarc57* markers linked to *Lr63* locus. M-50 bp DNA Ladder (NIPPON Genetics EUROPE GmbH); 1–17—wheat genotypes.

### 3.3. Rearrangements of Short Arm of 3A Chromosome

Taking into consideration the presence of molecular markers (*Xbarc321* and *Xbarc57*) and the signals of the pTa-535 probe on chromosome 3A of the short arm, it was possible to divide the accessions into three groups (Figure 3). The first group included seven genotypes carrying *Lr63* markers and possessed hybridization patterns on chromosome 3A. These accessions were as follows: PI 428011, PI 668147, PI 277130, PI 290508, PI 170196, PI 326317, and PI 591871, originating from Azerbaijan, Czechoslovakia, Albania, Hungary, Turkey, Azerbaijan, and Georgia (Figure 3). The genotypes in the second group were characterized by the presence of one marker (*Xbarc321* or *Xbarc57*) and the absence of the pTa-535 probe signal, including CLTR 17667, PI 428316, PI 225164, PI 554513, PI 614649, PI 662221, PI 307984, and PI 487265, originating from Turkey, Iran, Greece, the Soviet Union, Ukraine, Greece, Morocco, and Syria (Figure 3). One accession (CLTR 17664 from Lebanon), included in the last group, revealed the absence of *Lr63* markers and hybridization signals (Figure 3).



**Figure 3.** Geographical distribution of the studied accessions divided into three groups according pTa-535 signal location, as well as molecular markers, the presence of a particular amplification product.

**4. Discussion**

Revealing how domestication and selection impact disease-related genes is one of the crucial issues in plant genetics connected to resistance breeding. It has been reported that hexaploid wheat originated due to two hybridization events [32]. First, two wild species, *Triticum urartu* (A-genome donor) and an extinct species from the *Sitopsis* section (*B-genome* donor), hybridized and formed wild tetraploid wheat (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides*). After the domestication of this wild form to cultivated tetraploid wheat (*T. turgidum* ssp. *dicoccum*), a second hybridization occurred with the wild grass *Ae. tauschii* (D-genome donor) resulting in the hexaploid wheat. The evolution of the resistance genes of wheat can be determined with comparative analyses and the allele mining of diverse germplasms. For example, the leaf rust resistance gene *Lr10* (located on chromosome arm 1AS) was cloned from bread cv. Thatcher *Lr10* [33]. It was reported that diploid (*T. urartu*; A-genome donor) and tetraploid (wild and domesticated) wheats carry a homologous sequence of *Lr10*, which has two haplotypes at the *Lr10* locus [34]. What is more, [35] suggested a balanced polymorphism and maintenance of both haplotypes of the *Lr10* gene sequence in the wheat gene pool, which is similar to the evolutionary pathway of genes in other species, such as *Rpm1* in *Arabidopsis*.

It is known that *T. monococcum* subsp. *aegilopoides*, *T. monococcum* subsp. *Monococcum*, and *T. urartu* carry the genome A, which is the axial subgenome for all wheats (*Triticum* sp.) [32]. Genes from these species can be introduced into wheat using direct crossing and chromosomal recombination. Diversified collections of these species are present in nature, widely distributed in different regions. The domestication of the diploid wheat *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* was located in the geographical region of the Karaca Dağ (Karacadağ) volcanic mountain, located in present-day south-eastern Turkey [18]. The wild form was first harvested and then transported to different geographical areas and cultivated there. Transport involved migrating farmers or exchanging seeds for other material goods,

because not all soils in the “Fertile Crescent” area were adjusted to cultivate crops. The directions of the early spread of diploid wheat included areas of present-day Turkey, Iraq, Syria, and Iran. In the later phase of agricultural expansion, crops were transported in an already nascent state of domestication [18,36]. According to Kolmer et al. [7], only one gene resistant to leaf rust (*Lr63*) has been mapped on the short arm of chromosome 3A<sup>m</sup>. The short arm of the 3A<sup>m</sup> chromosome is also a region, where the main QTL for seed dormancy [37] *FLOWERING LOCUS T (FT)*-like, *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)*-like, and *MFT*-like [38] is located. Those loci are considered to be the most agronomically important traits considering crop domestication. It could, therefore, be stated that the selection pressure could alter this chromosome region with particular intensity. After all, it is known that in the transition from gathering to cultivation, early farmers selected CWRs with useful genetic modifications and developed improved populations with desirable traits [39]. The abovementioned traits, as well as the loss of seed dispersal mechanisms, increased grain size, the loss of vulnerability to environmental factors for germination and flowering, synchronous ripening, and a compact growth habit are included in the “domestication syndrome” characters, which are the most important adaptive traits selected by mankind [40]. In this research, we observed the presence of two markers (*Xbarc321* and *Xbarc57*) and hybridization patterns of probe pTa-535 on chromosome 3A accessions, which strongly indicated intra- and interspecific polymorphisms. The direction of the expansion of the first group of accessions proved the later phase of agricultural spread. The second group allowed to prove the early spread of einkorn, through directions of expansion and intra- and interspecific polymorphisms. The third group (*T. urartu*) was never domesticated and located near the Fertile Crescent. According to our cytogenetic observations, it could be stated that a similar organization of the 3A<sup>m</sup> chromosome (lack of pTa-535 signals and lack of one or two SSR markers) of *T. monococcum* spp. *monococcum* and *T. monococcum* spp. *aegilopoides* compared to *T. urartu* was observed only in accessions collected from the regions which were located closely to the domestication centers of einkorn wheat (Turkey, Azerbaijan, Greece, and Ukraine). Additional pTa-535 signals which appeared on the short arm of the 3A<sup>m</sup> chromosome were observed in the accessions, which revealed both markers linked to *Lr63* loci. Interestingly, those accessions were collected near the domestication center of *T. monococcum* (Turkey), as well as in central Europe (Hungary, former Czechoslovakia, and Albania), and Georgia. Hence, it could be stated that forms belonging to the first and second groups were more prone to be selected and perform desirable domestication traits. Both repetitive sequence redundancies and proximities to genes were reported to vary between cultivated and wild genotypes [41,42]. Such differences suggest the potential function of repetitive sequences in crop domestication. For example, differences in the proximity of retrotransposons to genes could contribute to the significant phenotypic differences between wild and cultivated sunflowers [43]. Recently, Ebrahizadegan et al. [44] reported that different classes of repetitive DNA sequences have differentially accumulated between *Aegilops tauschii* subsp. *strangulata* and the other two subspecies of *Ae. tauschii* that were in parallel with spike morphology, implying that factors affecting the so called “repeatome” evolution are variable even among highly closely related lineages. In our study, we observed that both markers linked with *Lr63* loci were present only in those accessions which revealed one or two additional pTa-535 sites. This chromosome organization pattern was characteristic to most of the *T. monococcum* subsp. *monococcum* accessions. Anker et al. [45] proposed that *Triticum monococcum* has a nonhost status to the pathogens responsible for leaf rust, and showed that *Triticum monococcum* subsp. *monococcum* is more rust-resistant compared to *Triticum monococcum* subsp. *aegilopoides* and *Triticum urartu* [45].

## 5. Conclusions

Considering that new virulence pathotypes and races keep on appearing constantly, one of the key challenges for wheat breeders is the systematic development of new, elite varieties carrying effective resistance genes. In the description of the domestication model

of diploid wheat, Kilian et al. [36] reported that einkorn wheat retained a high level of genetic diversity in the domesticated lines, which can be used to improve common wheat. Alterations and reorganization of the repetitive DNA sequences are the strongest indications of evolution and speciation processes. Therefore, the identification of polymorphisms in chromosome structures of different accessions of einkorn wheat may be helpful in further basic and application research.

**Author Contributions:** M.T.K. initiated the project. A.N. conducted the experiments and analyses. A.N. and R.B. wrote the first draft of the manuscript. M.T.K. revised the draft and improved the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This publication was co-financed by the framework of the Ministry of Science and Higher Education program as “Regional Initiative Excellence” in years 2019–2022, project No. 005/RID/2018/19.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to acknowledge Harrold Bockelman at the USDA/ARS Small Grains Laboratory, (Aberdeen, ID, USA), for providing the seed samples.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Harlan, J.R.; de Wet, J.M.J. Toward a Rational Classification of Cultivated Plants. *TAXON* **1971**, *20*, 509–517. [CrossRef]
- Dempewolf, H.; Baute, G.; Anderson, J.; Kilian, B.; Smith, C.; Guarino, L. Past and Future Use of Wild Relatives in Crop Breeding. *Crop Sci.* **2017**, *57*, 1070–1082. [CrossRef]
- Feldman, M.; Levy, A.A. Origin and Evolution of Wheat and Related Triticeae Species. In *Alien Introgression in Wheat*; Molnár-Láng, M., Ceoloni, C., Doležel, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 21–76. ISBN 978-3-319-23493-9.
- Badaeva, E.D.; Amosova, A.V.; Goncharov, N.P.; Macas, J.; Ruban, A.S.; Grechishnikova, I.V.; Zoshchuk, S.A.; Houben, A. A Set of Cytogenetic Markers Allows the Precise Identification of All A-Genome Chromosomes in Diploid and Polyploid Wheat. *Cytogenet Genome Res.* **2015**, *146*, 71–79. [CrossRef]
- Prasad, P.; Savadi, S.; Bhardwaj, S.C.; Gupta, P.K. The Progress of Leaf Rust Research in Wheat. *Fungal Biol.* **2020**, *124*, 537–550. [CrossRef] [PubMed]
- McIntosh, R.A.; Dubcovsky, J.; Rogers, W.J.; Morris, C.; Xia, X.C. Catalogue of Gene Symbols For Wheat: 2017 Supplement. 20. Available online: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf> (accessed on 30 March 2022).
- Kolmer, J.A.; Anderson, J.A.; Flor, J.M. Chromosome Location, Linkage with Simple Sequence Repeat Markers, and Leaf Rust Resistance Conditioned by Gene *Lr63* in Wheat. *Crop Sci.* **2010**, *50*, 2392–2395. [CrossRef]
- Childe, V.G. The Origin of Neolithic Culture in Northern Europe. *Antiquity* **1949**, *23*, 129–135. [CrossRef]
- Diamond, J. Evolution, Consequences and Future of Plant and Animal Domestication. *Nature* **2002**, *418*, 700–707. [CrossRef]
- Diamond, J.; Bellwood, P. Farmers and Their Languages: The First Expansions. *Science* **2003**, *300*, 597–603. [CrossRef]
- Skoglund, P.; Malmström, H.; Raghavan, M.; Storå, J.; Hall, P.; Willerslev, E.; Gilbert, M.T.P.; Götherström, A.; Jakobsson, M. Origins and Genetic Legacy of Neolithic Farmers and Hunter-Gatherers in Europe. *Science* **2012**, *336*, 466–469. [CrossRef]
- Meyer, R.S.; DuVal, A.E.; Jensen, H.R. Patterns and Processes in Crop Domestication: An Historical Review and Quantitative Analysis of 203 Global Food Crops. *New Phytol.* **2012**, *196*, 29–48. [CrossRef]
- Beissinger, T.M.; Wang, L.; Crosby, K.; Durvasula, A.; Hufford, M.B.; Ross-Ibarra, J. Recent Demography Drives Changes in Linked Selection across the Maize Genome. *Nat. Plants* **2016**, *2*, 16084. [CrossRef] [PubMed]
- Kantar, M.B.; Nashoba, A.R.; Anderson, J.E.; Blackman, B.K.; Rieseberg, L.H. The Genetics and Genomics of Plant Domestication. *BioScience* **2017**, *67*, 971–982. [CrossRef]
- Yang, L.; Koo, D.-H.; Li, Y.; Zhang, X.; Luan, F.; Havey, M.J.; Jiang, J.; Weng, Y. Chromosome Rearrangements during Domestication of Cucumber as Revealed by High-Density Genetic Mapping and Draft Genome Assembly. *Plant. J.* **2012**, *71*, 895–906. [CrossRef] [PubMed]
- Chia, J.-M.; Song, C.; Bradbury, P.J.; Costich, D.; de Leon, N.; Doebley, J.; Elshire, R.J.; Gaut, B.; Geller, L.; Glaubitz, J.C.; et al. Maize HapMap2 Identifies Extant Variation from a Genome in Flux. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 803–807. [CrossRef]
- Wang, Y.; Xiong, G.; Hu, J.; Jiang, L.; Yu, H.; Xu, J.; Fang, Y.; Zeng, L.; Xu, E.; Xu, J.; et al. Copy Number Variation at the *GL7* Locus Contributes to Grain Size Diversity in Rice. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 944–948. [CrossRef]
- Kilian, B.; Ozkan, H.; Walther, A.; Kohl, J.; Dagan, T.; Salamini, F.; Martin, W. Molecular Diversity at 18 Loci in 321 Wild and 92 Domesticated Lines Reveal No Reduction of Nucleotide Diversity during *Triticum Monococcum* (Einkorn) Domestication: Implications for the Origin of Agriculture. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *24*, 2657–2668. [CrossRef]
- Heun, M.; Schäfer-Pregl, R.; Klawan, D.; Castagna, R.; Accerbi, M.; Borghi, B.; Salamini, F. Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting. *Science* **1997**, *278*, 1312–1314. [CrossRef]

20. Zaharieva, M.; Monneveux, P. Cultivated Einkorn Wheat (*Triticum Monococcum* L. Subsp. *Monococcum*): The Long Life of a Founder Crop of Agriculture. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2014**, *61*, 677–706. [[CrossRef](#)]
21. Nesbitt, M. From Staple Crop to Extinction? The Archaeology and History of Hulled Wheat. In *Hulled Wheats. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*; IPRGI: Serdang, Malaysia, 1996; pp. 1–100.
22. Nevo, E. Triticum. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*; Kole, C., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; pp. 407–456. ISBN 978-3-642-14227-7.
23. Filatenko, A.; Hammer, K. New Descriptions of Hulled Wheats on the Intraspecific Level. *Genet. Resour. Crop Evol.* **1997**, *44*, 285–288. [[CrossRef](#)]
24. Gill, B.S.; Friebe, B. Plant Cytogenetics at the Dawn of the 21st Century. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **1998**, *1*, 109–115. [[CrossRef](#)]
25. Pedersen, C.; Langridge, P. Identification of the Entire Chromosome Complement of Bread Wheat by Two-Colour FISH. *Genome* **1997**, *40*, 589–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Cuadrado, A.; Schwarzacher, T.; Jouve, N. Identification of Different Chromatin Classes in Wheat Using In Situ Hybridization with Simple Sequence Repeat Oligonucleotides. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, *101*, 711–717. [[CrossRef](#)]
27. Cuadrado, A.; Cardoso, M.; Jouve, N. Physical Organisation of Simple Sequence Repeats (SSRs) in Triticeae: Structural, Functional and Evolutionary Implications. *Cytogenet. Genome Res.* **2008**, *120*, 210–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Megyeri, M.; Farkas, A.; Varga, M.; Kovács, G.; Molnár-Láng, M.; Molnár, I. Karyotypic Analysis of *Triticum Monococcum* Using Standard Repetitive DNA Probes and Simple Sequence Repeats. *Acta Agron. Hung.* **2012**, *60*, 87–95. [[CrossRef](#)]
29. Komuro, S.; Endo, R.; Shikata, K.; Kato, A. Genomic and Chromosomal Distribution Patterns of Various Repeated DNA Sequences in Wheat Revealed by a Fluorescence In Situ Hybridization Procedure. *Genome* **2013**, *56*, 131–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kwiatek, M.; Majka, M.; Majka, J.; Belter, J.; Suchowilska, E.; Wachowska, U.; Wiwart, M.; Wiśniewska, H. Intraspecific Polymorphisms of Cytogenetic Markers Mapped on Chromosomes of *Triticum Polonicum* L. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158883. [[CrossRef](#)]
31. Gorięwa-Duba, K.; Duba, A.; Kwiatek, M.; Wiśniewska, H.; Wachowska, U.; Wiwart, M. Correction: Chromosomal Distribution of PTA-535, PTA-86, PTA-713, 35S RDNA Repetitive Sequences in Interspecific Hexaploid Hybrids of Common Wheat (*Triticum Aestivum* L.) and Spelt (*Triticum Spelta* L.). *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0203162. [[CrossRef](#)]
32. Venske, E.; Schreinert dos Santos, R.; Busanello, C.; Gustafson, P.; Costa de Oliveira, A. Bread Wheat: A Role Model for Plant Domestication and Breeding. *Hereditas* **2019**, *156*, 16. [[CrossRef](#)]
33. Feuillet, C.; Travella, S.; Stein, N.; Albar, L.; Nublat, A.; Keller, B. Map-Based Isolation of the Leaf Rust Disease Resistance Gene Lr10 from the Hexaploid Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15253–15258. [[CrossRef](#)]
34. Loutre, C.; Wicker, T.; Travella, S.; Gall, P.; Scofield, S.; Fahima, T.; Feuillet, C.; Keller, B. Two different CC-NBS-LRR genes are required for Lr10-mediated leaf rust resistance in tetraploid and hexaploid wheat. *Plant J.* **2009**, *60*, 1043–1054. [[CrossRef](#)]
35. Tian, D.; Traw, M.B.; Chen, J.Q.; Kreitman, M.; Bergelson, J. Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **2003**, *423*, 74–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Muehlbauer, G.J.; Feuillet, C. (Eds.) *Genetics and Genomics of the Triticeae*; Springer: New York, NY, USA, 2009; ISBN 978-0-387-77488-6.
37. Zhang, L.; Wang, S.; Li, H.; Deng, Q.; Zheng, A.; Li, S.; Li, P.; Li, Z.; Wang, J. Effects of Missing Marker and Segregation Distortion on QTL Mapping in F2 Populations. *Appl. Genet.* **2010**, *121*, 1071–1082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Nakamura, S.; Abe, F.; Kawahigashi, H.; Nakazono, K.; Tagiri, A.; Matsumoto, T.; Utsugi, S.; Ogawa, T.; Handa, H.; Ishida, H.; et al. A Wheat Homolog of Mother of FT and TFL1 Acts in the Regulation of Germination. *Plant. Cell.* **2011**, *23*, 3215–3229. [[CrossRef](#)]
39. Vaughan, D.A.; Balázs, E.; Heslop-Harrison, J.S. From Crop Domestication to Super-Domestication. *Ann. Bot.* **2007**, *100*, 893–901. [[CrossRef](#)]
40. Gao, L.; Zhao, G.; Huang, D.; Jia, J. Candidate Loci Involved in Domestication and Improvement Detected by a Published 90K Wheat SNP Array. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ramírez-González, R.H.; Borrill, P.; Lang, D.; Harrington, S.A.; Brinton, J.; Venturini, L.; Davey, M.; Jacobs, J.; van Ex, F.; Pasha, A.; et al. The Transcriptional Landscape of Polyploid Wheat. *Science* **2018**, *361*, eaar6089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bariah, I.; Keidar-Friedman, D.; Kashkush, K. Where the Wild Things Are: Transposable Elements as Drivers of Structural and Functional Variations in the Wheat Genome. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 585515. [[CrossRef](#)]
43. Mascagni, F.; Barghini, E.; Giordani, T.; Rieseberg, L.H.; Cavallini, A.; Natali, L. Repetitive DNA and Plant Domestication: Variation in Copy Number and Proximity to Genes of LTR-Retrotransposons among Wild and Cultivated Sunflower (*Helianthus Annuus*) Genotypes. *Genome Biol. Evol.* **2015**, *7*, 3368–3382. [[CrossRef](#)]
44. Ebrahimzadegan, R.; Orooji, F.; Ma, P.; Mirzaghaderi, G. Differentially Amplified Repetitive Sequences Among *Aegilops Tauschii* Subspecies and Genotypes. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 716750. [[CrossRef](#)]
45. Anker, C.C.; Niks, R.E. Prehaustorial Resistance to the Wheat Leaf Rust Fungus, *Puccinia Triticina*, in *Triticum Monococcum*. *Euphytica* **2001**, *117*, 209–215. [[CrossRef](#)]

**P2. Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.)**

**Noweiska A., Bobrowska R., Spychała J.,  
Tomkowiak A., Kwiatek M.T.**

*J Appl Genetics.* 64, 55–64 (2023).

<https://doi.org/10.1007/s13353-022-00745-5>



## Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.)

Aleksandra Noweiska<sup>1</sup> · Roksana Bobrowska<sup>1</sup> · Julia Spychała<sup>1</sup> · Agnieszka Tomkowiak<sup>1</sup> · Michał T. Kwiatek<sup>1</sup>

Received: 11 July 2022 / Revised: 4 December 2022 / Accepted: 22 December 2022 / Published online: 29 December 2022  
© The Author(s) 2022

### Abstract

Race-nonspecific resistance is a key to sustainable management of pathogens in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding. It is more durable compared to race-specific immunity, conferred by the major genes (R), which are often overcome by pathogens. The accumulation of the genes, which provide the resistance to a specific race of a pathogen, together with the introduction of race-non-specific resistance genes is the most effective strategy aimed at preventing the breakdown of genetically conditioned immunity. PCR markers improved the productivity and accuracy of classical plant breeding by means of marker-assisted selection (MAS). Multiplexing assays provide increased throughput, reduced reaction cost, and conservation of limited sample material, which are beneficial for breeding purposes. Here, we described the process of customizing multiplex PCR assay for the simultaneous identification of the major leaf rust resistance genes *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, and *Lr38*, as well as the slow rusting, race-nonspecific resistance genes: *Lr34* and *Lr68*, in thirteen combinations. The adaptation of PCR markers for multiplex assays relied on: (1) selection of primers with an appropriate length; (2) selection of common annealing/extension temperature for given primers; and (3) PCR mixture modifications consisting of increased concentration of primers for the scanty band signals or decreased concentration of primers for the strong bands. These multiplex PCR protocols can be integrated into a marker-assisted selection of the leaf rust-resistant wheat genotypes.

**Keywords** Molecular markers · Multiplex PCR · Leaf rust resistance · Slow rusting genes · Wheat

### Introduction

Leaf rust, caused by the causal fungus, *Puccinia triticina* Eriks. (syn. *P. recondita* Rob. ex Desmaz. f. sp. *tritici*), is one of the most common and damaging diseases of wheat worldwide (Huerta-Espino et al. 2011). Under optimal environmental conditions, the infection can significantly reduce the kernel weight and the number of kernels per ear, which reflects in the yield reduction, even up to 70% (Kolmer 1996; Chen et al. 2013).

More than 80 *Lr* (leaf rust) genes, 83 *Yr* (yellow rust) genes, and 63 *Sr* (stem rust) genes have been identified and referred in the Catalogue of Gene Symbols for Wheat (McIntosh 2019). Most of them belong to the group of major resistance genes (R genes) (Kolmer et al. 2008a, b). Several effective *Lr* resistance genes were successfully introduced into wheat from related species, such as: *Thinopyrum elongatum* (syn. *Agropyron elongatum*), *Th. intermedium* and *Secale cereale* (Cai et al. 2001, Zhang et al. 2010, Salina et al. 2015). The *Lr19* gene was transferred into the wheat genetic background from *Th. elongatum* and affects the plant hypersensitivity response and increases the grain yield (Gupta et al. 2006). *Th. elongatum* is also a source of the *Lr24* gene, which provides leaf resistance at seedling and adult plant stages (Rai et al. 2021; Schachermayr et al. 1995). Another *Thinopyrum* species, *Th. intermedium*, is a source of *Lr38* gene, which ensures a stable resistance of seedlings and adult plants to many isolates of *P. triticina*, which appeared in Europe. Another wheat relative, rye (*Secale cereale* L.), is a donor of the

Communicated by Izabela Pawłowicz.

✉ Michał T. Kwiatek  
michal.kwiatek@up.poznan.pl

<sup>1</sup> Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str, 60-632 Poznań, Poland

*Lr26* gene, which is present in many varieties of wheat carrying IRS.1BL chromosome translocation (Mesterházy et al. 2000; Mebrate et al. 2008; Salina et al. 2015).

Another type of resistance genes, called race-nonspecific or horizontal resistance genes, provide the durable resistance against all races of different pathogens (Ellis et al. 2014). In case of leaf rust, this type of resistance is manifested by the slow progression of the infection (Caldwell et al. 1968). So far, eight “slow rusting” genes have been identified in the wheat genome: *Lr34* (= *Yr18/Sr57/Pm38*), *Lr46* (= *Yr29/Sr58/Pm39*), *Lr67* (= *Yr46/Sr55/Pm46*), *Lr68*, *Lr74*, *Lr75*, *Lr77*, and *Lr78* (Suenaga et al. 2003, Singh et al. 1998, Hiebert et al. 2010, Herrera-Foessel et al. 2012, McIntosh et al. 2015, Singla et al. 2017, Kolmer et al. 2018a, b). The *Lr34* is the best known and characterized “slow rusting” loci (Dyck et al. 1987), which confers a partial resistance to leaf rust, as well as a moderate level of resistance to the stripe rust, caused by *Puccinia striiformis* (*Yr18*; McIntosh 1992, Singh 1992); powdery mildew, caused by *Blumeria graminis* (*Pm38*; Spielmeier et al. 2005); stem rust, caused *Puccinia graminis* (*Sr57*; Dyck 1992); and barley yellow dwarf virus (*Bdv1*, Singh 1993). The presence of the *Lr34* gene is also manifested by the appearance of leaf tip necrosis in certain environments, which can be used as a phenotypic assay for the presence of the gene (Dyck 1991; Singh 1992). The *Lr34* gene encodes a pleiotropic ATP-binding cassette (ABC) transporter, of the ABCG subfamily (Krattinger et al. 2009). Resistant and susceptible haplotypes can be distinguished by three single nucleotide polymorphisms (SNP) (Lagudah et al. 2009). Other slow rusting genes, *Lr46* and *Lr68*, were described in Pavon and Parula cultivars, respectively (Herrera-Foessel et al. 2012). Both genes showed a smaller effect than *Lr34*, but the combined effect of *Lr34*, *Lr46*, and *Lr68* can assure near immunity (Martinez et al. 2001). The effects of these genes when appearing alone, are moderate; however, they can be used as backbone genes in combinations and interactions with other major genes, resulting in high levels of durable resistance.

The selection of individuals is an important stage in wheat breeding. Currently, the classic selection is supported by the identification of molecular markers related to valuable traits. Although molecular techniques are highly specific, sensitive, and reliable, nevertheless they are expensive, laborious, and time-consuming. Multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) since its first description in 1988 (Chamberlain et al. 1988) has been successfully utilized in many areas of DNA testing. It allows the simultaneous amplification of two or more loci in one reaction (Henegariu et al. 1997a), which reduces the time and costs of investigation; hence, it has been applied in marker-assisted selection in breeding programs.

The aim of this work was to develop the multiplex PCR protocols for the simultaneous identification of the major leaf rust resistance genes *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, and *Lr38* together with the “slow rusting” genes *Lr34* and *Lr68* in various combinations, which can be used for the selection process in wheat breeding.

## Materials and methods

### Plant material and DNA isolation

The experimental material consisted of 8 accessions of spring wheat (Table 1), which were reported as sources of leaf rust resistance genes, including four near-isogenic lines of ‘Thatcher’ with single genes (*Lr 24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr38*); one spring wheat cv. ‘Chinese Spring’ which was used as negative control for *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, and *Lr38* and one spring wheat cv. ‘Artigas’ representing negative control for *Lr34* and *Lr68*. The plant material was obtained from the National Small Grains Germplasm Facility, National Small Grains Collection in Aberdeen, Idaho, USA. Seeds were plated for germination on Petri dishes. GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx Ltd., Poland) was used for DNA extraction from the leaf tissue of 10-day-old seedlings. Leaf tissue samples were finely ground in liquid

**Table 1** Presence of molecular markers in tested wheat (*T. aestivum* L.) genotypes

No	Cultivar/genotype	Plant ID	<i>Xwmc221</i> for <i>Lr19</i>	<i>Sr24#12</i> for <i>Lr24</i>	<i>P6M12</i> for <i>Lr26</i>	<i>Xwmc773</i> for <i>Lr38</i>	<i>csLv34</i> for <i>Lr34</i>	<i>csGs</i> for <i>Lr68</i>
1	Agatha	Cltr 14,048	+	–	–	+	–	–
2	Lr24	GSTR 425	–	+	–	–	–	–
3	Lr26	GSTR 427	–	–	+	+	–	–
4	Lr34	GSTR 433	–	–	–	–	+	–
5	Lr38	GSTR 437	–	–	–	+	–	–
6	Parula	PI 520,340	–	–	–	–	+	+
7	CIGM98.745–1	PI614023	+	–	+	+	–	–
8	Glenlea	Cltr 17,272	–	–	–	–	+	+

nitrogen and the remaining tissue structures were subsequently solubilized by lysis in the presence of a special buffer, which preserves the integrity and stimulates quantitative recovery of all traces of DNA. Further, proteinase K was used to digest contaminating proteins. “Sol-P” buffer and ethanol were added to provide selective conditions for DNA binding during brief centrifugation, while contaminants pass through the resin in the spin column. Traces of contaminants remaining on the resin were removed in two wash steps. The final DNA concentration after diluting the samples with Tris buffer (EURx Ltd., Poland) was 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

### Molecular markers and PCR reactions

In order to develop freely available multiplex PCR protocols, we have used molecular markers, as well as primer sets, which are accessible and were already published. The molecular markers sequences, sizes of amplified products, and references are presented in Table 2.

The initial PCR reaction was performed using FastGene® OptimaHotStart ReadyMix (NIPPON, Germany) according to the manufacturer’s protocol. PCR mixture consisted of 1.25  $\mu\text{g}$  of template DNA; PCR-grade  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\times$  FastGene® OptimaHotStart ReadyMix (NIPPON, Germany), and 1- $\mu\text{M}$  primers (Sigma-Aldrich, USA). PCR was performed using a Labcycler thermal cycler (SensoQuest GmbH). The PCR reaction was performed with the following cycling protocol: (a) initial denaturation of 3 min at 95 °C; (b) 35 cycles of denaturation of 30 s at 95 °C, primer annealing of 30 s at 5 °C lower than the calculated melting temperature ( $T_m$ ) of the given primer set; and elongation step of 1 min at 72 °C; and (c) a final elongation step of 7 min at 72 °C. The initial conditions of the PCR reaction were later developed by modifications of (1) primers’ concentrations and (2) annealing

temperatures, which were crucial to design functional multiplex PCR protocols.

The PCR amplification products were electrophoresed in 2% agarose (Bioshop, Canada Inc.) gel in 1  $\times$  TBE buffer (Bioshop, Canada Inc.) stained with 4  $\mu\text{l}$  of Midori Green Advanced DNA Stain (NipponGenetics Europe, Germany) per 100 ml and photographed under UV light in a Molecular Imager Gel Doc™ XR UV system with the Biorad Bio Image™ Software.

### Results

The optimization of the PCR method for multiplex PCR reaction design consisted of three phases: (1) selection of effective, available molecular markers for *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr38*, and *Lr68*, whose amplicons’ sizes allow to distinguish particular alleles in the multiplex assay; (2) adjustment of common annealing temperatures using gradient PCR; and (3) primers’ concentrations manipulation to obtain easy-to-interpret banding pattern on the gel.

### Selection of markers

All markers available in the literature were analyzed. Multiplex PCR assays involve a large number of primers; hence it is required that the designed primer should be of appropriate length. Here, primers of short length, in the range of 18–22 bases were used. Primer sets, that yield amplicons with the appropriate product sizes, which can be easily distinguished using standard agarose gel electrophoresis have been selected (Table 2).

**Table 2** Primer sequences and reaction details for PCR reactions with leaf rust resistance markers according to literature

Gene — marker	Primers sequences	Annealing temperature*	Product amplified	Sources
<i>Lr19</i> — <i>Xwmc221</i>	F: ACGATAATGCAGCGGGAAT R: GCTGGGATCAAGGGATCAAT	61 °C	200 bp (+) 220 bp (–)	Gupta i in. 2006
<i>Lr24</i> — <i>Sr24#12</i>	F: CACCCGTGACATGCTCGTAR: AACAGG AAATGAGCAACGATGT	65 °C	500 bp (+)	Mago et al. 2005a
<i>Lr26</i> — <i>P6M12</i>	F: GTACTAGTATCCAGAGGTCACAAG R: CAGACAAACAGAGTACGGGC	57 °C	260/360 bp (+)	Mago et al. 2005b
<i>Lr38</i> — <i>Xwmc773</i>	F: GAGGCTTGCATGTGCTTGA R: GCCAACTGCAACCGGTACTCT	61 °C	140/160 bp (+)	Mebrate et al. 2008
<i>Lr34</i> — <i>csLv34</i>	F: GTTGGTTAAGACTGG TGA TGG R: TGCTTGCTATTGCTGAATAGT	55 °C	150 bp (+) 230 bp (–)	Lagudah et al. 2006
<i>Lr68</i> — <i>csGs</i>	F: AAG ATT GTT CAC AGA TCC ATG TCA R: GAG TAT TCC GGC TCA AAA AGG	60 °C	385 bp (+)	Herrera-Fossel et al. 2012

\*Recommended annealing temperature according to the literature

### Annealing temperature

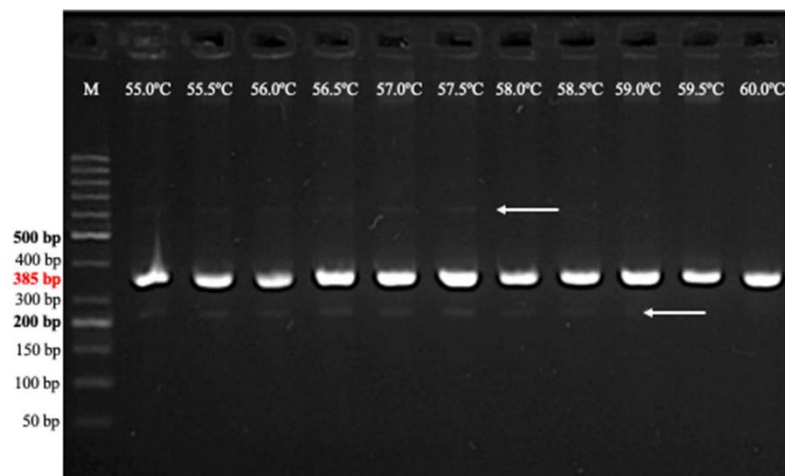
The next step was to analyze the interactions between primer sets in the course of multiplex PCR reaction. Primers with similar melting temperatures ( $T_m$ ), preferably between 55 and 65 °C were used (Table 2). Hence, further approaches were conducted in order to test the suitable annealing/extension temperatures by thermal gradient (Fig. 1). A  $T_m$  variation of between 5 and 10 °C was acceptable for primers used in a pool; hence, we have used the lowest annealing temperature (55 °C) for all combinations (Table. 3). However, lower annealing temperatures yielded some unspecific products (Fig. 1), which were eliminated by the modification of primers concentrations in the following step. The common temperature for annealing allowed to multiplex thirteen

marker combinations (Table 3), which could be used according to the need of the experiment or breeding program.

### Specificity

It is important to consider the specificity of primers to the target sequences, while preparing a multiplex assay, especially since competition exists when multiple target sequences are in a single reaction vessel. At first, the multiplex reactions were performed by adding primers in equimolar concentrations. Initially, equimolar primer concentrations of 1  $\mu\text{M}$  each were used in the multiplex PCR. The results suggested that individual primer concentrations need further modifications. In the case of *Lr24* loci, the multiplex assay adjustment process was initiated with the

**Fig. 1** Gradient of annealing temperature (55–60 °C) for *csGs* marker linked to *Lr68* gene. Arrows indicate the unspecific products, which were eliminated by the modification of primers concentrations. GeneRuler 50-bp DNA Ladder was used as DNA standard/ladder used to compare the various banding patterns



**Table 3** Reaction conditions for developed combinations of multiplex PCR

No	Combination	Concentrations [ $\mu\text{M}$ ] of each pair of primers	Annealing temperature
C1	<i>Lr19+Lr34</i>	0.8+0.8	55 °C
C2	<i>Lr24+Lr34</i>	0.8+0.8	
C3	<i>Lr19+Lr24+Lr34</i>	0.96+0.48+0.96	
C4	<i>Lr24+Lr34+Lr68</i>	0.56+1.04 $\mu\text{l}$ +0.8	
C5	<i>Lr19+Lr34+Lr68</i>	0.67+0.67+0.67	
C6	<i>Lr19+Lr24+Lr34+Lr68</i>	0.67+0.4+1.12+0.67	
C7	<i>Lr19+Lr26</i>	0.8+0.8	
C8	<i>Lr24+Lr26</i>	0.8+0.8	
C9	<i>Lr19+Lr24+Lr26</i>	0.8+0.8+0.8	
C10	<i>Lr19+Lr26+Lr38</i>	0.8+0.8+0.8	
C11	<i>Lr24+Lr26+Lr38</i>	0.56+1.04+0.8	
C12	<i>Lr19+Lr24+Lr26+Lr38</i>	0.8+0.48+1.12+0.8	
C13	<i>Lr19+Lr24+Lr26+Lr34+Lr68</i>	0.8+0.48+1.12+1.12+0.8	

*Xbarc71* marker that yields 103- or 85-bp products, linked with resistant or susceptible alleles, respectively (Table 2). However, the *Xbarc71* primers together with primers of other markers provided false amplicons or primer-amplicon interactions (Fig. 2a) or false amplification due to primer dimers (Fig. 2b). All approaches failed, so another marker, *Sr24#12*, was selected for *Lr24* loci identification. However, PCRs with more than two sets of primers resulted in uneven amplification, with some barely visible products or even absent (Fig. 3). To overcome these obstacles, we performed a set of PCR experiments with different proportions of primers in the reaction. The final concentration of the primers ranged between 0.4 and 1.5  $\mu\text{M}$ . Generally, the PCR mixture modification consisted of increased concentration of primers for the scanty band signals or decreased concentration of primers for the strong bands (Fig. 3a, b; Table 3). The above-mentioned alternations of PCR protocol allowed to perform

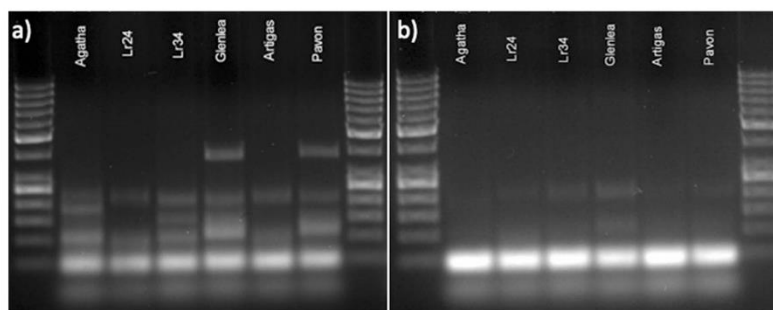
easy-to-interpret results of multiplex PCR reactions for thirteen combinations of primers (Table 3, Figs. 4, 5, and 6).

## Discussion

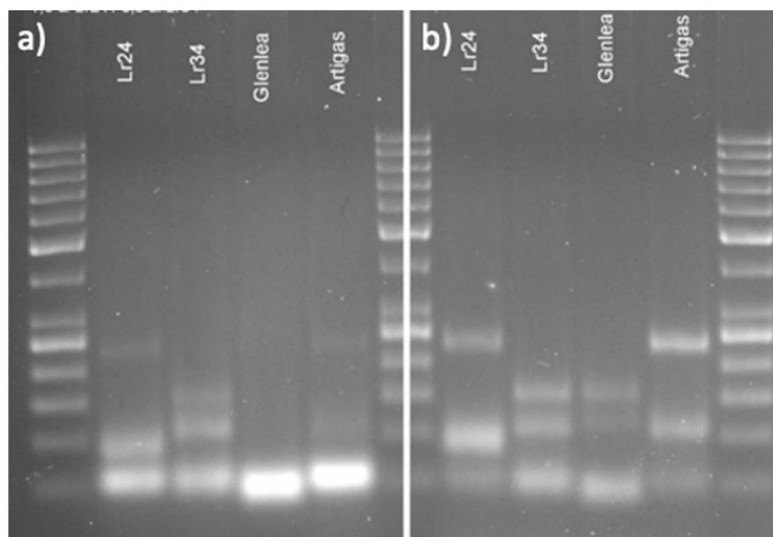
In this study, we have demonstrated a set of thirteen multiplex PCR marker combinations, which can be deployed in the process of marker-assisted selection. We have developed the multiplex PCR protocols for the most effective major genes (*Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, and *Lr38*) and slow rusting genes, including *Lr34* and *Lr68*, which are securing the durable resistance of wheat.

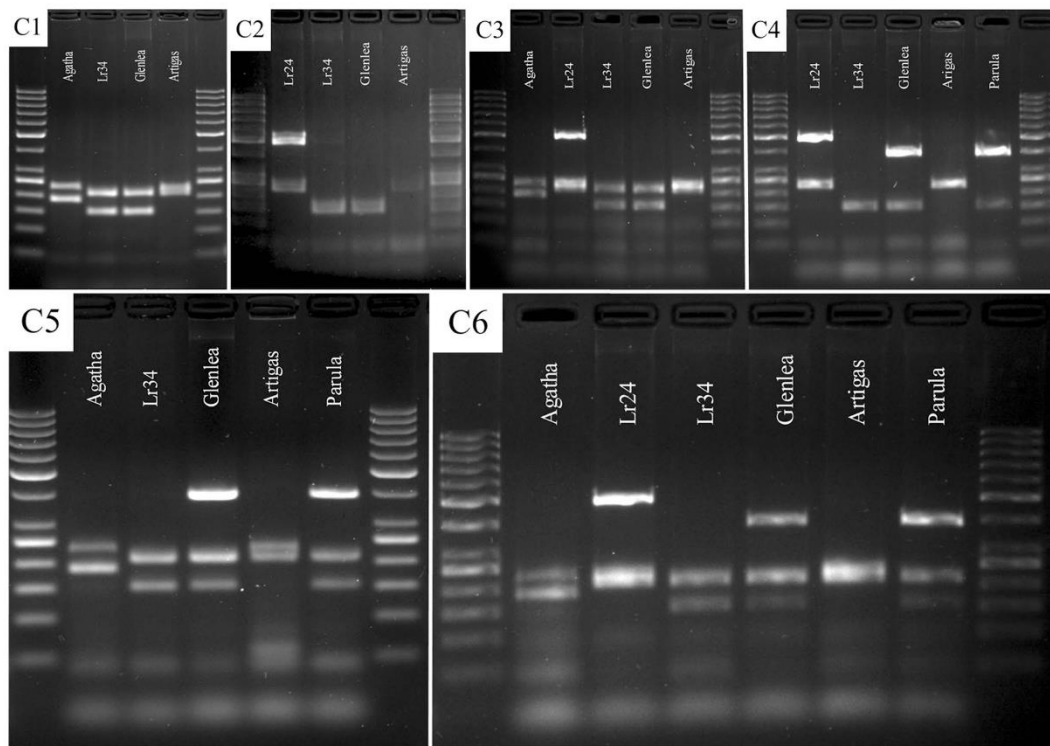
Optimization of the multiplex PCR is a challenging procedure, which is based mainly on a trial-and-error approach. In the literature, only few publications discuss the process of multiplex PCR protocol development (Chamberlain and

**Fig. 2** Electropherogram of multiplex PCR reaction for *Xbarc71* (*Lr24*) and *csLv34* (*Lr34*) markers showing **a** false amplicons or primer-amplicon interactions and **b** false amplification due to primer dimers. GeneRuler 50 bp DNA Ladder was used as DNA standard/ladder used to compare the various banding patterns



**Fig. 3** Modification of the concentration of primers for *Xbarc71* (*Lr24*) and *csLv34* (*Lr34*). Initial primers concentrations of **a** 1  $\mu\text{M}$  each and **b** 0.8  $\mu\text{M}$  each





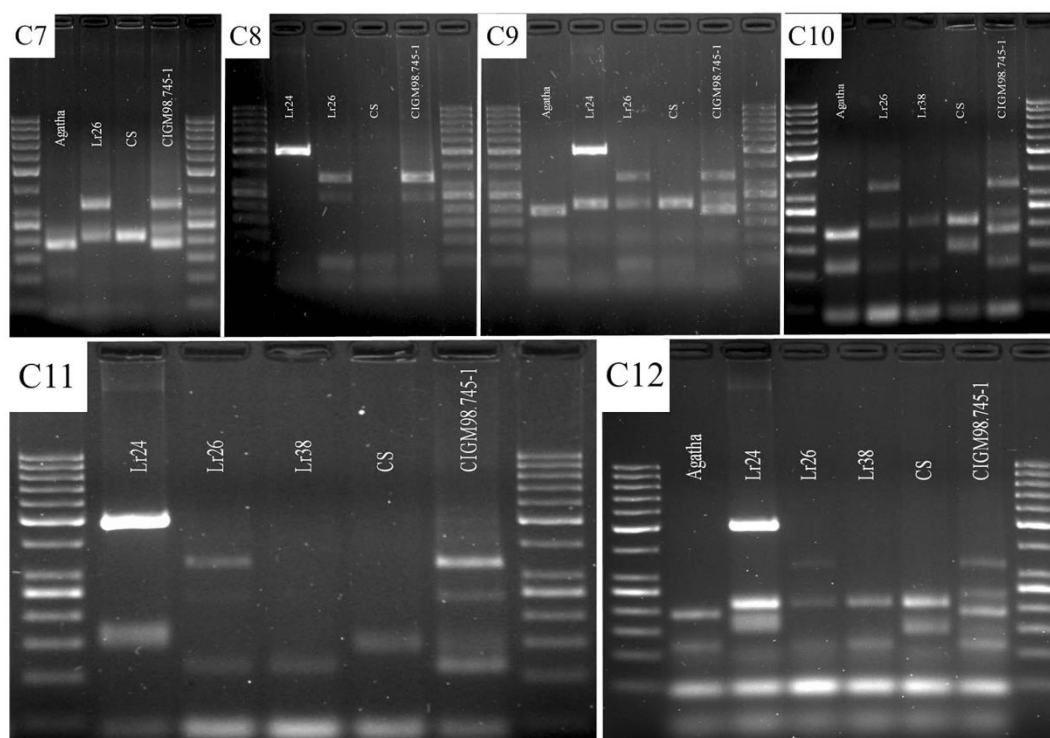
**Fig. 4** Electropherogram showing the presence of markers: *Xwmc221* (for *Lr19*), *Sr24#12* (*Lr24*), *csLv34* (*Lr34*), and *csGs* (*Lr68*) in wheat varieties in various combinations (C1–C6)

Chamberlain 1994; Edwards and Gibbs 1994; Henegariu et al., 2018).

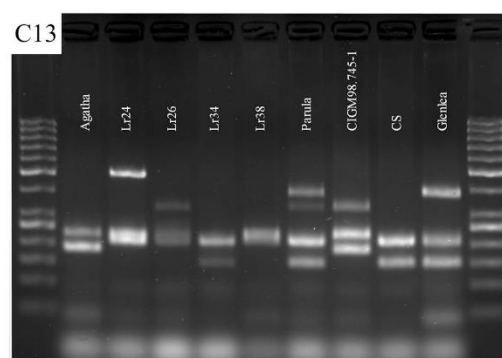
An initial solution to difficulties encountered in the development of multiplex PCR has been the use of hot start PCR (Chou et al. 1992). This type of enzyme eliminates non-specific reactions (particularly production of primer dimers) caused by primer annealing at low temperatures (4 to 25 °C) before commencement of thermocycling (Kebelmann-Betzting et al., 1998). Hence, in our study, we have used the OptimaHotStart polymerase, which is activated only if the reaction mixture is heated at approximately 95 °C for 10 min (the first denaturation step).

First cycles have a substantial effect on the overall sensitivity and specificity of PCR. The success of specific amplification relies on the primers annealing to their target and the rate at which annealed primers are extended along the desired sequence. Optimal annealing depends on primer length and GC content and their concentrations, as well as annealing temperature (Chamberlain & Chamberlain 1994). Thus, the majority of modifications to improve PCR performance have been directed towards the factors

affecting annealing and/or extension rates. The optimization of multiplex PCRs can raise several obstacles including poor sensitivity or specificity and/or preferential amplification of certain specific targets (Polz and Cavanaugh 1998). The presence of more than one primer pair in the multiplex PCR increases the chance of obtaining spurious amplification products, primarily because of the formation of primer dimers (Brownie et al. 1997). In the case of our experiment with *Lr24* and *Lr34* markers, these nonspecific products were amplified more efficiently than the desired target, consuming reaction components and producing impaired rates of annealing and extension. Thus, the optimization of multiplex PCR should aim to minimize or reduce such nonspecific interactions. This may be achieved through the utilization of primers with nearly identical optimum annealing temperatures (primer length of 18 to 30 bp or more and a GC content of 35 to 60% may prove satisfactory) and should not display significant homology either internally or to one another (Henegariu et al., 2018). Modifications including primers concentration as well as other PCR components such as PCR, dNTPs, and enzyme concentrations in multiplex PCR



**Fig. 5** Electropherogram showing the presence of markers: *Xwmc221* (for *Lr19*), *Sr24#12* (*Lr24*), *P6M12* (*Lr26*), and *Xwmc773* (*Lr38*) in wheat varieties in various combinations (C7–C12)



**Fig. 6** Electropherogram showing the presence of markers: *Xwmc221* (for *Lr19*), *Sr24#12* (*Lr24*), *P6M12* (*Lr26*), *csLv34* (*Lr34*), and *csGs* (*Lr68*) in wheat varieties in C13 combination

over those reported for most uniplex PCRs usually result in modest improvement in the specificity of the assay. Increasing the concentration of these factors may increase the likelihood of mis-priming with subsequent production of spurious nonspecific amplification products. However, optimization of these components in multiplex PCRs that are designed for simultaneous amplification of multiple targets may prove beneficial. For example, in the multiplex PCR for simultaneous detection of wheat and soybean, different ratios of primers concentrations were used for analysis of 21 different commercial food products (Shin et al. 2021).

Multiplex PCR become widely adopted within the plant breeding industry for high-throughput genotyping in a variety of applications, such as germplasm characterization and MAS (Yap et al. 2016), identification of genetically modified organisms (Bak and Emerson 2019) and pathology testing (Otti et al. 2016). It is a quick method that also allows to lower research costs and shortens the duration of the experiment. For example, Froidmont (1998) used multiplex PCR to identify 1BL/1RS translocation in wheat, together with the screening of resistance loci for yellow rust (*Yr9*), stem

rust (*Sr31*), leaf rust (*Lr26*), and powdery mildew (*Pm8*). Moreover, Sumiková and Hanzalová (2010) studied rust leaf resistance genes *Lr26* and *Lr37* and stated that the multiplex PCR method can be a breakthrough tool in identifying varieties resistant to the disease. Tomkowiak et al. (2019) developed a multiplex PCR protocol to accelerate the identification of efficient major leaf rust resistance genes: *Lr11*, *L13*, *Lr16*, and *Lr26* using the following molecular SSR markers: *Xwmc24*, *Xwmc261*, *Xgwm630*, *Xwmc764*, and *P6M12*, respectively. Multiplex PCR assays were also developed for simultaneous screening of slow rusting genes. Skowrońska et al. (2019) published a protocol for joint identification of *Lr34* and *Lr46*, and later, they improved the protocol by adding a molecular marker linked to another slow rusting gene, *Lr68* (Skowrońska et al. 2020). What is more, Lata et al. (2021) optimized a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for simultaneous detection of two important leaf rust resistance genes: seedling resistance gene *Lr24* and slow rusting gene *Lr68*.

In conclusion, in this study, we optimized and developed 13 combinations of multiplex PCR conditions for simultaneous identification of markers linked to both effective race-specific (*Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, and *Lr38*) and durable, non-specific leaf resistance genes (*Lr34* and *Lr68*). These protocols can be used to accelerate the marker-assisted resistance breeding of common wheat, which meet the recent expectations of the breeders.

**Acknowledgements** The authors would like to acknowledge and thank Harold Bockelman at the USDA/ARS Small Grains Laboratory, Aberdeen (ID, USA) for providing the seeds samples.

**Author contribution** MK initiated the project. AN made the experiments and analyses. RB AN and MK wrote the first draft and incorporated all inputs from co-authors. RB, JS, and AT supervised the analyses. MK revised the draft and made improved the manuscript. MK is the corresponding author and revised the manuscript.

**Funding** This research is financed by the framework of Ministry of Agriculture and Rural Development (Poland) program: “Biological Progress in Plant Production” in years 2021–2027, task no. 5: “A molecular analysis of an adult plant slow rusting genes conferring resistance to rusts caused by *Puccinia* sp.” (KS.zb.802.10.2021); Project leader: M.T. Kwiatek.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will

need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Anikster YE, Bushnell WR, Roelfs AP, Eilam T, Manisterski J (1997) *Puccinia recondita* causing leaf rust on cultivated wheats, wild wheats, and rye. *Can J Bot* 75(12):2082–2096. <https://doi.org/10.1139/b97-919>
- 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>
- Bhavani S, Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Randhawa MS (2022) Wheat rusts: current status, prospects of genetic control and integrated approaches to enhance resistance durability. In *Wheat Improvement* (pp. 125–141). Springer, Cham.
- Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF (2008) Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Mol Plant Pathol* 9(5):563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x>
- 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 Res* 25(16):3235–3241. <https://doi.org/10.1093/NAR/25.16.3235>
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, Schulze-Lefert P (1997) The barley *Mto* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88(5):695–705. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81912-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81912-1)
- Cai X, Jones SS, Murray TD (2001) Molecular cytogenetic characterization of *Thinopyrum* genomes conferring perennial growth habit in wheat-*Thinopyrum* amphiploids. *Plant Breed* 120:21–26. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00560.x>
- Caldwell RM (1968) Breeding for general and/or specific plant disease resistance. *Third Int. Wheat Genetics Symposium*. pp. 263–272
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Thomas C (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16(23):11141–11156. <https://doi.org/10.1093/nar/16.23.11141>
- 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)
- Chen W, Liu T, Gao L (2013) Suppression of stripe rust and leaf rust resistances in interspecific crosses of wheat. *Euphytica* 192(3):339–346. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0854-2>
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res* 20(7):1717–1723. <https://doi.org/10.1093/NAR/20.7.1717>
- De Froidmont D (1998) A co-dominant marker for the 1BL/1RS wheat-rye translocation via multiplex PCR. *J Cereal Sci* 27(3):229–232. <https://doi.org/10.1006/jcsc.1998.0194>
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11(8):539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dyck PL (1987) The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Genome* 29:467–469. <https://doi.org/10.1139/g87-081>

- Dyck PL (1991) Genetics of adult plant leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. *Crop Sci* 32:874–878. <https://doi.org/10.1007/BF00023766>
- Dyck PL (1992) Transfer of a gene for stem rust resistance from *Triticum araraticum* to hexaploid wheat. *Genome* 35(5):788–792. <https://doi.org/10.1139/g92-120>
- Edwards MC, Gibbs RA (1994) Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Res* 3(4):S65–S75. <https://doi.org/10.1101/GR.3.4.S65>
- Ellis JG, Lagudah ES, Spielmeier W, Dodds PN (2014) The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Front Plant Sci* 5:641. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00641>
- Erenstein O, Jaleta M, Mottaleb KA, Sonder K, Donovan J, Braun HJ. (2022). Global trends in wheat production, consumption and trade. In: Reynolds, M.P., Braun, HJ. (eds) *Wheat improvement*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-90673-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-90673-3_4)
- Ezzahiri B, Roelfs AP (1989) Inheritance and expression of adult plant resistance to leaf rust in era wheat. *Plant Dis* 73:549–551. <https://doi.org/10.1094/PD-73-0549>
- Fu D, Uauy C, Distelfeld A, Blechl A, Epstein L, Chen X, Dubcovsky J (2009) A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323(5919):1357–1360. <https://doi.org/10.1126/science.11662>
- Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Yano M (2009) Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325(5943):998–1001. <https://doi.org/10.1126/science.1175550>
- Gill BS, Friebe B (1998) Plant cytogenetics at the dawn of the 21st century. *Curr Opin Plant Biol* 1(2):109–115. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80011-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80011-3)
- Gupta SK, Charpe A, Prabhu KV, Haque QMR (2006) Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Theor Appl Genet* 113(6):1027–1036. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0362-7>
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23(3):504–511. <https://doi.org/10.2144/97233rr01>
- Herrera-Foessel SA, Singh RP, Huerta-Espino J, Rosewarne GM, Periyannan SK, Viccars L, Lagudah ES (2012) *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genet* 124(8):1475–1486. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1802-1>
- Hiebert CW, Thomas JB, McCallum BD, Humphreys DG, DePauw RM, Hayden MJ, Spielmeier W (2010) An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher\* 6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*). *Theor Appl Genet* 121(6):1083–1091. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1373-y>
- Huerta-Espino J, Singh RP, German S, McCallum BD, Park RF, Chen WQ, Bhardwaj SC, Goyeau H (2011) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica* 179(1):143–160. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x>
- Huerta-Espino J, Singh R, Crespo-Herrera LA, Villaseñor-Mir HE, Rodríguez-García MF, Dreisigacker S, Barcenás-Santana D, Lagudah E (2020) Adult plant slow rusting genes confer high levels of resistance to rusts in bread wheat cultivars from Mexico. *Front Plant Sci* 11:824. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00824>
- Kilpatrick RA (1975) New wheat cultivars and longevity of rust resistance, 1971–75. United States Department of Agriculture Economic Research Service NE. 64:1–20
- Kloppers FJ, Pretorius ZA (1997) Effects of combinations amongst genes *Lr13*, *Lr34* and *Lr37* on components of resistance in wheat to leaf rust. *Plant Pathol* 46:737–750. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-58.x>
- Kolmer JA (1996) Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu Rev Phytopathol* 34(1):435–455. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.435>
- Kolmer JA, Singh RP, Garvin DF, Viccars L, William HM, Huerta-Espino J, Lagudah ES (2008a) Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Sci* 48(5):1841–1852. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.08.0474>
- Kolmer JA, Singh RP, Garvin DF, Viccars L, William HM, Huerta-Espino J, Ogbonnaya FC, Raman H, Orford S, Bariana HS, Lagudah ES (2008b) Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Sci* 48:1841–1852. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.08.0474>
- Kolmer JA, Su Z, Bernardo A, Bai G, Chao S (2018) Mapping and characterization of the new adult plant leaf rust resistance gene *Lr77* derived from Santa Fe winter wheat. *Theor Appl Genet* 131:1553–1560. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3097-3>
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Keller B (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323(5919):1360–1363. <https://doi.org/10.1126/science.1166453>
- Krattinger SG, Sucher J, Selter LL, Chauhan H, Zhou B, Tang M, Keller B (2016) The wheat durable, multipathogen resistance gene *Lr34* confers partial blast resistance in rice. *Plant Biotechnol J* 14(5):1261–1268. <https://doi.org/10.1111/pbi.12491>
- Lagudah ES, Krattinger SG, Herrera-Foessel S, Singh RP, Huerta-Espino J, Spielmeier W, Keller B (2009) Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theor Appl Genet* 119(5):889–898. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1097-z>
- 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>
- Ledesma-Ramírez L, Solís-Moya E, Ramírez-Pimentel JG, Dreisigacker S, Huerta-Espino J, Aguirre-Mancilla CL, Mariscal-Amaro LA (2018) Relationship between the number of partial resistance genes and the response to leaf rust in wheat genotypes. *Chil J Agric Res* 78(3):400–408. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392018000300400>
- Mago R, Bariana HS, Dundas IS, Spielmeier W, Lawrence GJ, Pryor AJ, Ellis JG (2005a) Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theor Appl Genet* 111(3):496–504. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2039-z>
- Mago R, Miah H, Lawrence GJ, Wellings CR, Spielmeier W, Bariana HS, Ellis JG (2005b) High-resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes *Sr31*, *Lr26* and *Yr9* on the short arm of rye chromosome 1. *Theor Appl Genet* 112(1):41–50. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0098-9>
- Martinez F, Niks RE, Singh RP, Rubiales D (2001) Characterization of *Lr46*, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas* 135(2–3):111–114. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00111.x>
- McCallum BD, Hiebert CW (2022) Interactions between *Lr67* or *Lr34* and other leaf rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Front Plant Sci* 13:871970. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.871970>
- McCallum BD, Hiebert CW, Cloutier S, Bakkeren G, Rosa SB, Humphreys DG, Wang X (2016) A review of wheat leaf rust research and the development of resistant cultivars in Canada. *Can J Plant Pathol* 38(1):1–18. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1145598>
- McCallum BD, Reimer E, McNabb W, Foster A, Rosa S, Xue A (2021) Physiologic specialization of *Puccinia triticina*, the causal agent

- of wheat leaf rust, in Canada in 2015–2019. *Can J Plant Pathol* 43:S333–S346. <https://doi.org/10.1080/07060661.2021.1888156>
- McIntosh RA (1992) Pre-emptive breeding to control wheat rusts. *Euphytica* 63(1):3–113. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-0954-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0954-5_9)
- McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Appels R, Xia XC (2015) Catalogue of gene symbols for wheat: 2015–2016 supplement. <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2015.pdf>
- McIntosh R.A., J. Dubcovsky W.J. Rogers C. Morris i Xia X. C. (2019). Catalogue of gene symbols for wheat: 2019. <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>
- Mebrate SA, Oerke EC, Dehne HW, Pillen K (2008) Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers. *Euphytica* 162(3):457–466. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9615-z>
- Mesterházy Á, Bartoš P, Goyeau H, Níks R, Csősz M (2000) European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie* 20(7):793–804. <https://doi.org/10.1051/agro:2000104>
- Moskal K, Kowalik S, Podyma W, Łapiński B, Boczkowska M (2021) The pros and cons of rye chromatin introgression into wheat genome. *Agronomy* 11(3):456. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030456>
- Otti G, Bouvaine S, Kimata B, Mkamillo G, Kumar PL, Tomlins K, Maruthi MN (2016) High-throughput multiplex real-time PCR assay for the simultaneous quantification of DNA and RNA viruses infecting cassava plants. *J Appl Microbiol* 120(5):1346–1356. <https://doi.org/10.1111/jam.13043>
- Polz MF, Cavanaugh CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64(10):3724–3730
- Pretorius ZA, Singh RP, Wagoire WW, Payne TS (2000) Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis*. F. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Dis* 84(2):203–203
- Rai A, Ahlawat AK, Shukla RB, Jain N, Kumar RR, Mahendru-Singh A (2021) Quality evaluation of near-isogenic line of the wheat variety HD2733 carrying the *Lr24/Sr24* genomic region. *3 Biotech* 11(3):1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02679-x>
- Salina EA, Adonina IG, Badaeva ED, Kroupin PYu, Stasyuk AI, Leonova IN, Shishkina AA, Divashuk MG, Starikova EV, Khuat TML, Syukov VV, Karlov GI (2015) A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. *Euphytica* 204:91–101. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1344-5>
- Schachermayr GM, Messmer MM, Feuillet C, Winzeler H, Winzeler M, Keller B (1995) Identification of molecular markers linked to the Agropyron elongatum-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. *Theor Appl Genet* 90(7):982–990. <https://doi.org/10.1007/BF00222911>
- Schneider A, Molnár I, Molnár-Láng M (2008) Utilisation of Aegilops (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica* 163(1):1–19. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9624-y>
- Shin J, Kim MJ, Kim HY (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>
- Singh RP (1992) Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. *CropSci* 32(4):874–878. <https://doi.org/10.2135/cropsci1992.0011183X003200040008x>
- Singh RP (1993) Genetic association of gene *Bdv1* for tolerance to barley yellow dwarf virus with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rusts in bread wheat. *Plant Dis* 77(11):1103–1106. <https://doi.org/10.1094/PD-77-1103>
- Singh RP, Mujeeb-Kazi A, Huerta-Espino J (1998) *Lr46*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88(9):890–894. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.9.890>
- Singla J, Lüthi L, Wicker T, Bansal U, Krattinger SG, Keller B (2017) Characterization of *Lr75*: a partial, broad-spectrum leaf rust resistance gene in wheat. *Theor Appl Genet* 130(1):1–12. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2784-1>
- Skowrońska R, Kwiatek M, Tomkowiak A, Nawracała J (2019) Development of multiplex PCR to detect slow rust resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *J Appl Genet* 60(3):301–304. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z>
- Skowrońska R, Tomkowiak A, Szwarz 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. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.134914>
- Suenaga K, Singh RP, Huerta-Espino J, Williams HM (2003) Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology* 93(7):881–890. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.881>
- Sumikova T, Hanzalova A (2010) Multiplex PCR assay to detect rust resistance genes *Lr26* and *Lr37* in wheat. *Czech J Genet Plant* 46(2):85–89. <https://doi.org/10.17221/32/2010-CJGPB>
- Tomkowiak A, Skowrońska R, Buda A, Kurasiak-Popowska D, Nawracała J, Kowalczewski PŁ, Pluta M, Radzikowska D (2019) Identification of leaf rust resistance genes in selected wheat cultivars and development of multiplex PCR. *Open Life Sciences* 14(1):327–334. <https://doi.org/10.1515/biol-2019-0036>
- Villareal RL, Rajaram S, Mujeeb-Kazi A, Del Toro E (1991) The effect of chromosome 1B/1R translocation on the yield potential of certain spring wheats (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breed* 106(1):77–81. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1991.tb00482.x>
- Wilson RA, Talbot NJ (2009) Fungal physiology—a future perspective. *Microbiology* 155(12):3810–3815. <https://doi.org/10.1099/mic.0.035436-0>
- 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>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## **13. Oświadczenia autorów**

mgr inż. Aleksandra Noweiska  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

- Noweiska A, Bobrowska R, Kwiatek MT. Structural Polymorphisms of Chromosome 3A<sup>m</sup> Containing *Lr63* Leaf Rust Resistance Loci Reflect the Geographical Distribution of *Triticum monococcum* L. and Related Diploid Wheats. *Agriculture* (2022); 12(7):966

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przeprowadzeniu badań oraz napisaniu pierwszego szkicu manuskryptu.

- Noweiska A, Bobrowska R, Spychała J, Tomkowiak A, Kwiatek MT. Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Appl Genetics* (2023); 64, 55–64

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przeprowadzeniu badań oraz napisaniu pierwszego szkicu manuskryptu.

Data 14.09.2024.....

Podpis

Noweiska Aleksandra.....

prof. dr hab. Michał Kwiatek  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

- Noweiska A, Bobrowska R, Kwiatek MT. Structural Polymorphisms of Chromosome 3A<sup>m</sup> Containing *Lr63* Leaf Rust Resistance Loci Reflect the Geographical Distribution of *Triticum monococcum* L. and Related Diploid Wheats. *Agriculture* (2022); 12(7):966

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przygotowaniu projektu badań oraz opracowaniu finalnej wersji manuskryptu.

- Noweiska A, Bobrowska R, Spychała J, Tomkowiak A, Kwiatek MT. Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Appl Genetics* (2023); 64, 55–64

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przygotowaniu projektu badań i pierwszej wersji manuskryptu, nadzorowaniu analiz oraz opracowaniu finalnej wersji manuskryptu.

Data 17/09/2024

Podpis

Michał Kwiatek

mgr inż. Julia Spychała  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

- Noweiska A, Bobrowska R, Spychała J, Tomkowiak A, Kwiatek MT. Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Appl Genetics* (2023); 64, 55–64

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: nadzorowaniu analiz.

Data 17.09.2024.....

Podpis

Julia Spychała

dr inż. Roksana Bobrowska  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

- Noweiska A, Bobrowska R, Kwiatek MT. Structural Polymorphisms of Chromosome 3A<sup>m</sup> Containing *Lr63* Leaf Rust Resistance Loci Reflect the Geographical Distribution of *Triticum monococcum* L. and Related Diploid Wheats. *Agriculture* (2022); 12(7):966

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: napisaniu pierwszego szkicu manuskryptu.

- Noweiska A, Bobrowska R, Spychała J, Tomkowiak A, Kwiatek MT. Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Appl Genetics* (2023); 64, 55–64

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: napisaniu pierwszego szkicu manuskryptu oraz nadzorowaniu analiz.

Data 11.09.2024

Podpis

Roksana Bobrowska

dr hab. Agnieszka Tomkowiak, prof. UPP  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

- Noweiska A, Bobrowska R, Spychała J, Tomkowiak A, Kwiatek MT. Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Appl Genetics* (2023); 64, 55–64

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: nadzorowaniu analiz.

Data 17.09.2024.

Podpis

Agnieszka Tomkowiak