



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii

Julia Dominika Spychała

**Wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów
odporności u pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na porażenie przez
rdzę brunatną**

Multi-level analysis of molecular mechanisms of resistance in common wheat in
response to leaf rust infection

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk rolniczych
w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo
Doctoral dissertation in the field of agricultural sciences
in the discipline of agriculture and horticulture

Promotor:
Prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 2024

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej:

P1: Tomkowiak A., Bobrowska R., Kwiatek M.T., **Spychała J.***, Kuczyński J., Tyczewska A., Kowalczewski P.Ł., Weigt D., Kosiada T. (2023) Analysis of miRNA expression associated with gene *Lr34* responsible for resistance mechanisms to wheat leaf rust. *Pak. J. Bot.*, 55(1). [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-1\(6\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-1(6))

IF = 0,90; MEiN= 40 pkt

P2: Spychała 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, 1376. <https://doi.org/10.3390/genes14071376>

IF = 2,80; MEiN = 100 pkt

P3: Spychała J., Tomkowiak A.*, Noweiska A., Bobrowska R., Rychel-Bielska S., Bocianowski J., Wolko Ł., Kowalczewski P.Ł., Nowicki M.*, Kwiatek M.T. (2024) Expression patterns of candidate genes for the *Lr46/Yr29* “*slow rust*” locus in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and associated miRNAs inform of the gene conferring the *Puccinia triticina* resistance trait. *PLoS ONE* 19(9): e0309944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944>

IF = 2,90; MEiN = 100 pkt

P4: Spychała J., Tomkowiak A.*, Noweiska, A., Bobrowska R., Bocianowski J.*, Sobiech A., Kwiatek M.T. (2024) Diversity of Expression Patterns of *Lr34*, *Lr67* and Candidate Genes Towards *Lr46* with Analysis of Associated miRNAs in Common Wheat Hybrids in Response to *Puccinia triticina* Fungus. *Curr. Issues Mol. Biol* 2024, 46, 5511–5529. <https://doi.org/10.3390/cimb46060329>

IF = 2,80; MEiN = 70 pkt

Sumaryczny Impact Factor: 9,4

Suma punktów MEiN: 310

Składam serdeczne podziękowania

*Pani Promotor – za przekazaną wiedzę, możliwość rozwoju,
poświęcony czas i pomoc w realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej*

*Wszystkim współautorom publikacji
Pracownikom i Doktorantkom Katedry Genetyki i Hodowli Roślin*

*Drogim Rodzicom – za nieustające wsparcie i możliwość nauki
oraz Przyjaciółkom – za okazaną życzliwość i pomoc...*

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów.....	6
2. Streszczenie	8
3. Streszczenie w języku angielskim	9
4. Wprowadzenie	10
4.1. Produkcja pszenicy zwyczajnej i jej perspektywy	10
4.2. Utrzymanie zasobów genetycznych pszenicy	11
4.3. Złożoność genomu pszenicy alloheksaploidalnej.....	12
4.4. Zagrożenia w produkcji pszenicy	14
4.5. <i>Puccinia triticina</i> Eriks, sprawca rdzy brunatnej pszenicy	15
4.6. Wielopoziomowy system odpornościowy u roślin.....	15
4.7. Geny odporności na rdzę brunatną	17
4.8. Rola miRNA w reakcji odpornościowej pszenicy.....	19
5. Hipoteza badawcza i cel pracy	23
6. Materiały i metody	24
6.1. Materiał badawczy.....	24
6.2. Metody badawcze	26
6.2.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).....	26
6.2.1.1. Izolacja genomowego DNA z tkanki liściowej pszenicy	26
6.2.1.2. Identyfikacja markerów molekularnych.....	26
6.2.2. Przeprowadzenie inokulacji zarodnikami <i>Puccinia triticinia</i>	27
6.2.3. Analiza ekspresji genów (RT-qPCR)	27
6.2.3.1. Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji (synteza cDNA).....	27
6.2.3.2. Selekcja genów referencyjnych pszenicy	28
6.2.3.3. Projektowanie starterów do analizy RT-qPCR	28
6.2.3.4. Reakcja RT-qPCR	30
6.2.3.5. Przygotowanie amplikonów do sekwencjonowania Sanger.....	31
6.2.4. Analiza ekspresji cząsteczek miRNA, komplementarnych do sekwencji analizowanych genów (ddPCR)	32
6.2.4.1. Zaprojektowanie starterów i analiza ekspresji cząsteczek miRNA (ddPCR).....	32
6.2.4.2. Izolacja miRNA pszenicy i reakcja odwrotnej transkrypcji (synteza cDNA)	34
6.2.4.3. Reakcja ddPCR	34
6.2.5. Analiza statystyczna	35
7. Wyniki	36

7.1. Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z analizowanymi genami w badanych pokoleniach (P1, P2, P3, P4).....	36
7.2. Wybór formy donorowej pszenicy	39
7.3. Wyniki sekwencjonowania metodą Sangera	39
7.4. Analiza ekspresji genów <i>Lr34</i> i <i>Lr67</i> u odmian referencyjnych oraz komplementarnych miRNA (P2).....	43
7.5. Analiza ekspresji genów kandydujących dla <i>Lr46/Yr29</i> u odmian referencyjnych i komplementarnych miRNA (P3).....	45
7.6. Analiza ekspresji genów APR i komplementarnych miRNA u otrzymanych form mieszańcowych pokolenia F1 (P4).....	50
7.7. Analiza ekspresji genów u form mieszańcowych pszenicy pokoleń BC1F1 i F2.....	54
7.8. Analiza ekspresji miRNA form mieszańcowych pszenicy pokoleń BC1F1 i F2.....	62
8. Dyskusja	65
9. Podsumowanie i wnioski.....	76
10. Literatura.....	79
11. Wykaz publikacji wchodzących w skład zbioru.....	92
P1. ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION ASSOCIATED WITH GENE <i>Lr34</i> RESPONSIBLE FOR RESISTANCE MECHANISMS TO WHEAT LEAF RUST	93
P2. Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance Genes <i>Lr34/Yr18</i> and <i>Lr67/Yr46</i> in Common Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) and Associated miRNAs Patterns.....	98
P3. Expression patterns of candidate genes for the <i>Lr46/Yr29</i> “slow rust” locus in common wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) and associated miRNAs inform of the gene conferring the <i>Puccinia triticina</i> resistance trait	117
P4. Diversity of Expression Patterns of <i>Lr34</i>, <i>Lr67</i>, and Candidate Genes towards <i>Lr46</i> with Analysis of Associated miRNAs in Common Wheat Hybrids in Response to <i>Puccinia triticina</i> Fungus	152
12. Oświadczenia współautorów prac.....	172

1. Wykaz stosowanych skrótów

× – symbol krzyżowania

ABA – (ang. *abscisic acid*) – kwas abscysynowy

APR – (ang. *Adult Plant Resistance*) – odporność roślin dorosłych

Avr – (ang. *avirulence factor*) – czynnik awirulencji

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

CDPK – (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinase*) – kinazy zależne od wapnia

CIMMYT – (ang. *International Maize and Wheat Improvement Center*) – Międzynarodowe Centrum Doskonalenia Kukurydzy i Pszenicy

ddPCR – (ang. *droplet digital Polymerase Chain Reaction*) – emulsyjna, łańcuchowa reakcja polimerazy

DNA – (ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas dezoksyrybonukleinowy

ETS – (ang. *Effector-Triggered Susceptibility*) – wrażliwość wyzwalana przez efektor

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

FAO – (ang. *Organization The Food and Agriculture*), Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa

Gbp – (ang. *giga base pairs*) –miliard par zasad

hpi – (ang. *hours post inoculation*) – godziny po inokulacji

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

IWGSC – (ang. *International Wheat Genome Sequencing Consortium*), Międzynarodowe Konsorcjum Sekwencjonowania Genomu Pszenicy

L. – Karol Linneusz

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

MAPK – (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*) – kinazy aktywowane mitogenami

MAS – (ang. *Marker Assisted Selection*) – selekcja wspomagana markerami molekularnymi

Mb – (ang. *Megabase*)

miRNA – (ang. *microRNA*), mikroRNA

MIQE – (ang. *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*)

NCBI – (ang. *National Center for Biotechnology Information*) – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej

NGT – (ang. *New Genomic Techniques*) – nowe techniki genomowe

NTC – (ang. *No Template Control*) – kontrola bez matrycy cDNA

ONZ – Organizacja Narodów Zjednoczonych

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

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

Pgt – (łac. *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*), grzyb powodujący rdzę żdźbłową pszenicy

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

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

PRR – (ang. *Pattern Recognition Receptors*) – receptory rozpoznające wzorce molekularne

Pst – (łac. *Puccinia striiformis*), grzyb powodujący rdzę żółtą pszenicy

Pt – (łac. *Puccinia triticina*), grzyb powodujący rdzę brunatną pszenicy

PTI – (ang. *Pattern Triggered Immunity*) – odporność indukowana przez wzorce molekularne

pz – par zasad

RNA – (ang. *ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy

RNAi – (ang. *RNA interference*) – interferencja RNA

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

qRT-PCR – (ang. *quantitative Real-Time PCR*) – jakościowy PCR w czasie rzeczywistym

QTL – (ang. *quantitative trait loci*) – loci cech ilościowych

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

siRNA – (ang. *small interfering RNA*) – małe, interferujące RNA

SR – (ang. *seedling resistance*) – odporność siewek

SSR – (ang. *Simple Sequence Repeat*) – amplifikowane sekwencje mikrosatelitarne

STS – (ang. *Sequence Tagged Site*) – miejsca znaczone sekwencyjnie

USDA – (ang. *United States Department of Agriculture*) – Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych

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

2. Streszczenie

Rdza brunatna wywoływana przez grzyb *Puccinia triticina* Eriks (*Pt*) jest jedną z najbardziej szkodliwych chorób powodujących znaczne straty w uprawach pszenicy zwyczajnej. U dorosłych roślin odpornych na *Pt* obserwuje się odporność typu APR, która chroni roślinę przed wieloma rasami patogenów i wyróżnia się trwałością w warunkach produkcyjnych. Dzięki pełniejszemu zrozumieniu mechanizmów molekularnych leżących u podstaw funkcji genów APR będzie możliwe opracowanie nowych strategii hodowli odpornościowej pszenicy. Obecnie głównie geny APR, takie jak *Lr34*, *Lr46* i *Lr67*, są w znacznym stopniu wykorzystywane w hodowli odpornościowej, ponieważ nadają trwałą odporność na wiele ras grzybów występujących w różnych warunkach klimatycznych i środowiskowych. W przypadku *locus Lr46* nadal nie zidentyfikowano genu warunkującego odporność APR. Jednakże, w literaturze zaproponowano kilka genów kandydujących, których scharakteryzowania podjęto się w prezentowanych badaniach. Celem niniejszej pracy doktorskiej była wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów odporności u pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na porażenie przez rdzę brunatną. Podjęte badania miały na celu identyfikację genów typu APR, analizę profili ekspresji genów *Lr34*, *Lr67* oraz genów kandydujących dla genu *Lr46*, po inokulacji zarodnikami grzybów *Pt*. Dodatkowo określono wpływ małych cząsteczek RNA (miRNA) na ekspresję tych genów. Materiał roślinny obejmował odmiany odporne, pochodzące z banku genów oraz pokolenia F1, F2 i BC1F1, uzyskane w wyniku krzyżowania wspomnianych genotypów z polskimi, ważnymi gospodarczo odmianami pszenicy. Stres biotyczny wywoływano u roślin dorosłych poprzez inokulację zarodnikami grzybów *Pt* w kontrolowanych warunkach. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano technikę RT-qPCR w celu analizy profili ekspresji genów badanych w pięciu punktach czasowych (0, 6, 12, 24 i 48 hpi). Ponadto, przeanalizowano profile ekspresji cząsteczek miRNA komplementarnych do genu *Lr34* (tae-miR9653b, tae-miR9773 i tae-miR9677b) oraz genów kandydujących dla *Lr46* (tae-miR5384-3p, tae-miR9780, tae-miR9775 oraz tae-miR164). Spośród testowanych genów kandydujących (*Lr46-Glu1*, *Lr46-Glu2*, *Lr46-Glu3*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, *Lr46-RLK3*, *Lr46-RLK4*, *Lr46-Snex* i *Lr46-WRKY*), najwyższa ekspresja wystąpiła tylko u jednego genu kandydującego (*Lr46-Glu2*), co sugeruje jego możliwą rolę w odpowiedzi odpornościowej na infekcję powodowaną przez *Pt*.

3. Streszczenie w języku angielskim

Leaf rust caused by the fungus *Puccinia triticina* Eriks (*Pt*) is one of the most damaging diseases causing significant losses in common wheat crops. In *Pt*-resistant adult plants, an APR-type resistance is observed, which protects the plant against multiple pathogen races and is notable by its persistence under production conditions. A more comprehensive understanding of the molecular mechanisms underlying the function of APR genes will enable the development of new strategies for resistance breeding in wheat. Currently, mainly APR genes, such as *Lr34*, *Lr46* and *Lr67*, are widely used in resistance breeding, as they confer durable resistance to many fungal races occurring under different climatic and environmental conditions. In the case of the *Lr46* locus, the gene determining APR resistance has still not been identified. However, several candidate genes have been proposed in the literature and characterisation of these genes was undertaken in the present study. The aim of presented dissertation was a multi-level analysis of the molecular mechanisms of resistance in common wheat in response to leaf rust inoculation. The research undertaken was aimed at analysing the identification of APR type genes, expression profiles of *Lr34*, *Lr67* and candidate genes for the *Lr46* gene, following inoculation with *Pt* fungal spores. Additionally, the influence of small RNA molecules (miRNA) on the expression of these genes was determined. The plant material consisted of resistant cultivars from the gene bank and the F1, F2 and BC1F1 generations, obtained by crossing the above-mentioned genotypes with economically important Polish wheat varieties. Biotic stress was induced in adult plants by inoculation with *Pt* fungal spores under controlled conditions. The study used RT-qPCR to analyse the expression profiles of the genes studied at five time points (0, 6, 12, 24 and 48 hpi). In addition, the expression profiles of miRNA molecules complementary to the *Lr34* gene (tae-miR9653b, tae-miR9773 and tae-miR9677b) and candidate genes for *Lr46* (tae-miR5384-3p, tae-miR9780, tae-miR9775 and tae-miR164) were analysed. Of the candidate genes tested (*Lr46-Glu1*, *Lr46-Glu2*, *Lr46-Glu3*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, *Lr46-RLK3*, *Lr46-RLK4*, *Lr46-Snex* and *Lr46-WRKY*), the highest expression occurred in only one candidate gene (*Lr46-Glu2*), indicating that it may be a contributing factor in the response to infection caused by *Pt*.

4. Wprowadzenie

4.1. Produkcja pszenicy zwyczajnej i jej perspektywy

Rolnictwo jest kluczowym obszarem światowej gospodarki. Na jego rozwój wpływa szereg czynników naturalnych i antropogenicznych. Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. *Organization The Food and Agriculture*, FAO) szacuje, że obecnie tylko 150 gatunków roślin jest uprawianych na szeroką skalę na całym świecie, a 12 gatunków roślin uprawnych zapewnia 80% światowej żywności (FAO, 2018; Shiferaw i in., 2013; Zhou i in., 2020).

Pszenica jest drugą, najczęściej uprawianą rośliną podstawową (FAO 2019). Powierzchnia zasiewów tego zboża wynosi ponad 215 milionów hektarów rocznie, a skala światowego handlu pszenicą jest wyższa, niż kukurydzą i ryżem łącznie. Gatunek ten stanowi jeden z najważniejszych źródeł białka, dostarczając około 20% kalorii spożywanych przez ludzi na całym świecie (Karaman i in., 2021; Walkowiak i in., 2020; Shiferaw i in., 2013; Zhou i in., 2020). Zaburzenie tych proporcji może doprowadzić do poważnego kryzysu, niedostatecznej dostępności żywności, a także zmian gospodarczych wynikających ze wzrostu cen produktów zawierających pszenicę (Anderson, 2012; Bentley, 2022). Zdaniem badaczy, podążając za wzrostem liczby ludności, aby zaspokoić ciągle powiększające się zapotrzebowanie na żywność, produkcja pszenicy musi zostać zwiększona o około 60% do 2050 roku, co stanowi trudne zadanie dla hodowców (Tong i in., 2024; Walkowiak i in., 2020).

Obecnie, główne kierunki hodowli pszenicy koncentrują się na wysokich plonach, wysokiej jakości handlowej oraz odporności na stresy biotyczne i abiotyczne (Ahmar i in., 2020; Bokore i in., 2022; Walkowiak i in., 2020). Zmiany klimatu i wynikające z nich okresy ekstremalnych upałów, przymrozków i suszy, w połączeniu ze zwiększonym ryzykiem występowania chorób, stanowią ogromne wyzwanie dla współczesnej hodowli. Szacuje się, że prognozowany, globalny wzrost temperatury o 2°C doprowadzi do zmniejszenia plonów pszenicy w krajach Afryki, Azji i Ameryki Południowej o 10-15%. Jednocześnie, pojawiają się nowe zagrożenia związane z agrofagami, które dotychczas nie występowały w naszej szerokości geograficznej. Na całym świecie szkodniki i choroby powodują średni roczny spadek plonów pszenicy o 21,5% (Savary i in., 2019). Prognozy klimatologów oraz przewidywania naukowców dotyczące najbliższej przyszłości powodują wzrost nacisku na postęp biologiczny w hodowli odpornościowej roślin uprawnych. Najtrudniejszym zadaniem stojącym przed hodowcami i naukowcami jest wyprowadzenie odmian wykazujących

całkowitą odporność na dany patogen, jak również charakteryzującą się odpornością krzyżową na wiele różnych czynników chorobotwórczych jednocześnie. Podczas krzyżowania odmian z donorem zawierającym geny odporności, możliwe jest jednoczesne przeniesienie szeregu niekorzystnych cech, dyskwalifikujących dany genotyp (Bariana i in., 2013; Bolton i in., 2008; Prasad i in., 2020). Dlatego tak trudne jest uzyskanie w pełni odpornych odmian, wykazujących jednocześnie dobre parametry cech jakości plonu. Hodowcy dążą do piramidyzacji genów odporności w obrębie tej samej odmiany, aby zwiększyć ich skuteczność podczas potencjalnego porażenia przez agrofagi. Hodowla mieszańcowa jest najskuteczniejszym sposobem łączenia genów odporności i jest szeroko wykorzystywana w programach hodowlanych pszenicy ze względu na jej wysoki potencjał w zwiększaniu plonów i ich stabilności. Jednak nadal brakuje podstawowych informacji na temat architektury genetycznej pszenicy i stopnia dominacji genów warunkujących odporność na rdzę bruntaną (Beukert i in., 2020). W celu opracowania zrównoważonej i opłacalnej strategii kontroli rozprzestrzeniania się rdzy brunatnej, należy więc wdrożyć multidyscyplinarne podejście badawcze z udziałem: hodowców, rolników, genetyków, fitopatologów i biotechnologów (Figlan i in., 2020). W ostatnich latach hodowla odpornościowa zyskuje na znaczeniu, ponieważ wpisuje się w założenia integrowanej ochrony roślin. W praktyce, metody te polegają na wykorzystaniu w procesie hodowlanym odmian wykazujących wysoką odporność na choroby. Ponadto, polityka rolna m. in. w krajach Unii Europejskiej, kładzie coraz większy nacisk na ciągłe zmniejszenie zużycia niekorzystnych dla środowiska naturalnego pestycydów i rozwój rolnictwa ekologicznego. Ograniczanie dozwolonych substancji czynnych prowadzi do poszukiwania oraz tworzenia nowych ulepszonych odmian pszenicy. W szczególności zainteresowaniem cieszą się odmiany charakteryzujące się nowymi źródłami odporności na patogeny. Wykorzystanie odmian odpornych i wysoko plonujących, przy jednoczesnym zachowaniu właściwej agrotechniki, spełni założenia Zielonego Ładu i może w pewnym stopniu ograniczyć prognozowane spadki plonów.

4.2. Utrzymanie zasobów genetycznych pszenicy

Największe cywilizacje zostały znacząco ukształtowane dzięki udomowieniu, ochronie i wykorzystaniu rodzimych gatunków roślin. W tym celu wykorzystywano zmienność genetyczną dzikich i uprawnych roślin, obserwując ich fenotyp (FAO, 2018; Sofi i in., 2020). Obecnie, zasadnicze znaczenie dla zachowania różnorodności genetycznej roślin uprawnych mają banki genów i zgromadzone w ich zasobach genotypy, stanowiące źródło genów

utraconych podczas udomowienia i selekcji hodowlanej. W porównaniu do dzikich krewnych pszenicy i jej starych odmian, współczesne odmiany wykazują coraz niższą różnorodność genetyczną, tym samym charakteryzują się również coraz mniejszym potencjałem do uzyskiwania genotypów odpornych na choroby. W celu przeciwdziałania temu zjawisku i zwiększania różnorodności genetycznej w programach hodowlanych pszenicy, stosuje się różnorodne strategie. Jednym z przykładów jest krzyżowanie tetraploidalnej pszenicy z dzikim diploidalnym przodkiem *Aegilops tauschii*, donorem subgenomu D pszenicy, w wyniku czego powstała syntetyczna pszenica heksaploidalna. Podejście to było szeroko analizowane przez Międzynarodowe Centrum Doskonalenia Kukurydzy i Pszenicy CIMMYT (ang. *International Maize and Wheat Improvement Center*) w ramach programów hodowlanych (Dreisigacker i in., 2008; Reynolds i Braun, 2022). Kolejną strategią jest wykorzystanie puli genetycznych obecnych w odmianach rodzimych i dzikich przodkach pszenicy (Cavalet-Giorsa i in., 2024; M. Reynolds i in., 2007). Banki genów stanowią ogromny potencjał, który może być wykorzystywany w badaniach i pracach hodowlanych, w celu zwiększenia odporności pszenicy na stropy biotyczne i abiotyczne. Wykorzystując blisko spokrewnione odmiany dzikie, do krzyżowania z elitarnymi odmianami roślin uprawnych, możliwe jest wprowadzenie do hodowli nowych źródeł genetycznych pożądanых cech, w tym szczególnie genów warunkujących odporność. Geny te można następnie zachować w kolejnych pokoleniach mieszańcowych poprzez krzyżowanie wsteczne wspomagane markerami molekularnymi – MAS (ang. *Marker Assisted Selection*) (Müller i in., 2018). Tym samym banki genów mogą zostać wykorzystane do zróżnicowania czynników warunkujących odporność, choć introgresja nowych alleli jest długim i trudnym procesem. Pomimo tego, introgresja była i nadal jest istotnym mechanizmem zwiększającym różnorodność genetyczną pszenicy. Dlatego też, aby przyspieszyć odkrywanie, introgresję i piramidyzację genów odporności w hodowli odpornościowej, kluczowe jest zintegrowanie jak największej liczby narzędzi, w tym przede wszystkim zaawansowanych technik biologii molekularnej (Dinglasan i in., 2022).

4.3. Złożoność genomu pszenicy alloheksaploidalnej

Rodzaje *Amblyopyrum*, *Aegilops* i *Triticum* należą do plemienia Triticeae z rodziny traw *Poaceae* (*Gramineae*). Gatunki *Triticeae* zawierają podstawowy zestaw chromosomów wynoszący $x = 7$. To stosunkowo młode plemię oddzieliło się od innych plemion z podrodziny *Pooideae* około 25 milionów lat temu. Pszenica zwyczajna rozszerzyła swoje siedlisko z głównego obszaru tzw. Żyźnego Półksiężycy na środowiska globalne w ciągu około 10 000 lat.

Mechanizmy genetyczne tego niezwykłego sukcesu ewolucyjnego nadal nie zostały dobrze poznane (Zhou i in., 2020). W sierpniu 2018 roku Międzynarodowe Konsorcjum Sekwencjonowania Genomu Pszenicy, IWGSC (ang. *International Wheat Genome Sequencing Consortium*) opublikowało w czasopiśmie *Science* szczegółowy opis genomu jednego z najpopularniejszych zbóż na świecie wraz z pierwszą sekwencją referencyjną odmiany Chinese Spring (IWGSC RefSeq v1.0). (IWGSC, 2018). Osiągnięcie to było zwieńczeniem 13 lat międzynarodowych badań koordynowanych przez IWGSC. Niedługo później, w 2020 roku, opublikowano sekwencje genomów kolejnych 15 odmian pszenicy z całego świata. To sprawiło, że badania nad pszenicą wkroczyły w erę pangenomiczną (Hussain i in., 2022).

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) to gatunek alloheksaploidalny ($2n = 6x = 42$; AABBDD) powstały w wyniku dynamicznej historii udomowienia (Petersen i in., 2006). Poliploidalność tego gatunku jest wynikiem dwóch rund hybrydyzacji: pierwszej międzygatunkowej pomiędzy pszenicą spokrewnioną z *T. urartu* ($2n = 2x = 14$; AA) (Katamadze i in., 2023) i nieodkrytym gatunkiem spokrewnionym z *Aegilops speltoides* (genom BB), a następnie pomiędzy *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$; AABB) i *A. tauschii* ($2n = 2x = 14$; DD) (Alonge i in., 2020; Juery i in., 2021). Tak powstały genom pszenicy zwyczajnej jest wyjątkowo duży (około 16 Gbp) i podobnie jak w przypadku większości dużych genomów roślinnych, zawiera sekwencje powtarzalne (w tym retrotranspozony), stanowiące aż około 85% genomu. Powtórzenia te sprawiają, że genom ten jest szczególnie trudny do analizy, pomimo udoskonaleń w sekwencjonowaniu i technologii jego składania (Alonge i in., 2020). Jednak analizy mejozy u form mieszańcowych otrzymanych z krzyżowań monosomików z tetraploidalną pszenicą wykazały przynależność danego chromosomu do każdego z trzech subgenomów – A, B i D (Rogalska, 2012). Ponadto, na podstawie analiz cytogenetycznych form aneuploidalnych zidentyfikowano homeologiczne pary chromosomów, co doprowadziło do ich klasyfikacji na 7 grup. Do pierwszej z nich przyporządkowano chromosomy 1A, 1B i 1D, do drugiej grupy – chromosomy 2A, 2B i 2D, a każda kolejna z siedmiu grup homeologicznych została w ten sam sposób sklasyfikowana (Levy i Feldman, 2022; Mayrose i Lysak, 2021).

Chociaż zidentyfikowano diploidalnych donorów, dwóch z trzech subgenomów *T. aestivum*, a mianowicie: *Ae. tauschii* (subgenom D) i *T. urartu* (subgenom A), to wciąż niejasne pozostaje pochodzenie subgenomu B (Katamadze i in., 2023). Obecnie nie istnieje żaden gatunek diploidalny, którego chromosomy miałyby wysokie powinowactwo do subgenomu B, a to sugeruje, iż protoplasta wymarł lub nadal pozostaje niezidentyfikowany. Istnieje też trzecia możliwość, jaką jest pochodzenie polifiletyczne subgenomu B i jego wyewoluowanie na

poziomie poliploidalnym poprzez wielokrotne krzyżowania z gatunkami pokrewnymi, takimi jak: *Ae. speltooides*, *Ae. bicornis*, *Ae. sharonensis*, *Ae. longissima* i *Ae. searsii* (Levy i Feldman, 2022; Li i in., 2022). W związku ze złożoną budową genomu pszenicy zwyczajnej zmienność ilościowa wielu cech agronomicznych jest modulowana przez interakcje genetyczne pomiędzy wieloma zestawami homologów znajdujących się w subgenomach A, B i D (Ramírez-González i in., 2018). Zgodnie z danymi literaturowymi, genom D jest mniej zróżnicowany niż genomy A i B (Akhunov i in., 2010; Bernardo, 2021; Hao i in., 2011; Luo i in., 2017). Badania przeprowadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej skupiają się przede wszystkim na szczegółowej analizie genów odporności na rdzę brunatną (*Lr*, ang. *Leaf rust*) oraz innych genów kandydujących u pszenicy zwyczajnej, zlokalizowanych na chromosomach 1B, 4D i 7D pszenicy.

4.4. Zagrożenia w produkcji pszenicy

Współczesne rolnictwo, zwłaszcza konwencjonalne, jest niebezpiecznie uzależnione od stosowania środków ochrony roślin. Nie ulega wątpliwości, że pestycydy i inne syntetyczne środki ochrony mają negatywny wpływ na biosferę, przyczyniając się do zachwiania równowagi biologicznej w ekosystemach. Globalna produkcja pszenicy jest stale narażona na choroby i szkodniki, które ewoluują i rozprzestrzeniają się na nowe obszary (Pequeno i in., 2024). Zmiany klimatu sprzyjają zwiększeniu nasilenia występowania chorób takich jak: mączniak prawdziwy, rdza żółta, septorioza oraz rdza brunatna, które każdego roku doprowadzają do zniszczenia plonów pszenicy o około 20% (Singh i in., 2023). Obecnie jednym z priorytetów są ulepszone i przyjazne dla klimatu praktyki agrotechniczne, ograniczające użycie środków ochrony roślin (Kashyap i in., 2022). To właśnie w tym obszarze postęp w hodowli odpornościowej może mieć swój istotny wkład. Dlatego też wiedza na temat zmienności genetycznej odporności roślin, zdolności ewolucyjnych patogenów i wybór nowoczesnych metod hodowli, są niezbędne do skutecznej hodowli odpornościowej. Poznanie specyfiki działania określonych patogenów, w tym *P. triticina*, sprawcy rdzy brunatnej omawianej w niniejszej dysertacji, może stanowić cenne narzędzie w zwalczaniu tej choroby (Pequeno i in., 2024).

4.5. *Puccinia triticina* Eriks, sprawca rdzy brunatnej pszenicy

Grzyby z rodzaju *Puccinia* należą do rzędu *Pucciniales* (dawniej *Uredinales*). Wszyscy przedstawiciele rzędu *Pucciniales* są bezwzględnie pasożytniczymi patogenami roślin naczyniowych, o dość skomplikowanym cyklu życiowym. Grzyby powodujące rdzę są biotrofami, są zatem całkowicie zależne od zasobów odżywczych uzyskanych z żywych komórek gospodarza (Lorrain i in., 2019). Oprócz pszenicy zwyczajnej patogeny te są zdolne do infekowania innych zbóż, tj. żyta (*Secale cereale*), jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) i pszenżyta (\times *Triticosecale*). Gatunki grzybów powodujących rdzę różnią się pod względem zdolności do infekowania określonych żywicieli, z kolei te różnice znajdują odzwierciedlenie w klasyfikacji „formae speciales” (f. sp.). Wyróżnia się trzy rodzaje rdzy zagrażających pszenicy, tj. rdza żdźbłowa, rdza żółta i rdza brunatna, wywoływane odpowiednio przez *P. graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*), *P. striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) i *P. triticina* Eriks (*Pt*) (Figueroa i in., 2018). Rdze zbożowe wymagają dwóch niespokrewnionych taksonomicznie żywicieli do ukończenia cyklu życiowego, składającego się z pięciu stadiów zarodnikowych (Kolmer, 2013). Infekcja następuje za pośrednictwem wiatru, który przenosi zarodniki na rośliny żywicielskie. Czynnikiem szczególnie sprzyjającym infekcji jest wysoka wilgotność powietrza. Optymalne warunki do rozwoju infekcji to temperatura pomiędzy 15 a 20°C oraz podwyższona wilgotność powietrza. W sprzyjających warunkach urediniospory pojawiają się 7-10 dni po infekcji (Dinh i in., 2020; Ellis i in., 2014; Gupta i in., 2012).

Patogeny powodujące rdzę ograniczały uprawę pszenicy już od okresu jej udomowienia (Roelfs i in., 1992). Pochodzenie chorób rdzy upatruje się na Bliskim Wschodzie, w regionie tzw. Żytnego Półksiężycza (Bolton i in., 2008; J. A. Kolmer i in., 2009). Ponadto wykazano, że rdza brunatna jest szczególnie problematyczną chorobą, ponieważ patogen wykazuje dużą różnorodność pod względem ras i patotypów, a także wysoką zdolność adaptacji do środowiska występowania. To wszystko powoduje, iż otrzymanie odmian wykazujących trwałą odporność stanowi spore wyzwanie dla hodowców zbóż (Haq i Ijaz, 2020).

4.6. Wielopoziomowy system odpornościowy u roślin

Rośliny, w przeciwieństwie do kręgowców, nie posiadają przeciwciał ani komórek odpornościowych. W celu ochrony przed patogenami, rośliny ukształtowały jednak niezwykle złożony i zmienny system odpornościowy, obejmujący odpowiedź lokalną i systemiczną (ang. *Systemic Acquired Resistance*, SAR) (Banasiak, 2022; Rodriguez-Moreno i in., 2018). Oprócz

bariery konstytutywnej, rośliny wyposażone są w mechanizmy obronne aktywowane na skutek ataku patogennych mikroorganizmów (Wenig i in., 2019; Zhou i in., 2020; Zipfel, 2014). Mechanizmy te opierają się głównie na rozpoznawaniu ligandów pochodzących od patogenów (Krattinger i Keller, 2016; Ngou i in., 2021). Jednym z modeli opisujących system odpornościowy roślin jest model zygzakowy (ang. *zig-zag model*), zaproponowany przez Jonesa i Dangla (Banasiak, 2022; Jones i Dangl, 2006). W początkowym etapie wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP), określane jako nieswoiste elicytory, są rozpoznawane przez receptory wzorców (ang. *Pattern Recognition Receptors*, PRR), co prowadzi do powstania odporności indukowanej wzorcami molekularnymi (ang. *Pattern Triggered Immunity*, PTI) i aktywacji odpowiedzi obronnej (Prasad i in., 2020), obejmującej kinazy aktywowane mitogenami (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK), kinazy zależne od wapnia (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinase*, CDPK) oraz powstawanie reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Ponadto następuje wzmocnienie ściany komórkowej poprzez odkładanie kalozy i lignin, a także synteza metabolitów wtórnych i akumulacja białek związanych z patogenezą (ang. *Pathogenesis-Related proteins*, PR), takich jak chitynazy, glukanazy i peroksydazy (Jones i Dangl, 2006; Ngou i in., 2021). Atakujący patogen wytwarza czynniki efektorowe, które zakłócają odporność PTI lub wspierają rozprzestrzenianie się patogenu, prowadząc do rozwoju podatności wyzwalanej przez czynniki efektorowe (ang. *Effector-Triggered Susceptibility*, ETS) i w konsekwencji rozwoju infekcji (Ngou i in., 2021). Produkowane przez patogeny efekторы mogą stać się czynnikami awirulencji (ang. *avirulence factor*, avr). Następuje to wówczas, gdy komórka posiada specyficzne białka receptorowe umożliwiające ich rozpoznanie, kodowane przez tzw. geny odporności (Banasiak, 2022; Petit-Houdenet i Fudal, 2017; Wenig i in., 2019). Takie receptory zazwyczaj reprezentują klasę NB-LRR/NLR (ang. *nucleotide-binding and leucine-rich-repeat-containing receptor*) (Annan i Huang, 2023), a ich wiązanie z czynnikiem awirulencji prowadzi do aktywacji specyficznej odporności ETI (ang. *Effector-Triggered Immunity*) (Hawkins, 2019). Częstym efektem mechanizmu ETI jest wystąpienie reakcji nadwrażliwości HR (ang. *Hypersensitive Response*), która prowadzi do śmierci komórek gospodarza znajdujących się wokół miejsca infekcji, a tym samym uniemożliwia patogenom dostęp do żywych tkanek. Reakcja nadwrażliwości stanowi ochronę przed biotrofami, takimi jak grzyb *Puccinia triticina* – sprawca rdzy brunatnej (Balint-Kurti, 2019). Dla rośliny pożądane jest posiadanie odpowiedniego genu R rozpoznającego dany efektor, podczas gdy patogen dąży do uniknięcia rozpoznania, na przykład poprzez mutację w genie kodującym efektor (Banasiak, 2022).

Istnieją dwie grupy genów odporności wykorzystywanych w hodowli pszenicy odpornej na choroby rdzy. Pierwsza grupa, znana jako geny główne R (ang. *Resistance genes*), nadają odporność specyficzną, przeciwko jednej konkretnej rasie patogenu. Większość zidentyfikowanych genów *Lr* należy do tej grupy. Białka kodowane przez geny R bezpośrednio lub pośrednio reagują na efekty wirulencji wywoływane przez patogeny, które są wydzielane do cytoplazmy komórek roślin żywicielskich (Bhardwaj i in., 2021). Druga grupa obejmuje geny, które wykazują niespecyficzną odporność obejmującą wiele ras patogenów grzybowych. Przykładem genu takiej odporności jest dobrze zbadany gen *Lr34* (Peng i Yang, 2017). Genetycznie uwarunkowana odporność na *P. triticina* (*Pt*) Eriks została scharakteryzowana zarówno u młodych roślin (ang. *Seedling Resistance*, SR), jak i roślin w stadium dorosłym (ang. *Adult Plant Resistance*, APR). Odporność SR jest kontrolowana pionowo przez główne geny R, które zapewniają rasowo-specyficzną odporność, często przełamowaną przez patogeny (Bariana i in., 2022; Huerta-Espino i in., 2011). Natomiast odporność APR jest rasowo-niespecyficzna i często objawia się jako efekt „powolnego rdzewienia” (ang. *slow rusting*), który wiąże się z wolniejszym rozwojem infekcji, dłuższym okresem utajenia i tworzeniem mniejszej liczby uredinii. APR zapewnia częściową, ale trwałą odporność na patogeny (Haq i Ijaz, 2020). Osiągnięcie odporności, która jest komercyjnie akceptowalna, wymaga połączenia więcej niż dwóch genów APR (Bariana i in., 2022). Obecność pojedynczych genów APR wykazuje umiarkowany poziom odporności, jednak ich piramidyzacja z genami głównymi może prowadzić do zwiększonej odporności w hodowli, którą preferują hodowcy (Dinglasan i in., 2022; Huerta-Espino i in., 2020). W praktyce, wdrażanie nowych odmian zawierających geny APR jest sporym wyzwaniem, ponieważ brakuje ich dokładnej charakterystyki. W związku z tym, dokładne poznanie i klonowanie zarówno znanych, jak i nowych genów typu APR wydaje się być niezbędne do precyzyjnego i skutecznego wykorzystania ich w hodowli odpornościowej pszenicy. Z tego względu w niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę analizy ekspresji dziesięciu genów kandydujących dla *locus Lr46*, który jest szeroko wykorzystywany w programach hodowlanych. Szczegółowej analizie poddano również geny *Lr34* i *Lr67*.

4.7. Geny odporności na rdzę brunatną

Wszystkie znane geny odporności na rdzę brunatną są klasyfikowane zgodnie z nomenklaturą przypisującą im symbol *Lr* (ang. *Leaf rust*). W ciągu ostatnich dziesięcioleci liczne badania doprowadziły do identyfikacji około 100 genów *Lr* i wielu ważnych *loci* cech ilościowych (QTL) (S. Kumar i in., 2021; Qureshi i in., 2018; Tong i in., 2024). Jednak ze

względu na rozmiar i złożoność genomu pszenicy, do tej pory sklonowano tylko kilka genów *Lr*. Obejmują one siedem genów (*Lr1*, *Lr10*, *Lr21*, *Lr34*, *Lr42*, *Lr47* i *Lr67*) sklonowanych za pomocą klasycznego klonowania opartego na mapie oraz cztery geny uzyskane metodami szybkiego klonowania (*Lr9*, *Lr13*, *Lr14a* i *Lr22a*) (H. Li i in., 2023; Prasad i in., 2020). W przypadku odporności APR wyróżnia się kilka genów, do których należą m. in. *Lr34/Yr18/Pm38/Sr57*, *Lr46/Yr29/Pm39/Sr58* i *Lr67/Yr46/Pm46/Sr55* (Herrera-Foessel i in., 2014; Li i in., 2023; M. P. Reynolds i Braun, 2022; Vikas i in., 2022). Geny te analizowane były w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Gen *Lr34* został po raz pierwszy opisany w 1977 roku w Kanadzie, w linii pszenicy PI58548 (Dyck, 1977). Dalsza analiza genu *Lr34* ujawniła jego lokalizację w genomie, dzięki czemu wykazano, że znajduje się on na ramieniu krótkim chromosomu 7D pszenicy. Gen *Lr34* został po raz pierwszy zidentyfikowany w odmianie 'Frontana' (Dyck, 1987). Kompleks *Lr34/Yr18/Pm38/Sr57* nadaje umiarkowaną odporność na rdzę brunatną i rdzę żółtą oraz częściową odporność na mączniaka prawdziwego i rdzę żdźbłową. Sekwencja nukleotydowa zawiera 24 eksony i koduje białko o długości 1401 reszt aminokwasowych (Krattinger i in., 2009). Allele w tym *locus* różnią się pojedynczą substytucją nukleotydową w eksonie 4, delecją trójnukleotydową w eksonie 11 i pojedynczą substytucją nukleotydową w eksonie 12 (Dakouri i in., 2014; Lagudah i in., 2009).

Gen *Lr46* został zidentyfikowany po raz pierwszy w odmianie pszenicy 'Pavon 76' (William i in., 2003). Genotypy pszenicy wykazujące obecność genu *Lr46/Yr29* charakteryzują się odpornością na rdzę brunatną i żółtą. Ponadto, zostały scharakteryzowane również jako geny odporności na mączniaka prawdziwego (*Pm39*) i rdzę żdźbłową (*Sr58*) (J. Kolmer i in., 2015). *Locus Lr46/Yr29/Sr58/Pm39* został zmapowany na ramieniu długim chromosomu 1B, jednak nie zidentyfikowano sekwencji genu odpowiedzialnego za warunkowanie odporności. Na podstawie mapowania wysokiej rozdzielczości w *locus QYr.ucw-1BL* wyselekcjonowano i przeanalizowano 13 genów kandydujących dla *Lr46/Yr29* (Cobo i in., 2019). Jednak nadal nie jest jasne, czy wspomniany *locus* odporności na wiele patogenów jest wynikiem plejotropowego działania pojedynczego genu, czy też małego klastra ściśle powiązanych ze sobą genów (Cobo i in., 2019; Tong i in., 2024). Przeprowadzenie charakterystyki funkcjonalnej *Lr46/Yr29* jest niezbędne do określenia zmienności allelicznej genu lub genów leżących u podstaw odporności na *Pt* oraz do ustalenia jej molekularnych mechanizmów (Bobrowska i in., 2022; Radchenko i in., 2022; Spychała i in., 2024). W ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej podjęto się tego zadania i przeprowadzono analizę ekspresji genów kandydujących dla *Lr46*. Sprawdzone również wpływ miRNA na poziom ekspresji tych genów

Gen *Lr67* wykazuje również plejotropowy wpływ na rdzę żdźbłową i żółtą, ale z mniejszym wpływem na odporność na rdzę brunatną, niż gen *Lr34*. Kompleks genów *Lr67/Yr46/Pm46/Sr55* został zmapowany na długim ramieniu chromosomu 4D (Herrera-Foessel i in., 2014; Hiebert i in., 2010; Milne i in., 2019). Gen *Lr67* koduje transporter heksozy w dwóch wariantach allelicznych, przy czym wariant odporny determinuje powstanie białka *Lr67res*, które różni się od podatnej formy *Lr67sus* dwoma aminokwasami: leucyną (Leu) i arginina (Arg). Oba warianty alleliczne genu *Lr67* mają identyczne regiony promotorowe. Ponadto, w chromosomach 4A oraz 4B pszenicy zwyczajnej znajdują się dodatkowe homologii genu *Lr67* (Ellis i in., 2014; Milne i in., 2019; Moore i in., 2015). Według danych literaturowych, ekspresja genów *Lr34* lub *Lr67* pszenicy w innych gatunkach zbóż, takich jak pszenica durum, jęczmień, ryż i kukurydza, warunkuje odporność na wiele patogenów, co sugeruje, że rola tych genów w reakcji odpornościowej jest zachowana w szerokim zakresie taksonomicznym. W związku z tym, geny te mogą zostać potencjalnie wykorzystane jako nowe źródła odporności u innych gatunków, choć brak informacji o możliwości ich wykorzystania u roślin okrytonasiennych (Periyannan i in., 2017; Sucher i in., 2018).

4.8. Rola miRNA w reakcji odpornościowej pszenicy

Zastosowanie metod genomowych w ulepszaniu gatunków roślin uprawnych może skutecznie przyczynić się do rozwiązania problemów związanych z niedoborami żywieniowymi oraz stresami biotycznymi i abiotycznymi. W ostatnim dziesięcioleciu nacisk został położony na identyfikację i analizę funkcjonalną cząsteczek miRNA. Analizy te można zaliczyć do jednego z wiodących obszarów badawczych w naukach o roślinach (Salgotra i Zargar, 2020). W przypadku pszenicy tempo badań genetycznych nieustannie się zwiększa prowadząc do postępu w genomice, fenotypowaniu i technikach klonowania genów, skutkując ciągłym odkrywaniem kolejnych genów R lub rejonów QTL związanych z odpornością (Tong i in., 2024).

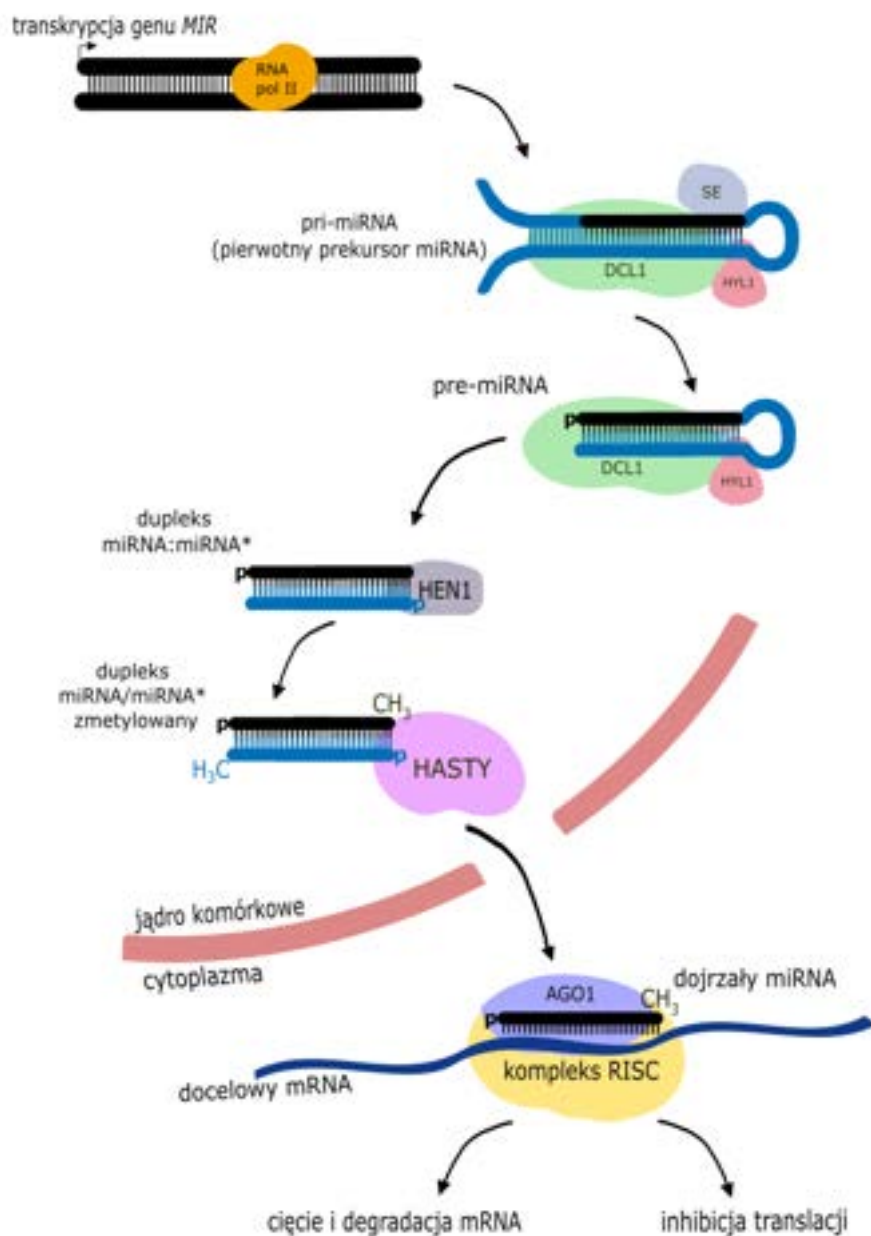
Niezwykle istotnym aspektem, niezbędnym do poznania i zrozumienia molekularnych mechanizmów odporności, jest regulacja ekspresji genów. Ponadto, naukowcy coraz częściej zwracają uwagę na rolę małych, niekodujących RNA (miRNA, siRNA), które odgrywają znaczącą rolę w kontroli procesów biologicznych (Tyczewska i in., 2016). W porównaniu do roślin modelowych, takich jak ryż i rzodkiewnik, badania nad rolą i funkcją miRNA u pszenicy są zdecydowanie mniej zaawansowane. Analizy związane z małymi RNA (ang. *small RNA*) są szczególnie utrudnione ze względu na ogromny i złożony genom pszenicy

zwyczajnej (Basso i in., 2019; Feng i in., 2015). Tym niemniej, dokładniejsze zrozumienie regulacji i profilu ekspresji genów związanych z mechanizmami RNAi (ang. *RNA interference*), tolerancji na stesy abiotyczne lub biotyczne, może doprowadzić do poprawy cech agronomicznych w wielu uprawach na całym świecie (Bazzini i in., 2007).

Dopiero w 2002 roku odkryto pierwsze roślinne cząsteczki miRNA u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) (Reinhart i in., 2002). To odkrycie dało początek nowemu kierunkowi badań, dzięki którym wykazano zaangażowanie roślinnych miRNA w wiele istotnych procesów, takich jak kwitnienie, regulacja biogenezy, transdukcja szlaków sygnałowych i rozwój organów (Chen i Yu, 2023; Chi i in., 2023; Jain i in., 2020). Badania wykazały, że ekspresja miRNA jest specyficzna dla tkanki i etapu rozwoju rośliny. Ponadto, regulacja ekspresji cząsteczek miRNA jest warunkowana przez warunki środowiskowe, w tym stesy biotyczne i abiotyczne. Odkrycie miRNA jako cząsteczek, które specyficznie modulują skład proteomu, ujawniło nowy poziom kontroli nad procesami komórkowymi. Rośliny mają zróżnicowane mechanizmy rozpoznawania ataku patogenów i wywoływania reakcji obronnych, które zmieniają funkcje komórkowe gospodarza. Wykazano, że miRNA biorą udział w sygnalizacyjnych szlakach obronnych u roślin (Budak i in., 2015; Feng i in., 2015).

Cząsteczki miRNA występujące u roślin są kodowane przez geny *MIR*, które znajdują się głównie w niekodujących regionach genomu i są zwykle transkrybowane przez polimerazę RNA II (Kumar i in., 2015). miRNA to małe, niekodujące endogenne RNA o długości od 21 do 24 nukleotydów (nt), które odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów komórkowych, poprzez hamowanie translacji genów lub degradację docelowych mRNA na poziomie potranskrypcyjnym. W wyniku procesu transkrypcji powstaje pierwotny transkrypt pri-miRNA o długości od kilkuset do kilku tysięcy nukleotydów. Kompleksy białek DCL1 (ang. *Dicer-Like*) i HYL1 (ang. *Hyponastic Leaves 1*) wraz z białkiem SE (ang. *Serrate*) biorą udział w tworzeniu cząsteczki pre-miRNA. Charakterystyczną cechą cząsteczki pre-miRNA jest jej drugorzędowa struktura w postaci pętli z „ogonem”, określana jako struktura „spinki do włosów”. Istotne jest, że region ogona zawiera sekwencję dojrzałej cząsteczki miRNA. Późniejsze cięcie pre-miRNA przez białko DCL1 skutkuje powstaniem dupleksu miRNA-miRNA*. Powstały dupleks może mieć długość od 21 do 24 nukleotydów i zawiera 2 nukleotydy jako wystające końce 3', które są metylowane przez enzym metylotransferazę HEN1 (ang. *Hua Enhancer 1*). Następnie białko HST (ang. *Hasty*) transportuje zmetylowany dupleks z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie następuje degradacja jednej z nici (Rycina 1). Druga nić to dojrzały miRNA, który jest częścią kompleksu RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*) zawierającego białko AGO1, który wiąże się z cząsteczką mRNA

docelowego genu (Kulasek i in., 2019). Cząsteczki miRNA wiążą się z komplementarnymi fragmentami sekwencji genów, hamując w ten sposób proces translacji (Rycina 1) (Li i in., 2017).



Rycina 1. Uproszczony schemat biogenezy i funkcjonowania miRNA w komórce roślinnej: RNA Pol II – DNA-zależna polimeraza RNA II; DCL1 – DICER-LIKE 1 (endorybonukleaza typu III); HYL1 – HYPOPLASTIC LEAVES 1; SE – SERRATE; HEN1 – HUA ENHANCER 1 (metyltransferaza); HASTY – eksportyna; AGO1 – ARGONAUTE 1.

Obecnie jednym z celów prac badawczych powinno być określenie funkcji cząsteczek miRNA u pszenicy zwyczajnej oraz jej bliskich krewnych lub przodkach, co może zwiększyć

szanse na poznanie specyficznych dla gatunku cząsteczek miRNA, a także związku między miRNA a ewolucją. Aktualne osiągnięcia w dziedzinie biotechnologii roślin niejednokrotnie przekraczają dotychczasowe oczekiwania, a perspektywy ich wykorzystania wydają się być jeszcze bardziej obiecujące. Co więcej, badania mechanizmów odporności z zastosowaniem narzędzi molekularnych powinny znajdować zastosowanie w praktyce hodowlanej kluczowych gatunków roślin uprawnych. Biotechnologia może w dalszym ciągu wpływać na rozwój rolnictwa, aby sprostać światowemu zapotrzebowaniu na odmiany lepiej przystosowane do zmieniających się warunków klimatycznych i jednocześnie wykazujące zadowalający poziom odporności na choroby.

Powyższe rozważania pozwoliły na sformułowanie hipotezy badawczej oraz celu prezentowanej rozprawy doktorskiej.

5. Hipoteza badawcza i cel pracy

Hipoteza badawcza zakłada, iż analiza ekspresji wybranych genów APR i powiązanych z nimi miRNA pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmu odporności na *Puccinia triticina* Eriks. Ponadto, analiza ekspresji genów kandydujących w *locus Lr46* pozwoli na wyselekcjonowanie potencjalnego genu odpowiedzialnego za odporność na rdzę brunatną.

Cel główny pracy

1. Celem głównym pracy jest wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów odporności u pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na porażenie pszenicy przez grzyb *Puccinia triticina*, powodujący rdzę brunatną.

Cele szczegółowe:

2. Określenie poziomu ekspresji genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr67* po inokulacji zarodnikami *Puccinia triticina*.
3. Analiza poziomu ekspresji cząsteczek miRNA komplementarnych do sekwencji analizowanych genów.
4. Próba identyfikacji genu *Lr46* (sprzężonego z odpornością na rdzę brunatną u pszenicy) spośród genów kandydujących opisanych w doniesieniach literaturowych.
5. Porównanie efektywności działania genów typu „*slow rust*” u różnych odmian pszenicy zwyczajnej oraz otrzymanych form mieszańcowych.

6. Materiały i metody

6.1. Materiał badawczy

W pierwszym roku badań materiał roślinny stanowiło jedenaście odmian pszenicy zwyczajnej, których nasiona otrzymano z Banku Genów z National Small Grains Collection (Agricultural Research Station w Aberdeen, USA) (Tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka odmian referencyjnych pszenicy zwyczajnej, pochodzących z Banku Genów

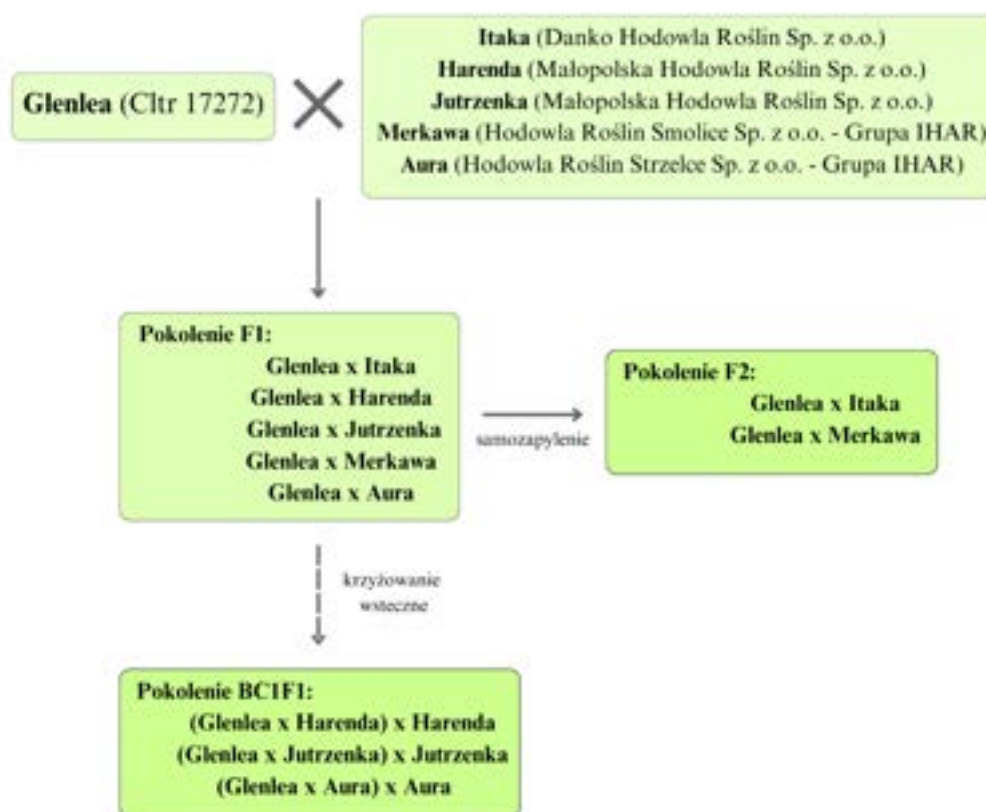
Lp.	Odmiana	Numer identyfikacyjny	Rodowód	Pochodzenie
1.	Myna'S'	PI 519783	Nord Desprez/Wagga Wagga//Lee/Frontana/3/Newthatch/4/Tanori 71 resel	Meksyk
2.	Frontana	PI 500147	Fronteira/Mentana	Brazylia
3.	Sparrow	PI 520081	Frontana/Marne Desprez//Kenya 117A/3/2*Copifen/4/Sonora 64/Klein Rendidor/3/Ciano sib//2*Lerma Rojo 64/Sonora 64	Meksyk
4.	Pavon'S'	PI 520054	Vicam 71//Ciano 67 sib/Siete Cerros 66/3/Kalyansona/Bluebird	Meksyk
5.	HN ROD	PI 191622	–	Portugalia
6.	Artigas	PI 192535	Americano 25E/Americano 26N	Urugwaj
7.	Artigas*	PI 73046	Americano 25E/Americano 26N	Urugwaj
8.	NP 846	PI 322263	Rio Negro/NP 760	Indie
9.	Glenlea	CItr 17272	Pembina*2/Bage//CB 100 CB 100 = Sonora 64/Tezanos Pintos Precoz//Nainari 60	Kanada
10.	Lerma Rojo	CItr 13651	Lerma 50/Yaqui 48//Mario Escobar*2/Supremo 211	Meksyk
11.	TX89D6435	PI 584759	Collin/Enano//TAM 200	USA

W kolejnych latach badań, sugerując się wynikami doświadczeń zarówno laboratoryjnych jak i polowych, wybrano pochodzącą z banku genów odmianę Glenlea, którą krzyżowano z wysoko plonującymi odmianami, pochodzącymi z polskich spółek hodowlanych (Tabela 2). Odmiana Glenlea charakteryzowała się odpornością na poziomie 9 (w skali 9 stopniowej; 1-podatne, 9-odporne). Ponadto, wykorzystując łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) w odmianie Glenlea zidentyfikowano analizowane geny odporności (*Lr34*, *Lr46* i *Lr67*).

Dzięki krzyżowaniom w kolejnych latach badań uzyskano pokolenia F1, F2 i BC1F1 posiadające pożądane geny odporności (Rycina 2).

Tabela 2. Charakterystyka odmian pochodzących z polskich spółek hodowlanych

Lp.	Odmiana	Pochodzenie	Rok wpisania do Krajowego Rejestru
1.	Aura	Hodowla Roślin Strzelce sp. z o.o. Grupa IHAR	2020
2.	Harenda	Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o.	2014
3.	Jutrzenka	Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o.	2018
4.	Itaka	DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o.	2021
5.	Merkawa	Hodowla Roślin Smolice sp. z o.o. Grupa IHAR	2019



Rycina 2. Schemat przeprowadzonych krzyżowań i uzyskanych form mieszańcowych pokoleń F1, F2 i BC1F1.

6.2. Metody badawcze

6.2.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

6.2.1.1. Izolacja genomowego DNA z tkanki liściowej pszenicy

W celu potwierdzenia obecności alleli warunkujących odporność u badanych odmian i form mieszańcowych, wyizolowano genomowe DNA i przeprowadzono reakcję PCR. DNA wyizolowano z liści 10-dniowych siewek przy użyciu zestawu GeneMATRIX Plant and Fungi DNA Purification Kit (EURx Ltd, Polska), zgodnie z procedurą załączoną przez producenta. Stężenie i jakość DNA określono przy użyciu spektrofotometru DeNovix (DeNovix Inc., USA) przy długości fali 260 nm. Próbkę zostały rozcieńczone buforem (EURx Ltd, Polska) do uzyskania jednolitego stężenia 50 ng/μL.

6.2.1.2. Identyfikacja markerów molekularnych

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) została wykorzystana w celu potwierdzenia obecności alleli związanych z genami *Lr34*, *Lr46* oraz *Lr67*. Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 20 μL mieszaniny reakcyjnej, składającej się z: 1 μL dwóch starterów (Sigma); 12,5 μL FastGene Optima HotStart ReadyMix (NIPPON Genetics Europe GmbH), który zawierał mieszaninę polimerazy DNA FastGene Optima (0,2 U na 1 μL reakcji), buforu FastGene Optima, dNTP (0,4 mM), MgCl₂ (4 mM) i stabilizatory. Profil temperaturowy reakcji był następujący: denaturacja wstępna w 94°C przez 5 minut, a następnie 35 cykli (denaturacja w 94°C przez 45 sekund; przyłączanie starterów w 60°C przez 30 sekund; wydłużanie nici w 72°C przez 1 minutę), a następnie końcowe wydłużanie nici przez 7 minut w 72°C i przechowywanie w 4°C. Produkty amplifikacji z wykorzystaniem markera *csLV46G22* trawiono enzymem restrykcyjnym *BspEI* (Thermo Fisher Scientific, USA) w 37°C przez 1 godzinę (Lagudah, prywatna korespondencja, 2020). Termocykler Labcycler (SensoQuest GmbH) został wykorzystany do przeprowadzenia reakcji trawienia enzymem restrykcyjnym. Produkty PCR były analizowane z wykorzystaniem 2% żelu agarozowego (Bioshop, Canada Inc.) w buforze TBE 1x (Bioshop, Canada Inc.) z dodatkiem 7 μL Midori Green Advanced DNA Stain (Nippon Genetics Europe, Niemcy). Wyniki elektroforezy zostały sfotografowane w świetle UV z wykorzystaniem systemu Molecular Imager GelDoc XR UV, z oprogramowaniem Bio Image.

6.2.2. Przeprowadzenie inokulacji zarodnikami *Puccinia triticinia*

Każdego roku realizacji badań doświadczenia prowadzono w fitotronie, w warunkach kontrolowanych: temperaturę ustawiono na 18°C w ciągu dnia i 16°C w nocy przy 16-godzinnym fotoperiodzie, gdzie wilgotność względna wynosiła od 60% do 70%. Ponadto, widmo emisji źródła światła zostało ustalone na poziomie strumienia fotonów 572 μ E. Miesiąc po rozpoczęciu eksperymentu temperatura w fitotronie została podniesiona do 20°C i 17°C, odpowiednio w ciągu dnia i nocy. Za stadium rośliny dorosłej uznano rośliny z wykształconym liściem flagowym, tj. po 34 dniach od wysiewu ziarniaków. Zarodniki grzyba zostały zebrane z zainfekowanych doświadczeń polowych, zlokalizowanych w różnych częściach Polski. Odmiany lub formy mieszańcowe pszenicy, w stadium rośliny dorosłej, zainokulowano *P. triticinia* poprzez rozpylenie zawiesiny zarodników grzyba w stężeniu około 5×10^5 zarodników/ml, z 1% v/v odczynnikiem Tween 20, przygotowaną bezpośrednio przed inokulacją. Fragmenty tkanki liściowej pobrano z każdej rośliny przed inokulacją oraz 6, 12, 24 i 48 hpi (ang. *hours post inoculation*) w trzech powtórzeniach biologicznych. Pobrane liście umieszczono w probówkach typu eppendorf i natychmiast zamrożono w ciekłym azocie. Zebrane fragmenty liści były przechowywane w kriozamrażarce (-80°C), do momentu rozpoczęcia izolacji RNA i miRNA.

6.2.3. Analiza ekspresji genów (RT-qPCR)

6.2.3.1. Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji (synteza cDNA)

Izolację całkowitego RNA z różnych próbek tkanek liści zebranych w powtórzeniach biologicznych i punktach czasowych (0, 6, 12, 24 i 48 hpi) przeprowadzono przy użyciu zestawu do izolacji Maxwell RSC Plant RNA Kit (Promega, Madison, USA). Stężenie i czystość wyizolowanego całkowitego RNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop w zakresie absorbancji A260/A280. Syntezę cDNA przeprowadzono z wykorzystaniem 1 μ g RNA, przy użyciu zestawu iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, Hercules, USA), zgodnie z protokołem dołączonym przez producenta. Profil temperaturowy reakcji syntezy cDNA był następujący: inkubacja wstępna przez 5 minut w 25°C, odwrotna transkrypcja przez 60 minut w 46°C, inaktywacja odwrotnej transkryptazy przez 1 minutę w 95°C, schłodzenie do 4°C i przechowywanie w 20°C.

6.2.3.2. Selekcja genów referencyjnych pszenicy

Wyniki ekspresji genów badanych należy odnieść do wartości ekspresji genów referencyjnych (ang. *housekeeping genes*), które mają stabilny profil ekspresji dla danego eksperymentu. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie znormalizowanych wartości ekspresji genów badanych. Na podstawie danych literaturowych, wybrano cztery geny referencyjne: *TUBβ*, *ARF*, *RLI* (Scholtz & Visser, 2013) oraz *EF2-1* (Xie i in., 2019) (Tabela 3). Zostały one przetestowane poprzez amplifikację PCR na matrycy cDNA (mieszanka prób po inokulacji patogenem), a następnie przeprowadzono elektroforezę (10 V/cm) w 2% żelu agarozowym. Na tym etapie uzyskano niespecyficzne produkty dla genu *RLI*, w związku z tym zrezygnowano z wykorzystania go jako genu referencyjnego. Dla pozostałych kandydujących genów referencyjnych opracowano krzywą standardową stosując takie samo podejście jak dla genów *Lr34* i *Lr67*. Na tym etapie, występowanie niespecyficznych produktów zaobserwowano analizując krzywe topnienia genu *EF2-1*. Po analizie krzywych standardowych, dwa geny (*TUBβ* i *ARF*) o najwyższych wartościach wydajności reakcji (%E) i współczynnik determinacji ($R^2 > 0,997$), *TUBβ* i *ARF*, zostały wybrane jako geny referencyjne dla RT-qPCR. Sekwencje starterów dla wybranych genów referencyjnych przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka sekwencji starterów dla wybranych genów referencyjnych.

Skrót genu	Produkt/funkcja genu	Sekwencje starterów (5'- 3')	Wydajność (%E)	R ²	T _m (°C)	Długość produktu (pz)
<i>TUBβ</i>	β-Tubulin	F CAAGGAGGTGGACGAGCAGATG R GACTTGACGTTGTTGGGGATCCA	101,1	0,998	82,0	84
<i>ARF</i>	ADP-ribosylation factor	FGCTCTCCAACAACATTGCCAAC R GCTTCTGCCTGTCACATACGC	93,5	0,999	82,0	165
<i>RLI</i>	RNase L inhibitor-like protein	F CGATTCAGAGCAGCGTATTGTTG R AGTTGGTCGGGTCTCTTCTAAATG	-	-	-	242
<i>EF2-1</i>	Elongation factor	F CATCAAGCGCATGTCTTCCG R GGTCGACCGTGTCTTCCAT	100,4	0,997	80,5	90

6.2.3.3. Projektowanie starterów do analizy RT-qPCR

Sekwencje genów *Lr34*, *Lr67* i genów kandydujących *Lr46* (Cobo i in., 2019) pozwoliły na zaprojektowanie specyficznych starterów do reakcji RT-qPCR (Tabela 4). Sekwencje dla genów kandydujących *Lr46/Yr29* znaleziono w bazie danych Ensembl Plants dla pszenicy zwyczajnej i pobrano je w formacie FASTA. Sekwencje wykorzystano do

zaprojektowania starterów do reakcji RT-qPCR przy użyciu narzędzia Primer3Plus. Region QTL opisany przez Cobo i in. (2019) obejmuje cztery kopie genu RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE (*RLK*) i trzy kopie GLUCAN ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASES (*Glu*), a także po jednej kopii SORTING NEXIN (*Snex*), SUGAR TRANSPORTER (*STr*) i TRANSCRIPTION FACTOR CARRYING THE WRKY DOMAIN (*WRKY*). Spośród wszystkich wymienionych genów kandydujących tylko gen *STr* nie ma innych bliskich analogów w referencyjnym genomie pszenicy (IWGSC 2018). W przypadku dwóch genów kandydujących, *Lr46-Snex* i *Lr46-WRKY*, sekwencje okazały się wystarczająco podobne, aby zaprojektować uniwersalne startery do wykrywania każdego transkryptu, w tym homologów na innych chromosomach (Tabela 5).

Tabela 4. Charakterystyka genów *Lr34/Yr18*, *Lr67/Yr46* i dziesięciu genów kandydujących dla *Lr46/Yr29*

Lp.	Numer identyfikacyjny	Skrót genu	Produkt/funkcja genu	Lokalizacja genu
1.	TraesCS7D02G080300.1	<i>Lr34</i>	ABC transporter	7D: 47,412,062-47,424,490
2.	TraesCS4D02G243100.1	<i>Lr67</i>	hexose transporter	4D: 405,770,757-405,775,531
3.	TraesCS1B02G453900.1	<i>Lr46-Glu1</i>	Glucan endo-1,3- β - glucosidase	1B: 669,922,599-669,924,501
4.	TraesCS1B02G454200.1	<i>Lr46-Glu2</i>	Glucan endo-1,3- β - glucosidase	1B: 670,142,374-670,144,629
5.	TraesCS1B02G454500.1	<i>Lr46-Glu3</i>	Glucan endo-1,3- β - glucosidase	1B: 670,158,858-670,161,009
6.	TraesCS1B02G454000.2	<i>Lr46-RLK1</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,025,362-670,028,705
7.	TraesCS1B02G454100.1	<i>Lr46-RLK2</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,034,245-670,037,207
8.	TraesCS1B02G454400.1	<i>Lr46-RLK3</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,152,915-670,155,867
9.	TraesCS1B02G454600.1	<i>Lr46-RLK4</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,164,777-670,167,783
10.	TraesCS1B02G454800.2	<i>Lr46-STr</i>	Sugar transporter	1B: 670,185,922-670,187,880
11.	TraesCS1B02G453700.1	<i>Lr46-Snex</i>	Sorting nexin	1B: 669,895,813-669,902,629
12.	TraesCS1B02G455000.1	<i>Lr46-WRKY</i>	WRKY transcription factor	1B: 670,202,181-670,203,493

Tabela 5. Charakterystyka sekwencji zaprojektowanych starterów dla genów badanych

Skrót genu	Sekwencja starterów (5' - 3')	Długość produktu (pz)	Wydajność (%E)	R ²	T _m (°C)
<i>Lr34</i>	F GGTAGTAGCAGTTGAAGC R CTCTTCTCATTGCATCCC	110	109,4	0,994	81,0
<i>Lr67</i>	F GCCATCTTCATCTTCTTC R CTGCTTCCACACCTTGTC	118	100	1,000	85,0
<i>Lr46-Glu1</i>	F GGTGCAGAGCAATGTGAA R AGCTGAGAGTTTAGTTGG	102	84,4	0,999	84,5
<i>Lr46-Glu2</i>	F TATCTCTTGTTCCGCCCC R CCATCGCATAGTACACAG	103	84,3	0,998	84,5
<i>Lr46-Glu3</i>	F ACTCCAGACGTCATTCCC R GAACCGGTCTGTGCGAAAA	99	93,1	0,999	85,5
<i>Lr46-RLK1</i>	F ACGGGAAGGAAGAACAAT R ATCCATCATGTCCAACACC	105	109,4	0,998	79,5
<i>Lr46-RLK2</i>	F TGAGATCGTGACGGGAAG R CTAGCATCTCCAGTAGTGT	114	95,3	0,998	83,5
<i>Lr46-RLK3</i>	F CAGGGACCTTAAAGCTAAT R GGTGTTGAGTATGAGTGTG	109	92,0	0,999	80,5
<i>Lr46-RLK4</i>	F TTCAGCTTTGGCGTATTGCAAC R ACGGGTCTAGCATCTCCAGT	101	91,3	0,998	83,0
<i>Lr46-Str</i>	F GGCCGTGAACGTGTATAT R GTGTCGGTGCCATTTTCAG	107	-	-	-
<i>Lr46-Snex</i>	F CTTTGATAGTTCTGTTTCGC R TTTGTTTTGGCAAGTGGG	103	92,1	1,000	81,5
<i>Lr46-WRKY</i>	F TTTCTTCGCCTCTTTTGAC R GTGGAACCAATTCTCGTA	120	94,2	0,999	82,5

6.2.3.4. Reakcja RT-qPCR

Analizy RT-qPCR przeprowadzono przy użyciu odczynnika iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA) i termocyklera CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA). Każdy z przeprowadzonych eksperymentów RT-qPCR składał się z trzech powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych, których wyniki zostały uśrednione. Dodatkowo, dla każdego badanego genu przeprowadzono również kontrolę negatywną bez matrycy cDNA – NTC (ang. *No Template Control*), każdorazowo w trzech powtórzeniach technicznych, podobnie jak dla genów badanych. Skład mieszaniny reakcyjnej RT-qPCR był następujący: iTaq supermix - 5 µL, startery „forward” i „reverse” (10 µM) - 0,5 µL każdy (Tabela 5), 3 µL wody wolnej od nukleaz i matryca cDNA -1 µL. Zgodnie

z zaleceniami MIQE dotyczącymi prawidłowości analiz PCR w czasie rzeczywistym, zastosowano trzy powtórzenia biologiczne dla każdego typu genu, w każdym punkcie czasowym dla danej odmiany lub formy mieszańcowej pszenicy i przygotowano trzy powtórzenia techniczne dla każdego z nich (Bustin i in., 2009). W reakcjach RT-qPCR zastosowano następujący profil temperaturowy: denaturacja wstępna przez 3 minuty w temperaturze 95 °C; następnie 40 cykli: denaturacja przez 10 sekund w temperaturze 95 °C, przyłączanie starterów przez 30 sekund w temperaturze 53,5°C, Etap topnienia (krzywa topnienia): zakres temperatur od 65°C do 90°C; co 5 sekund temperaturę zwiększano o 0,5°C. Analiza ekspresji dla tego eksperymentu przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Bio-Rad CFX Maestro i narzędzia GeneStudy (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA), uzyskując wartości znormalizowanej ekspresji genów.

6.2.3.5. Przygotowanie ampliconów do sekwencjonowania Sangera

W celu potwierdzenia specyficzności zastosowanych starterów oraz amplifikacji właściwego fragmentu DNA przeprowadzono sekwencjonowanie Sangera ampliconów dla wszystkich badanych genów. Dodatkowym atutem tego podejścia była możliwość scharakteryzowania potencjalnych polimorfizmów sekwencji między genotypem odpornym (odmiana Glenlea) a genotypem podatnym (odmiana Artigas*). Większość ampliconów do sekwencjonowania amplifikowano z cDNA. Jednak *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2* i *Lr46-RLK4* były wyjątkami, które wynikały z uzyskania niskiej ilości i/lub jakości produktów PCR przy użyciu cDNA. W tych przypadkach użyto genomowego DNA, wyizolowanego z liści przy użyciu GeneMATRIX Plant and Fungi DNA Purification Kit (EURx Ltd, Gdańsk, Polska), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. W celu potwierdzenia zgodności sekwencji analizowanych genów kandydujących w *locus Lr46/Yr29* przeprowadzono reakcje PCR dla odpowiednich par starterów. Do przygotowania reakcji PCR wykorzystano odczynniki GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Zastosowano następujący profil temperaturowy amplifikacji: początkowa denaturacja przez 2 minuty w 94°C; następnie 35 cykli: denaturacja przez 1 minutę w 95°C, przyłączanie starterów przez 30 sekund w 53,5°C, wydłużenie nici przez 30 sekund w 72°C, wydłużenie przez 30 sekund w 72°C; końcowe wydłużenie nici przez 5 minut w 72°C i schłodzenie prób do 4°C. Oczyszczanie ampliconów przeprowadzono przy użyciu zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Hilden, Niemcy), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Po oczyszczeniu próbki

zawieszono w buforze elucyjnym w objętości 30 μ L. Oczyszczone amplikony sekwencjonowano metodą Sangera przy użyciu zestawu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) i kapilarnego analizatora DNA 3730xl (Applied Biosystems) w ramach usługi firmy Genomed (Warszawa, Polska). Uzyskane sekwencje amplikonów zostały przeanalizowane przy użyciu oprogramowania Geneious v8.1 (Kearse i in., 2012) i przyrównane do genomu referencyjnego pszenicy odmiany Chinese Spring (IWGSC RefSeq v1.0).

6.2.4. Analiza ekspresji cząsteczek miRNA, komplementarnych do sekwencji analizowanych genów (ddPCR)

6.2.4.1. Zaprojektowanie starterów i analiza ekspresji cząsteczek miRNA (ddPCR)

W prezentowanej rozprawie doktorskiej analizowano ekspresję miRNA związanych z genem *Lr34* oraz genami kandydującymi dla locus *Lr46*. W przypadku genu *Lr34* zaprojektowano startery dla trzech komplementarnych miRNA: tae-miR9653b, tae-miR9773, tae-miR9677b. W przypadku genów kandydujących analizie poddano ekspresję czterech miRNA: trzech związanych z genem kandydującym *Lr46-Glu2* (tae-miR5384-3p, tae-miR9780, tae-miR9775), tae-miR9780 komplementarnego również do *Lr46-RLK2* oraz tae-miR164 komplementarnego do *Lr46-RLK3*. Dostępne bazy danych dla pszenicy zwyczajnej i dane literaturowe nie wykazały cząsteczek miRNA komplementarnych do genu *Lr67*. Sekwencje kodujące genów badanych, docelowych dla miRNA, pobrano z bazy danych Ensembl Plants i przeanalizowano w internetowej bazie danych psRNATarget. Sekwencje analizowanych cząsteczek miRNA znaleziono w bazie danych miRBase i pobrano w formacie FASTA. Startery do odwrotnej transkrypcji miRNA i reakcji ddPCR zaprojektowano przy użyciu strony internetowej Integrated DNA Technologies, zgodnie z protokołami opracowanymi przez zespół Forero (2019) wraz ze współpracownikami oraz Kramer'a (2011) (Forero i in., 2019; Kramer, 2011). Zaprojektowane startery zostały przedstawione w Tabeli 6 oraz Tabeli 7.

Tabela 6. Charakterystyka badanych cząsteczek miRNA oraz sekwencje zaprojektowanych starterów do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT)

Gen	Nazwa miRNA	Seqwencje starterów (5'-3')	Seqwencja struktury spinki do włosów (stem loop)	Seqwencja dojrzałego miRNA
<i>Lr34</i>	tae-miR9653b	GTCGTATCCAGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACAGCCTC	CCACGGCCAUGGCCAAGGUCUCUUGAGGCUUGGCCUUGAAGACUUUG GCCAUGUCCAUGG	UGGCCAAGGUCUC UUGAGGCU
	tae-miR9773	GTCGTATCCAGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACTTCACA	UUGUUGUUCAGAAAUAGGAAAGCAGAAUGAAAUCCAGUCUUAGUCAAA UAUUUCAUAUCUCUUCUUAUCCAUUUAAAACAUAUGGAUUUAGAGUAGA GCAUAUGGAUCAAUUCUAAUUUAUUUAUAAGAAUCGAAUGUGUUUGU UUUUAUGUUAUUUUGUGAAGAA	UUUGUUUUUAUGUU AUUUUGUGAA
	tae-miR9677b	GTCGTATCCAGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACGGCCAC	UGCUGGGCAUCAGGGCGGGGAACAGGUGGCCAUGCUCGUCUCCUACU CUACCAACGGCCACGCCAUGGUCGCGGGGAGACGUGGCUGUUGGUAG AGUGGAAGAGAAGCGAGGCCGCCUUUGAUGGUGAGCACCGCGCA	CAGGGCGGGGAAC AGGUGGCC
<i>Lr46-Glu2</i>	tae-miR5384-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACCATTCC	UGCCGACCCCUUCGCCGGUCGCGCGUCCCCUUGCGGUGAGCGCGCCG CCGUCGAAUGGAUCGGUG	UGAGCGCGCCGCC GUCGAAUG
<i>Lr46-RLK3</i>	tae-miR164	GTCGTATCCAGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACTGGA TAGGACTGCACG	GGUGGAGAAGCAGGGCAGUGCAUCCAUUUCCAGCUCGGCAUCCCCG GCGUCCGGCCGGCCGGCUGCCCGGCCUUGCCUGGCUGGGUAGUGCGU CGCUCGAUCCGGCCGUGCGCCGGCGGCCGCCUUGCAUGCAUGUGCCU UUCUUCUCCACC	UGGAGAAGCAGGG CACGUGCA
<i>Lr46-Glu2</i> i <i>Lr46-RLK2</i>	tae-miR9780	GTCGTATCCAGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACGCCGCG-	CGCCGUGGUGGCCGAGGAUGCAAGGCGUGGGGGAGCUGGCCAAGGCGU GCACCACCAUCAUCUGGAUCGGGUCGGCGCUGCACGCGGCG	CGGGUCGGCGCUG CACGCGGC
<i>Lr46-Glu2</i>	tae-miR9775	GTCGTATCCAGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACTAGCAA	CAUCAUAUUAUGUGCGCAAUAAGAUAUUUGCUAUGCUUUCACCGUUGA UUCAACCAAUUGACAUCAUUGUUGAUAAAGGCAUGGAAAAUUCUUAU GUAUACAUGAUUUGGUG	UGUGCGCAAUAAG AUUUUGCUA
Gen referencyjny	Scrabled short RNA (SCR)	AUAGGCCAUAAAGGAGUCU CGGUACGUCUUGUAUG	-	-
	SCR-Forward RT	ATAGGCCATAAGGAGTCTC GGTACGTCT	-	-

Tabela 7. Sekwencje starterów zaprojektowanych do analizy ekspresji miRNA metodą ddPCR

Gen	Starter	Sekwencja startera (5'- 3')
	tae-miR9653b F	ACGCAGTGGCCAAGGTCTCTT
<i>Lr34</i>	tae-miR9773 F	GGCGCGGTTTGTTTTTTATGTTATTT
	tae-miR9677b F	ACTCATCAGGGCGGGGAACAG
<i>Lr46-RLK3</i>	tae-miR164 F	AGTCAGTGGAGAAGCAGGGCA
<i>Lr46-Glu2 i</i> <i>Lr46-RLK2</i>	tae-miR9780 F	ATATTACGGGTCCGGCGCTGCA
<i>Lr46-Glu2</i>	tae-miR5384-3p F	ATAGTATGAGCGCGCCGCCGT
<i>Lr46-Glu2</i>	tae-miR9775 F	GCCGCCTGTGCGCAATAAGATT
–	Uniwersalny R	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

6.2.4.2. Izolacja miRNA pszenicy i reakcja odwrotnej transkrypcji (synteza cDNA)

Tkanę liściową do izolacji miRNA pobierano analogicznie do protokołu izolacji RNA. Do izolacji miRNA wykorzystano zestaw do izolacji mirVana miRNA Isolation Kit firmy ThermoFisher Scientific oraz mieszaninę fenol:chloroform. Izolacja miRNA została przeprowadzona zgodnie z protokołem dołączonym przez producenta. Otrzymane próbki były przechowywane w w kriozamrażarce (-80°C) w celu uniknięcia możliwej degradacji. Frakcja miRNA została następnie poddana reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), z użyciem specyficznych, zaprojektowanych starterów (Tabela 6) według protokołu opracowanego przez Varkonyu-Gasic (2007) wraz ze współpracownikami (Varkonyi-Gasic i in., 2007): inkubacja w 16°C przez 30 minut; 60 cykli w 30°C przez 30 sekund, 42°C przez 30 sekund i 50°C przez 1 sekundę; inkubacja w 85°C przez 5 minut.

6.2.4.3. Reakcja ddPCR

W celu ilościowego określenia liczby cząsteczek miRNA w próbkach roślinnych użyto mieszaniny ddPCR składającej się z 10 µL ddPCR SuperMix Eva Green, starterów (200 nM), matrycy (odwrotnie transkrybowanego, wydłużonego miRNA) i wody wolnej od RNaz. Mieszanina reakcyjna o objętości 20 µL została użyta do wygenerowania kropeł reakcyjnych w 8-dołkowej kasecie przy użyciu generatora kropeł QX100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Krople zostały ostrożnie przeniesione do 96-dołkowej płytki ddPCR i

uszczelnione termicznie za pomocą plastikowych osłon z folią termiczną (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Następnie przeprowadzono amplifikację w termocyklerze T100 PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) w następujących warunkach temperaturowych: denaturacja w 95°C przez 5 minut, a następnie 40 cykli z trzypunktowym profilem termicznym denaturacji w 95°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w 58°C przez 30 sekund i elongacja nici w 72°C przez 45 sekund. Następnie produkty utrzymywano w temperaturze 72°C przez 2 minuty w celu końcowej elongacji powstałej nici. Po amplifikacji otrzymane produkty PCR schładzano do 4°C przez 5 minut, a następnie ogrzewano do 90°C przez 5 minut i ponownie doprowadzano do 12°C. Otrzymane produkty PCR analizowano ilościowo w czytniku kropel QX100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Analizę danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania QuantaSoft w wersji 1.7 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Krople dodatnie, zawierające produkty amplifikacji odróżniono od kropki ujemnych, ustawiając próg amplitudy fluorescencji na najniższą wartość dodatniego klastra kropel. Jako kontrolę negatywną zastosowano cząsteczki tRNA z drożdży - tRNA-Thr (TGT),

6.2.5. Analiza statystyczna

Test Kołmogorowa-Smirnowa został wykorzystany do oceny hipotezy zerowej, czy zestaw znormalizowanych wartości ekspresji dla określonego genu i odmian pochodzi z rozkładu normalnego. Do oceny równości wariancji zastosowano test Levene'a w wariancie Browna-Forsythe'a oraz test Bartletta. W celu porównania średnich wykonano dwustronny test t-Studenta. Dla porównania średnich ekspresji w każdym badanym punkcie czasowym po inokulacji do ekspresji przed inokulacją wykonano kontrasty elementarne, przeprowadzone dla każdej odmiany niezależnie. Dodatkowo, przeprowadzono dwukierunkowe analizy wariancji (ANOVA) w celu określenia głównego wpływu odmiany i punktu czasowego, a także interakcji odmiany \times punktu czasowego na zmienność poszczególnych profili ekspresji analizowanych genów. Ekspresję analizowanych genów badanych i kandydujących przedstawiono w postaci map cieplnych. Testy istotnych różnic Tukey'a (post-hoc czynnikiowa jedno- lub dwukierunkowa ANOVA, w zależności od wyników ANOVA) przeprowadzono z użyciem programu R Studio, wersja v.4.4.0 (R Core Team 2024) przy użyciu pakietu agricolae v.1.3-7 (de Mendiburu et al. 2019), przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Pozostałe analizy zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu oprogramowania statystycznego GenStat (VSN International Genstat for Windows 23rd Edition, 2023), Excel 2021 oraz Python 3.11.7.

7. Wyniki

7.1. Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z analizowanymi genami w badanych pokoleniach (P1, P2, P3, P4)

Zastosowanie markerów molekularnych z powodzeniem pozwoliło na identyfikację wybranych genów odporności na *Lr* w testowanych odmianach i formach mieszańcowych pszenicy. Marker *csLV34*, zakotwiczony w sekwencji genu *Lr34*, posłużył do weryfikacji obecności odpowiednich alleli (Tabela 8). Zgodnie z danymi literaturowymi, marker STS *csLV34* jest wysoce wiarygodnym dla identyfikacji *Lr34* (Lagudah i in., 2009). W przypadku obecności *Lr34* uzyskano produkt o długości 150 pz. O braku genu *Lr34* informuje uzyskany produkt o długości 229 pz. Marker został zidentyfikowany we wszystkich badanych odmianach odpornych pszenicy, pochodzących z Banku Genów (P1, P2). W czterech analizowanych formach mieszańcowych uzyskano układ heterozygotyczny, jedynie w przypadku odmiany Harenda × Glenlea uzyskano homozygotę (+) (Tabela 7). W przypadku braku *Lr34* otrzymano by produkt PCR o długości 229 pz (-). Dzięki dalszym krzyżowaniom uzyskano formy mieszańcowe pokoleń F2 i BC1F1, które również poddano selekcji z wykorzystaniem powyższych markerów molekularnych (Tabela 9). W tych pokoleniach, wykorzystanie markera *csLV34* pozwoliło na identyfikację 46% form heterozygotycznych (H) genu *Lr34* oraz 6% form homozygotycznych (+).

Marker *csLV46G22* powiązany z locus *Lr46/Yr29* (E. Lagudah, dane nieopublikowane) został zidentyfikowany we wszystkich badanych odmianach odpornych pszenicy, pochodzących z Banku Genów (Bobrowska i in., 2022) oraz we wszystkich formach mieszańcowych pszenicy uzyskanych pokoleń (Tabela 8, Tabela 9).

Molekularne markery flankujące SSR, *cfid23* (Hiebert i in., 2010) i *cfid71* (Hiebert i in., 2010), zostały wykorzystane w celu potwierdzenia obecności genu *Lr67* (Tabela 8). W przypadku *cfid23* uzyskano produkt amplifikacji o długości 211 pz, natomiast w przypadku *cfid71* produkt o długości 214 pz. W przypadku wykorzystania markera *cfid23* obecność allelu warunkującego odporność *Lr67* została potwierdzona u 55% form mieszańcowych pokoleń F2 i BC1F1 (+), natomiast marker *cfid71* pozwolił na identyfikację genu u 62%. Amplikony obu markerów flankujących (*cfid23* i *cfid71*) zidentyfikowano u 35% form mieszańcowych pokoleń F2 i BC1F1 (+). Uzyskanie powyższych wyników pozwoliło na wstępną charakterystykę genotypów i selekcję uzyskanych form mieszańcowych do dalszych doświadczeń, obejmujących analizę ekspresji wspomnianych genów odporności i genu kandydującego.

Tabela 8. Identyfikacja markerów molekularnych *csLV34*, *csLV46G22*, *cfid23* i *cfid71* w badanych formach mieszańcowych pszenicy zwyczajnej pokolenia F1

Lp.	Forma mieszańcowa	<i>Lr34</i> (<i>csLV34</i>)	<i>Lr46</i> (<i>csLV46G22</i>)	<i>Lr67</i> (<i>cfid23</i>)	<i>Lr67</i> (<i>cfid71</i>)
1.	Harenda × Glenlea	+	+	+	+
2.	Jutrzenka × Glenlea	H	+	+	+
3.	Aura × Glenlea	H	+	+	+
4.	Itaka × Glenlea	H	+	+	+
5.	Merkawa × Glenlea	H	+	+	+

*H – heterozygota

Tabela 9. Identyfikacja markerów molekularnych związanych z badanymi genami odporności u form mieszańcowych pszenicy z pokoleń F2 i BC1F1.

Lp.	Nazwa rośliny	Spółka hodowlana	Forma mieszańcowa BC1F1/F2	<i>Lr34</i> (<i>csLV34</i>)	<i>Lr46</i> (<i>csLV46G22</i>)	<i>Lr67</i> (<i>cfid23</i>)	<i>Lr67</i> (<i>cfid71</i>)
1.	HxG 1 I	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	H	+	+	-
2.	HxG 1 II	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	-	+	-	-
3.	HxG 1 III	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	H	+	-	+
4.	HxG 1 IV	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	H	+	-	-
5.	HxG 2 I	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	-	+	-	-
6.	HxG 2 II	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	-	+	-	+
7.	HxG 2 III	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	H	+	-	+
8.	HxG 2 IV	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	-	+	-	-
9.	HxG 3 I	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	-	+	-	-
10.	HxG 3 II	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	H	+	-	-
11.	HxG 3 III	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	-	+	+	-
12.	HxG 3 IV	Małopolska HR	(Harenda × Glenlea) × Harenda	H	+	-	+
13.	JxG 1 I	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	H	+	+	-
14.	JxG 1 II	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	H	+	+	-
15.	JxG 1 III	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	H	+	+	-
16.	JxG 2 I	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	-	+	-	-
17.	JxG 2 II	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	-	+	-	-
18.	JxG 2 III	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	-	+	-	-
19.	JxG 3 I	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	-	+	-	-

20.	JxG 3 II	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	H	+	+	+
21.	JxG 3 III	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	-	+	-	-
22.	JxG 3 IV	Małopolska HR	(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	H	+	+	-
23.	17 I	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	+	+
24.	17 II	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
25.	17 III	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
26.	17 IV	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	+	+
27.	17 V	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
28.	18 I	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	+	+
29.	18 II	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
30.	18 III	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
31.	18 IV	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
32.	21 I	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
33.	21 II	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
34.	21 III	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
35.	21 IV	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	+	+
36.	21 V	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	-	+
37.	22 I	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	+	+
38.	22 II	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	+	+
39.	22 III	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	-	+
40.	22 IV	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	-	+
41.	22 V	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	-	+
42.	24 I	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	-	+
43.	24 II	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	-	+
44.	24 III	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	-	+
45.	24 IV	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	-	+
46.	24 V	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	-	+
47.	25 I	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	-	+
48.	25 II	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	-	+
49.	25 III	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	-	+
50.	25 IV	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	-	+	-	+
51.	25 V	Strzelce HR	(Aura × Glenlea) × Aura	H	+	+	+
52.	D1 I	Danko HR	Itaka × Glenlea	+	+	+	-
53.	D1 II	Danko HR	Itaka × Glenlea	+	+	+	-
54.	D1 III	Danko HR	Itaka × Glenlea	+	+	-	+
55.	D1 IV	Danko HR	Itaka × Glenlea	H	+	+	-
56.	D1 V	Danko HR	Itaka × Glenlea	-	+	+	+
57.	D2 I	Danko HR	Itaka × Glenlea	H	+	+	+
58.	D2 II	Danko HR	Itaka × Glenlea	+	+	-	-
59.	D2 III	Danko HR	Itaka × Glenlea	-	+	+	-
60.	D2 IV	Danko HR	Itaka × Glenlea	H	+	+	-
61.	D2 V	Danko HR	Itaka × Glenlea	+	+	+	-

62.	D3 I	Danko HR	Itaka × Glenlea	+	+	+	+
63.	D3 II	Danko HR	Itaka × Glenlea	-	+	+	-
64.	D3 III	Danko HR	Itaka × Glenlea	-	+	+	-
65.	D3 IV	Danko HR	Itaka × Glenlea	-	+	+	-
66.	D3 V	Danko HR	Itaka × Glenlea	H	+	+	+
67.	MxG I	Smolice HR	Merkawa × Glenlea	H	+	-	+
68.	MxG II	Smolice HR	Merkawa × Glenlea	H	+	+	+
69.	MxG III	Smolice HR	Merkawa × Glenlea	-	+	+	+
70.	MxG IV	Smolice HR	Merkawa × Glenlea	H	+	+	+
71.	MxG V	Smolice HR	Merkawa × Glenlea	H	+	+	+

*H – heterozygota

Selekcja przeprowadzona z wykorzystaniem powyższych markerów molekularnych była niezbędna w wyborze roślin poddanych inokulacji zarodnikami *Pt* oraz dalszym analizom molekularnym; wybrane rośliny zostały wyróżnione kolorem szarym (Tabela 9).

7.2. Wybór formy donorowej pszenicy

Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z genami *Lr34*, *Lr46* oraz *Lr67* wraz z analizą ich ekspresji pozwoliła na wybranie odmiany Glenlea jako formy donorowej alleli warunkujących odporność badanych genów (P2 i P3). Podczas krzyżowań wykonywanych w kolejnych latach prowadzenia doświadczeń, geny te były wprowadzane do odmian jarych pszenicy (formy akceptorowe). Formy akceptorowe pochodzą z polskich spółek hodowlanych i zostały przedstawione na Rycinie 2.

7.3. Wyniki sekwencjonowania metodą Sangera

Przeprowadzono sekwencjonowanie Sangera w celu weryfikacji skuteczności zaprojektowanych starterów oraz weryfikacji występowania potencjalnego polimorfizmu. Analiza pozwoliła na potwierdzenie, że sekwencje amplikonów są komplementarne zarówno do genu *Lr34* jak i *Lr67* (Tabela 10). Sekwencja amplikonu *Lr34* (TraesCS7D02G080300.1) jest komplementarna do referencyjnej sekwencji *locus Lr34* (Rycina 4), obejmującej eksony 7 i 8. Otrzymany produkt był identyczny z sekwencją referencyjną z kilkoma heterozygotycznymi pozycjami nukleotydów. Alternatywne nukleotydy występują w heterozygotycznych pozycjach, które odpowiadają homologom zlokalizowanym na chromosomach 4A i 7A. W przypadku genu *Lr67* (TraesCS4D02G243100.1), produkt PCR został dopasowany do regionu zlokalizowanego w 1350-1467 pz na referencyjnej sekwencji

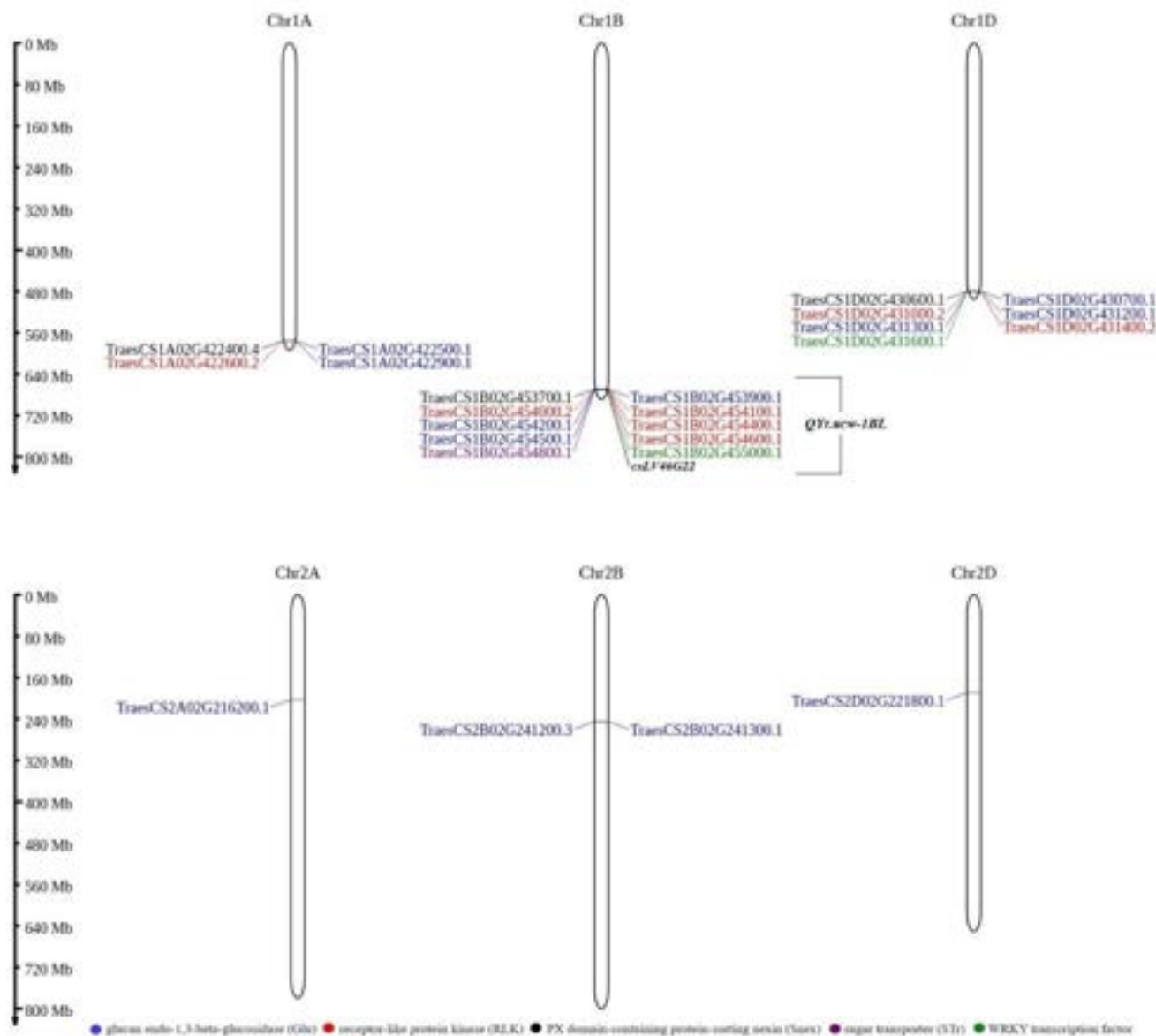
locus Lr67 (Rycina 4), w 3 eksonie. Zidentyfikowano jeden heterozygotyczny nukleotyd (25C/G), odpowiadający homologom obecnym w chromosomach 4A i 4B. Sekwencje obu produktów PCR przedstawiono w Tabeli uzupełniającej S2 (P2). Lokalizację genów *Lr34* i *Lr67* przedstawia Rycina 4.

Geny *RLK* i *Glu* występują w setkach kopii w całym genomie pszenicy. Ponadto, bardzo podobne układy genów znajdują się w dwóch chromosomach 1A i 1D (Rycina 3), w tym samym regionie co w chromosomie 1B. Analiza podobieństwa sekwencji ampliconu *Lr46-Glu3* po sekwencjonowaniu Sangera również ujawniła obecność genów homologicznych na chromosomach 2A, 2B i 2D (Rycina 3). Wyniki sekwencjonowania otrzymanych ampliconów przedstawiono poniżej w tabeli (Tabela 10). Dzięki sekwencjonowaniu metodą Sangera udało się uzyskać sekwencje dla większości docelowych ampliconów i tym samym potwierdzić specyficzność i skuteczność zaprojektowanych starterów. Pełne sekwencje uzyskanych ampliconów, lokalizację i charakterystykę genów kandydujących dla genu *Lr46/Yr29* można znaleźć w Materiałach uzupełniających (P3).

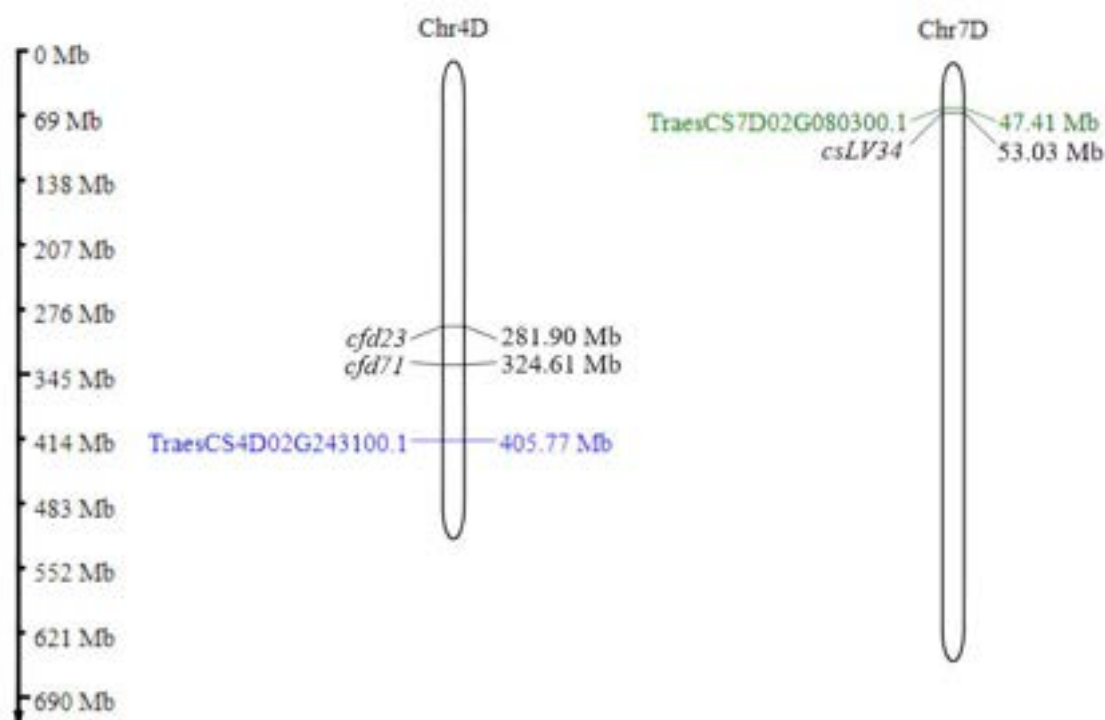
Tabela 10. Charakterystyka sekwencji ampliconów *Lr34*, *Lr67* i genów kandydujących dla *Lr46/Yr29*, uzyskanych za pomocą sekwencjonowania Sangera

Skrót genu	Nazwa ID genu	Długość ampliconu (pz)	Długość genu (pz)	Region ampliconu (pz)	Symbol w bazie NCBI	Symbol w bazie UniProt
<i>Lr34</i>	TraesCS7D02G080300.1	110	3875	1544 – 1655	LOC123169079	A0A3B6I036
<i>Lr67</i>	TraesCS4D02G243100.1	118	2077	1350 – 1467	LOC123098224	A0A0S1LH59
<i>Lr46-Glu1</i>	TraesCS1B02G453900.1	102	1722	308 – 410	LOC123100246	A0A3B5Z521
<i>Lr46-Glu2</i>	TraesCS1B02G454200.1	103	2529	677 – 779	LOC123148549	A0A3B5Z537
<i>Lr46-Glu3</i>	TraesCS1B02G454500.1	99	1968	635 – 733	LOC123100285	A0A3B5Z6G2
<i>Lr46-RLK1</i>	TraesCS1B02G454000.2	105	-	-	-	-
<i>Lr46-RLK2</i>	TraesCS1B02G454100.1	114	2526	1935 – 2047	LOC123148523	A0A3B5Z656
<i>Lr46-RLK3</i>	TraesCS1B02G454400.1	109	2217	1419 – 1527	LOC123100274	A0A3B5Z530
<i>Lr46-RLK4</i>	TraesCS1B02G454600.1	101	2514	1959 – 2041	LOC123148523	A0A3B5Z5H2
<i>Lr46-Snex</i>	TraesCS1B02G453700.1	103	3742	278 – 380	LOC123148452	A0A3B5Z651
<i>Lr46-WRKY</i>	TraesCS1D02G431600.1	118	1226	906 – 1024	LOC123100317	A0A3B6A1Y2

W przypadku pierwszego genu kandydującego, *Lr46-Glu1*, amplifikowano sekwencję TraesCS1B02G453900.1, ale z polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (G) w pozycji 40 w porównaniu z sekwencją TraesCS1A02G422500.1 (Rycina 3). W przypadku odmiany Glenlea zaobserwowano C + G w pozycji 40, uzyskując zasadniczo podobny poziom amplifikacji TraesCS1B02G453900.1 i TraesCS1A02G422500.1 (Rycina 3). Gen *Lr46-Glu2* w odmianie Artigas* amplifikował fragment sekwencji TraesCS1A02G422900.1 (nukleotyd A w pozycji 38) i TraesCS1B02G454200.1 (nukleotyd G w pozycji 38). W odmianie Glenlea amplifikowano dokładną sekwencję homologiczną TraesCS1A02G422900.1. W przypadku *Lr46-RLK1* nie było możliwe uzyskanie sekwencji, która pozwoliłaby na prawidłowy odczyt. W przypadku genu kandydującego *Lr46-RLK3* amplifikowano sekwencję genu TraesCS1B02G454400.1, z niewielkim udziałem sekwencji genu homologicznego TraesCS1D02G431000.1 (Rycina 3). Ostatnim analizowanym genem kandydującym był *Lr46-WRKY*, dla którego uzyskano amplikon (118 pz) pochodzący z fragmentu genu TraesCS1D02G431600.1, a więc z homologicznego wobec genu kandydującego TraesCS1B02G4550 (Rycina 3).



Rycina 3. Lokalizacja 10 genów kandydujących dla *Lr46/Yr29* na chromosomie 1B i homologów na chromosomach pszenicy 1A, 1D, 2A, 2B i 2D. Geny kandydujące dla *Lr46/Yr29*, w tym region *QYr.ucw-IBL*, zostały wyróżnione odpowiednimi kolorami, przedstawionymi w legendzie, zgodnie z ich funkcjami biologicznymi lub rodziną genów. Wyróżnione homologi genów kandydujących zostały wybrane na podstawie analizy porównawczej amplikonów po sekwencjonowaniu Sangera. „Chr1A” i podobne oznaczenia określają nazwę chromosomu pszenicy, a skrót „Mb” odnosi się do długości chromosomów (Spychała i in., 2024a). Mapa genetyczna została skonstruowana przy użyciu narzędzia MG2C_v2.1 (Chao i in., 2021).



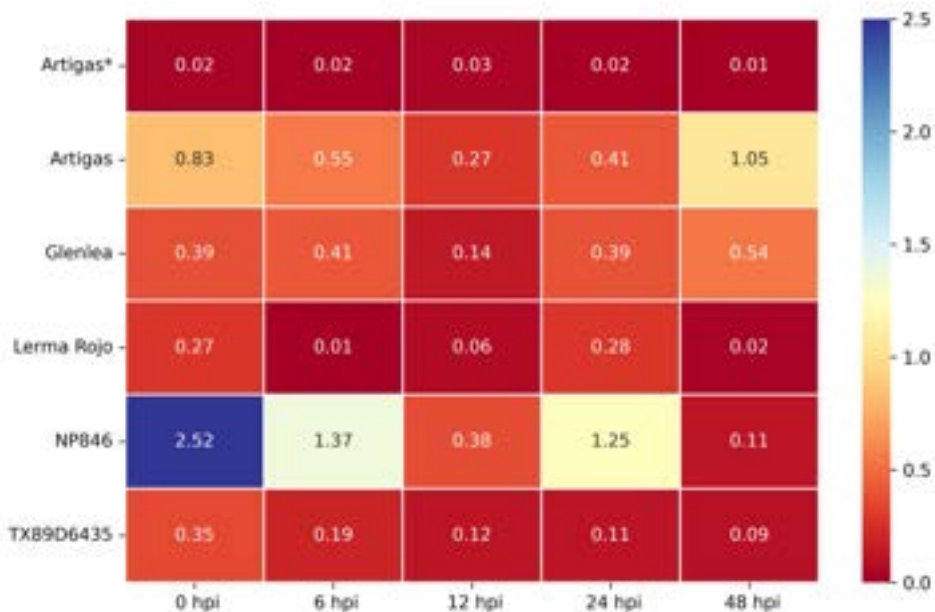
Rycina 4. Lokalizacja genów odporności *Lr67/Yr46* (TraesCS4D02G243100.1) i *Lr34/Yr18* (TraesCS7D02G080300.1), odpowiednio na chromosomach 4D i 7D. Kolorem niebieskim wyróżniono gen *Lr67/Yr46*, a kolorem zielonym - gen *Lr34/Yr18*. Mapa genetyczna została skonstruowana przy użyciu narzędzia MG2C_v2.1 (Chao i in., 2021).

7.4. Analiza ekspresji genów *Lr34* i *Lr67* u odmian referencyjnych oraz komplementarnych miRNA (P2)

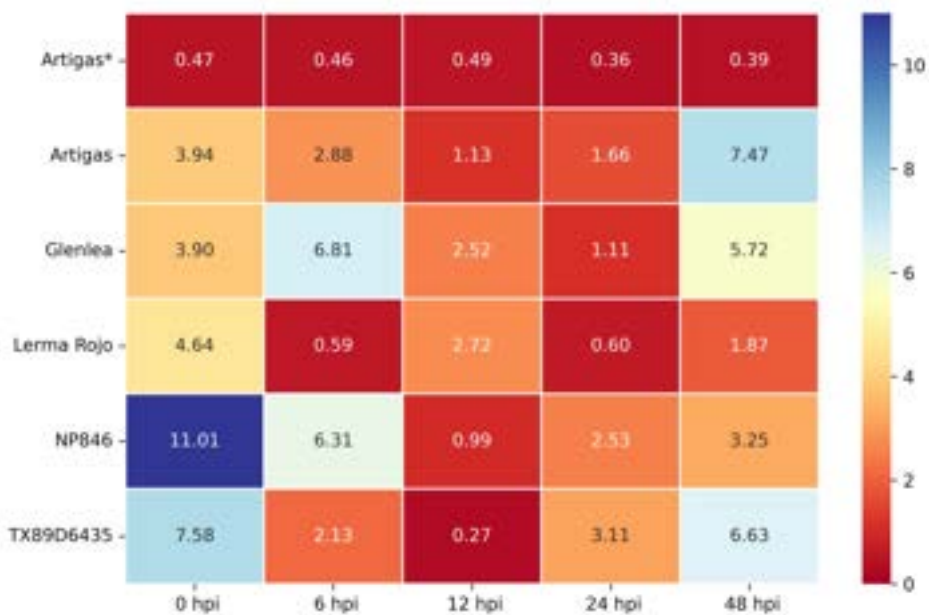
Odpowiedź genu *Lr34* na inokulację *P. triticina* analizowano u czterech odmian pszenicy zwyczajnej jarej (NP846, Glenlea, Artigas, Lerma Rojo) i jednej odmiany ozimej (TX89D6435) w pięciu punktach czasowych (0, 6, 12, 24 i 48 hpi) (Rycina 5). Wszystkie odmiany z wyjątkiem Glenlea wykazały spadek poziomu ekspresji *Lr34* natychmiast po inokulacji mieszaniną zarodników (6 hpi). Odmiana Glenlea również zareagowała w ten sam sposób, ale z niewielkim opóźnieniem (12 hpi). W tym samym czasie odmiany Artigas i NP486 zareagowały dalszym spadkiem ekspresji *Lr34*. Po 24 godzinach nastąpił wzrost ekspresji *Lr34* we wszystkich odmianach z wyjątkiem TX89D6435, osiągając w Glenlea i Lerma Rojo poziomy podobny do tych przed inokulacją. Badane odmiany znacząco różniły się ekspresją *Lr34* w 48 hpi: u Glenlea i Artigas osiągnęła ona maksymalne wartości, podczas gdy u pozostałych odmian osiągnęła minimum (TX89D6435 i NP846) lub była bardzo bliska

minimum (Lerma Rojo). Zaobserwowane różnice w profilach ekspresji nie wynikały z różnic w fenologii roślin (odmiana jare vs. odmiana ozima).

Lr34



Lr67



Rycina 5. Wykresy typu „heatmap” przedstawiające profile ekspresji genów *Lr34* i *Lr67*. Analiza ekspresji obejmowała referencyjne odmiany pszenicy zwyczajnej (Artigas*, Artigas, Glenlea, Lerma Rojo, NP846 i TX89D6435) w pięciu punktach czasowych (0, 6, 12, 24 i 48 hpi). Kolor czerwony oznacza niższą znormalizowaną ekspresję, a kolor niebieski - wyższą.

Należy zauważyć, że gen *Lr34* ulega ekspresji na stosunkowo niskim poziomie niezależnie od inokulacji, podczas gdy po inokulacji następuje szybki spadek ekspresji (6 i 12 hpi). W przypadku dwóch odmian spadek ten był przejściowy. W Glenlea, Lerma Rojo i NP846 spadek ekspresji był statystycznie istotny ($p = 0,013-0,048$) (P2). Brak istotności statystycznej wyników uzyskanych dla Artigas i TX89D6435 wynika z dużej wariancji między powtórzeniami biologicznymi.

W przypadku odmian Artigas, NP846 i TX89D6435 ekspresja genu *Lr67* zmniejszyła się natychmiast po inokulacji (6 i 12 hpi) i zaczęła wzrastać po 24 godzinach. W przypadku odmiany Lerma Rojo ekspresja genu *Lr67* zmniejszyła się po inokulacji, a następnie wahała się, podczas gdy w odmianie Glenlea ekspresja *Lr67* najpierw wzrosła (6 hpi), a następnie spadła, osiągając minimum w 24 hpi, po czym nastąpił kolejny wzrost w 48 hpi. Gen *Lr67* w odmianach Artigas i Glenlea wykazał podobną reakcję na stres jak gen *Lr34*, przewyższając w co najmniej jednym punkcie czasowym po inokulacji poziom obserwowany u roślin kontrolnych. W odmianie Artigas*, niosącej allel *Lr67* warunkujący podatność na porażenie *Pt*, zmiany poziomów ekspresji w stosunku do pierwszego terminu nie były statystycznie istotne. Sugerowałoby to, że regulowana jest tylko funkcjonalna kopia genu. Oba badane geny są transporterami i jako takie mogą mieć znaczący wpływ na fenotyp pod względem poziomu akumulacji i wydzielania związków, które transportują. Co ciekawe, geny *Lr34* i *Lr67* wykazały podobną odpowiedź na inokulację; korelacja między nimi wyniosła 0,675 i wartość ta jest istotna statystycznie ($p = 0,0003$).

7.5. Analiza ekspresji genów kandydujących dla *Lr46/Yr29* u odmian referencyjnych i komplementarnych miRNA (P3)

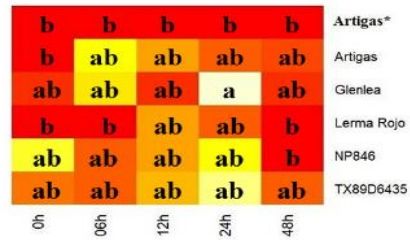
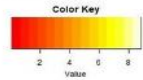
Analizy RT-qPCR genów kandydujących we wszystkich badanych odmianach pszenicy i w różnych punktach czasowych przedstawiono w postaci wykresów typu „heatmap” (Rycina 6). Surowe dane uzyskane z analiz ekspresji genów kandydujących dla *Lr46/Yr29* przedstawiono w tabelach i materiałach uzupełniających (P3). W przypadku *Lr46-Glu1* ekspresja różniła się znacznie między analizowanymi odmianami pszenicy, a także pomiędzy samymi punktami czasowymi, dlatego nie zaobserwowano wspólnego wzorca ekspresji dla tych odmian (Rycina 6). W przypadku genu kandydującego *Lr46-Glu2*, spadek poziomu ekspresji tego genu zaobserwowano natychmiast po inokulacji (6 hpi) dla wszystkich odmian z wyjątkiem odmiany Glenlea. W punkcie czasowym 12 hpi zaobserwowano dalszy spadek poziomu ekspresji *Lr46-Glu2* dla wszystkich odpornych odmian (Rycina 6). Poziom ekspresji

Lr46-Glu2 znacznie przekroczył poziom wyjściowy (0 hpi). W 48 hpi poziom ekspresji *Lr46-Glu2* spadł u wszystkich odmian, ale nadal przekraczał poziom wyjściowy u odmian Artigas, Glenlea, Lerma Rojo i TX89D6435. W przypadku genu *Lr46-Glu3* ekspresja zarówno przed, jak i po inokulacji była na bardzo niskim poziomie (Rycina 6). Jedyńm wyjątkiem była odmiana Glenlea w 24 hpi, u której zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji. U genów *Lr46-RLK1* i *Lr46-RLK2* zaobserwowano wzrost ekspresji w 6 hpi, krótko po inokulacji, następnie spadek i ponowny wzrost w 24 hpi. Najwyższe poziomy ekspresji w 6 hpi i 24 hpi w tym przypadku zaobserwowano w odmianie NP846, a wysoką ekspresję w 6 hpi w odmianie Glenlea (Rycina 6). W przypadku *Lr46-RLK3* najwyższy wzrost ekspresji po inokulacji zaobserwowano w 24 hpi w odmianach TX89D6435 i NP946; natomiast w odmianie Glenlea w 6 hpi i 24 hpi. Jednakże, ekspresja tego genu była na stosunkowo niskim poziomie (Rycina 6). Co istotne, podatna odmiana Artigas* konsekwentnie wykazywała niższe poziomy ekspresji w porównaniu do odmian odpornych dla różnych analizowanych genów, co wskazuje na jej odmienny profil ekspresji genów pod wpływem stresu *Pt* (Rycina 6).

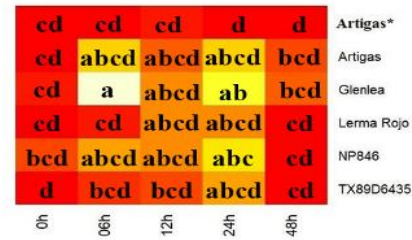
Przeprowadzono dwukierunkową analizę wariancji (ANOVA) i zidentyfikowano różnice w indywidualnych profilach ekspresji analizowanych genów dla odmian w określonych punktach czasowych (P3). Dodatkowym źródłem zmienności była interakcja odmiana × punkt czasowy. Z uwagi na fakt, że każdy gen charakteryzuje się innym bazowym poziomem ekspresji, analizę wariancji przeprowadzono dla każdego genu osobno. Odmiany wykazywały unikalne wzorce ekspresji genów w odpowiedzi na infekcję powodowaną przez *Pt*. Na przykład, odmiana Glenlea wykazywała szczególnie wysoki poziom ekspresji dla kilku genów w 24 hpi, podczas gdy odmiana Lerma Rojo wykazywała stosunkowo niski poziom ekspresji w większości analizowanych punktów czasowych (Rycina 6). Warto zauważyć, że *Lr46-Glu2* konsekwentnie wykazywał wysoki poziom ekspresji we wszystkich odmianach i punktach czasowych. Analiza genów kandydujących dla *Lr46/Yr29* ujawniła znaczący, istotny statystycznie wpływ zarówno odmiany, jak i czasu na ekspresję genów w pszenicy (P3).

W przypadku genu *Lr46-WRKY* zaobserwowano najwyższe wartości u Artigas* we wszystkich punktach czasowych z wyjątkiem 48 hpi oraz u odmiany Glenlea w 24 hpi (Rycina 6). Podczas prowadzenia analiz ekspresji genu *Lr46-STR* uzyskano wiele niespecyficznych produktów PCR, co było szczególnie widoczne na krzywej topnienia. W związku z powyższym, zdecydowano się odrzucić z *Lr46-STR* z dalszych analiz (P3).

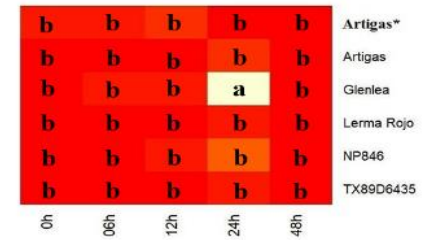
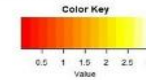
Lr46-Glu1



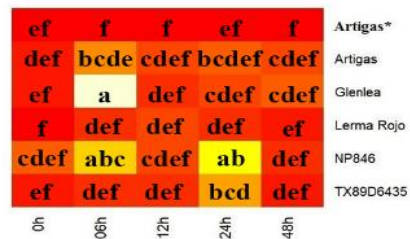
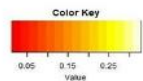
Lr46-Glu2



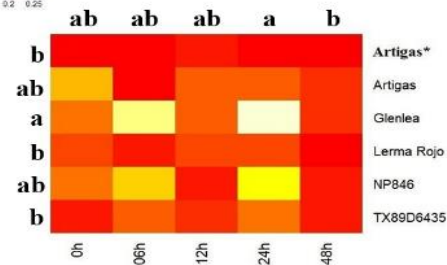
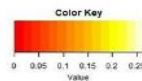
Lr46-Glu3



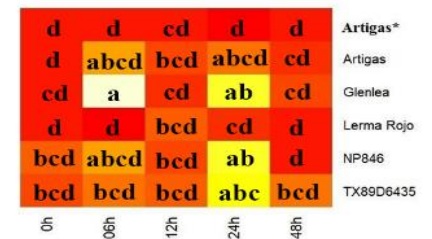
Lr46-RLK1



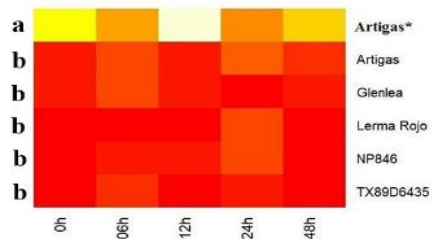
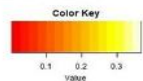
Lr46-RLK2



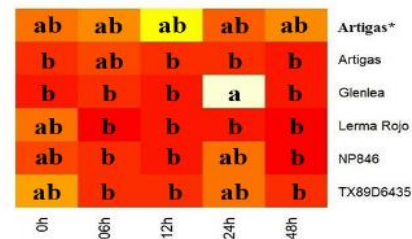
Lr46-RLK3



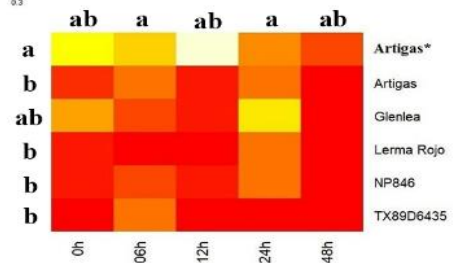
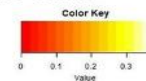
Lr46-RLK4



Lr46-Snex



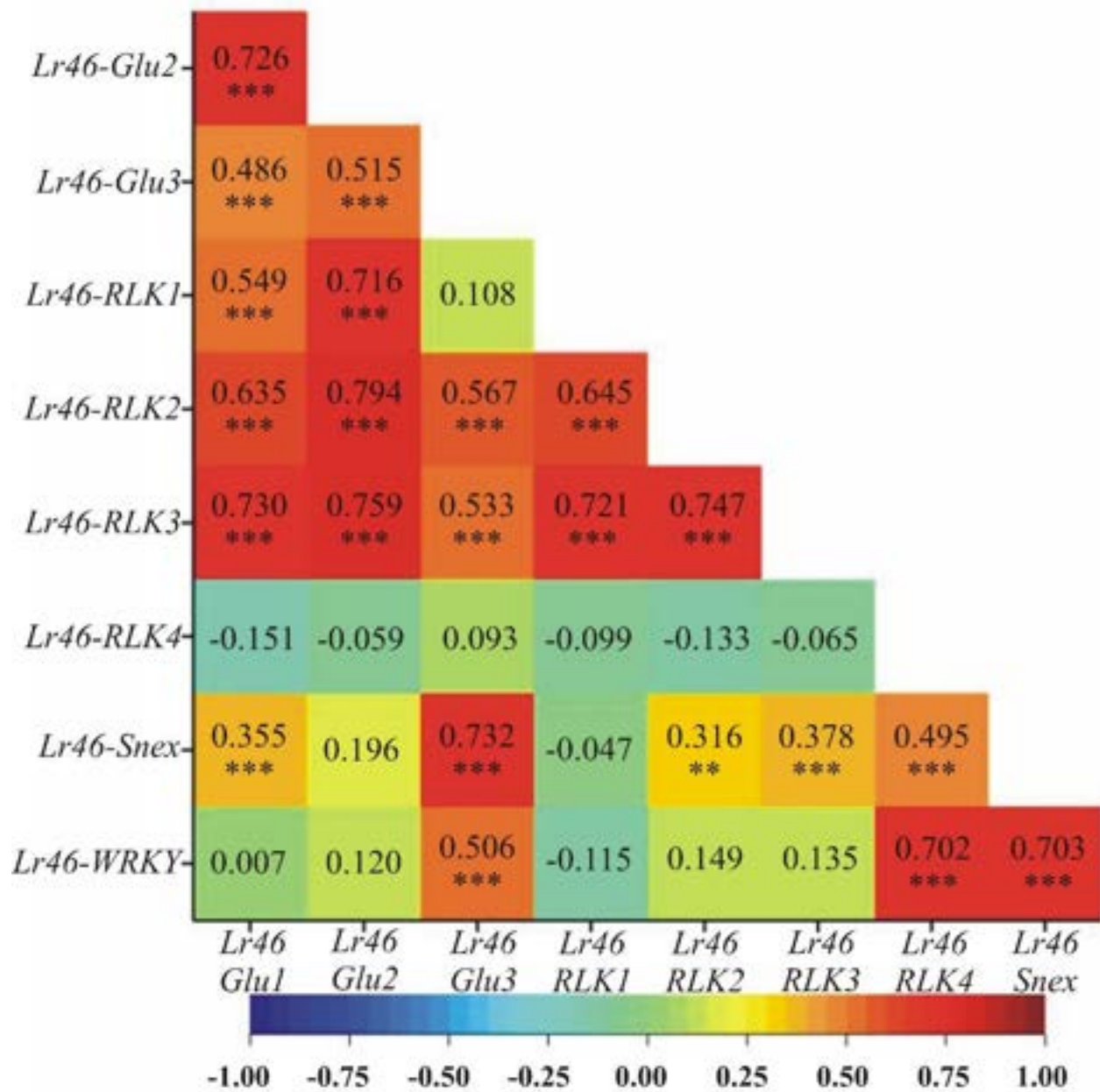
Lr46-WRKY



Rycina 6. Wykresy typu „heatmap” przedstawiające ekspresję dziewięciu genów kandydujących dla Lr46/Yr29 po inokulacji Pt (Spychała i in., 2024a).

W przypadku kilku analizowanych genów, w tym *Lr46-Glu1* i *Lr46-Glu2*, znaczące interakcje między odmianą a czasem podkreśliły dynamiczny charakter ekspresji genów w odpowiedzi na czynniki czasowe i zmienność genetyczną. Analiza post-hoc dodatkowo wyjaśniła te odkrycia i ujawniła różne wzorce ekspresji wśród odmian pszenicy w różnych punktach czasowych (Rycina 6). Odmiany scharakteryzowane jako odporne często wykazywały stosunkowo wyższe poziomy ekspresji w porównaniu z podatną odmianą kontrolną, podkreślając w ten sposób ich potencjalną rolę w pośredniczeniu w odpowiedzi obronnej pszenicy przeciwko *Pt*.

Porównanie profili ekspresji między genami kandydującymi przeprowadzono również za pomocą analizy korelacji (Rycina 7). Spośród badanych genów kandydujących najwyższą dodatnią korelację zaobserwowano dla profilu ekspresji pomiędzy genami kandydującymi: *Lr46-Glu2* i *Lr46-RLK2* (0,794; $p < 0,001$) (Rycina 7). Zaobserwowano również dodatnią korelację dla genu *Lr46-Glu1* pomiędzy genami: *Lr46-Glu2*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2* i *Lr46-RLK3*, gdzie występowały wysokie korelacje pomiędzy genem *Lr46-Glu1* a genami: *Lr46-Glu2* i *Lr46-RLK3* (odpowiednio 0,726 i 0,730; $p < 0,001$) (Rycina 7). Gen *Lr46-Glu2* wykazywał dodatnie korelacje ($p < 0,001$) z innymi testowanymi genami kandydującymi, z wyjątkiem genów: *Lr46-RLK4*, *Lr46-Snex* i *Lr46-WRKY*, gdzie korelacja była bliska 0 z $p > 0,05$ (Ryc. 3). Gen *Lr46-Glu3* wykazał dodatnie i statystycznie istotne korelacje z większością genów kandydujących z wyjątkiem *Lr46-RLK1* i *Lr46-RLK2* (odpowiednio 0,108 i 0,093, nieistotne statystycznie). Co ciekawe, dla genów: *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2* i *Lr46-RLK3*, zaobserwowaliśmy ogólną obecność korelacji z genami kandydującymi *Glu* lub *RLK*, ale ogólny brak korelacji z innymi genami kandydującymi (Rycina 7). Jednak wyraźną tendencję zaobserwowano dla genu *Lr46-WRKY*, gdzie zaobserwowano korelacje tylko z dwoma genami: *Lr46-Snex* i *Lr46-RLK4* (odpowiednio 0,703 i 0,702; $p < 0,001$). Co ciekawe, tendencja ta wystąpiła pomiędzy genami *Lr46-RLK4*, *Lr46-Snex* i *Lr46-WRKY* do korelowania ze sobą (Rycina 7). Wyjątkiem jest *Lr46-Snex*, gdzie istnieje wysoka korelacja również między genem *Lr46-Glu3* (0,735, $p < 0,001$) (Rycina 7).



Rycina 7. Wykresy typu „heatmap” prezentujące wartości współczynników korelacji liniowej Pearson’a pomiędzy badanymi genami kandydującymi dla *Lr46/Yr29*, w oparciu o wartości ich indywidualnych profili ekspresji; Poziomy istotności: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Spychała i in., 2024a).

7.6. Analiza ekspresji genów APR i komplementarnych miRNA u otrzymanych form mieszańcowych pokolenia F1 (P4)

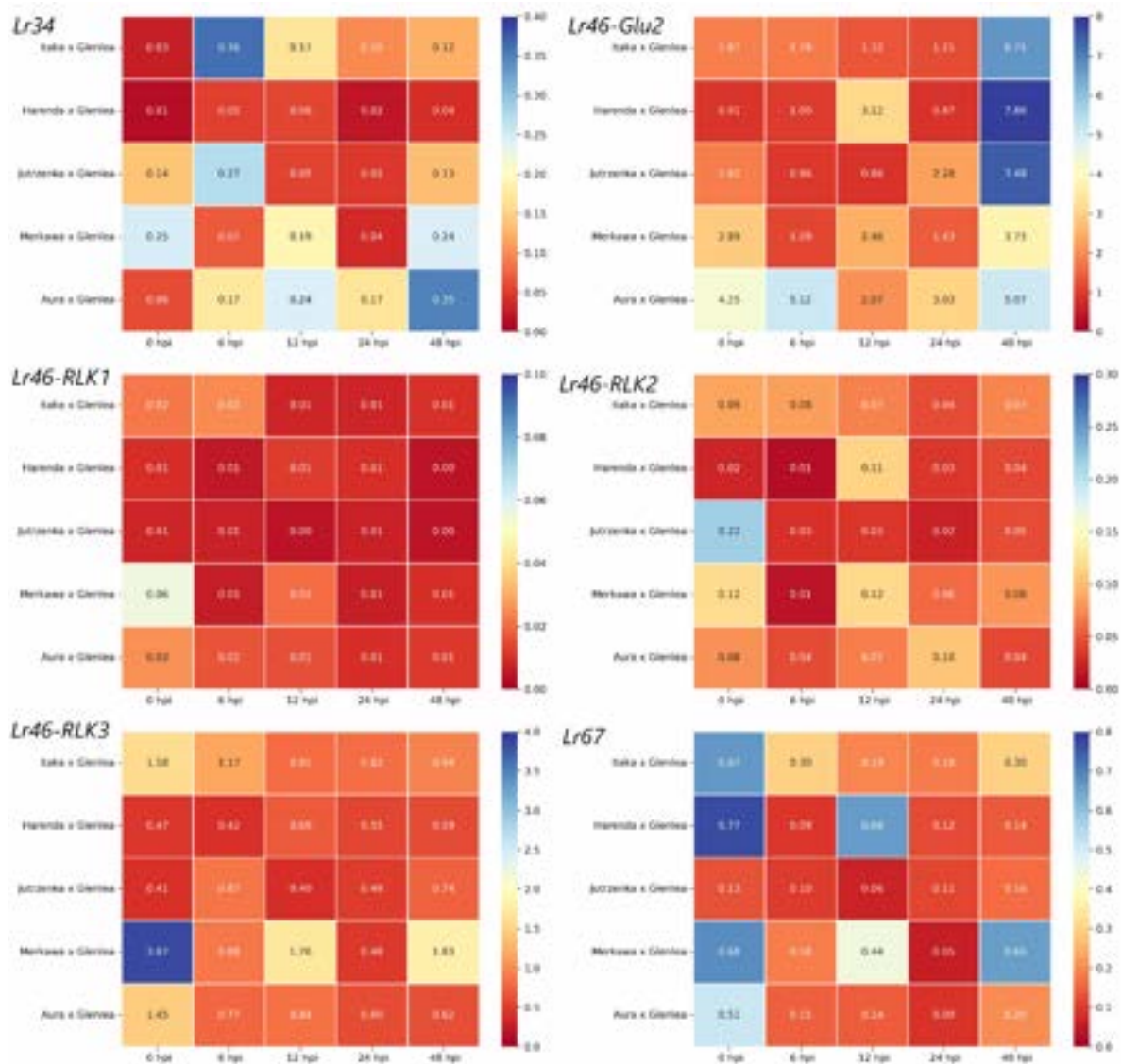
Podobnie jak w poprzedniej pracy (P2), geny odporności *Lr34* i *Lr67* wykazywały zróżnicowaną ekspresję w wybranych punktach czasowych. Gen *Lr34* wykazywał stosunkowo niską ekspresję po inokulacji roślin przez *Pt*. Jednak w porównaniu z wynikami opisanymi w poprzedniej pracy, podobieństwo w profilu ekspresji *Lr34* w formie donorowej Glenlea można zaobserwować w badanych formach mieszańcowych F1, gdzie najwyższą ekspresję obserwowano w 24 i 48 hpi (Rycina 8). Wyjątkiem była forma mieszańcowa Harenda × Glenlea, która wykazywała niską ekspresję genu *Lr34* we wszystkich punktach czasowych (Rycina 8). W formie mieszańcowej Aura × Glenlea, ekspresja *Lr34* wzrasta intensywnie natychmiast po inokulacji (6 hpi) i ponownie wzrasta w 24 hpi. W przypadku genu *Lr67*, jego ekspresja przed inokulacją jest na wyjątkowo wysokim poziomie (0 hpi). Wyjątek stanowi Jutrzenka × Glenlea, który wykazywał niską, stałą ekspresję genu *Lr67* we wszystkich punktach czasowych (Rycina 8). U dwóch form mieszańcowych (Harenda × Glenlea i Merkawa × Glenlea) poziom ekspresji tego genu nieznacznie spada po inokulacji (6 hpi) i ponownie wzrasta w 24 hpi tylko dla formy Merkawa × Glenlea. Niemniej jednak, ekspresja genu *Lr67* po inokulacji nie osiągnęła wyższych wartości niż przed inokulacją (0 hpi) (Rycina 8). Może to sugerować słabą odpowiedź odpornościową na inokulację *Pt*.

Na podstawie otrzymanych wyników w publikacji P3, do dalszych analiz ekspresji wyselekcjonowano cztery geny kandydujące: *Lr46-Glu2*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2* oraz *Lr46-RLK3*. Spośród genów kandydujących, najmniej zróżnicowany profil ekspresji zaobserwowano dla genu kandydującego *Lr46-Glu2*. U czterech form mieszańcowych pszenicy: Jutrzenka × Glenlea, Itaka × Glenlea, Harenda × Glenlea i Merkawa × Glenlea, można zaobserwować silny wzrost ekspresji *Lr46-Glu2* w 24 hpi, (Rycina 8). Poziom ekspresji *Lr46-Glu2* znacznie przekroczył poziom wyjściowy sprzed inokulacji. W porównaniu z genem kandydującym *Lr46-Glu2*, geny *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2* i *Lr46-RLK3* wykazują niską ekspresję w czasie, na podobnych poziomach we wszystkich badanych formach mieszańcowych (Rycina 8). W przypadku genu *Lr46-RLK2* poziomy ekspresji wahają się w czasie u wszystkich form badanych, ostatecznie osiągając niższe wartości niż przed inokulacją (Rycina 8). Co ciekawe, geny te wykazywały bardzo wysoką ekspresję początkową (0 hpi) u Merkawa × Glenlea (*Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK3*) i Jutrzenka × Glenlea (*Lr46-RLK1*).

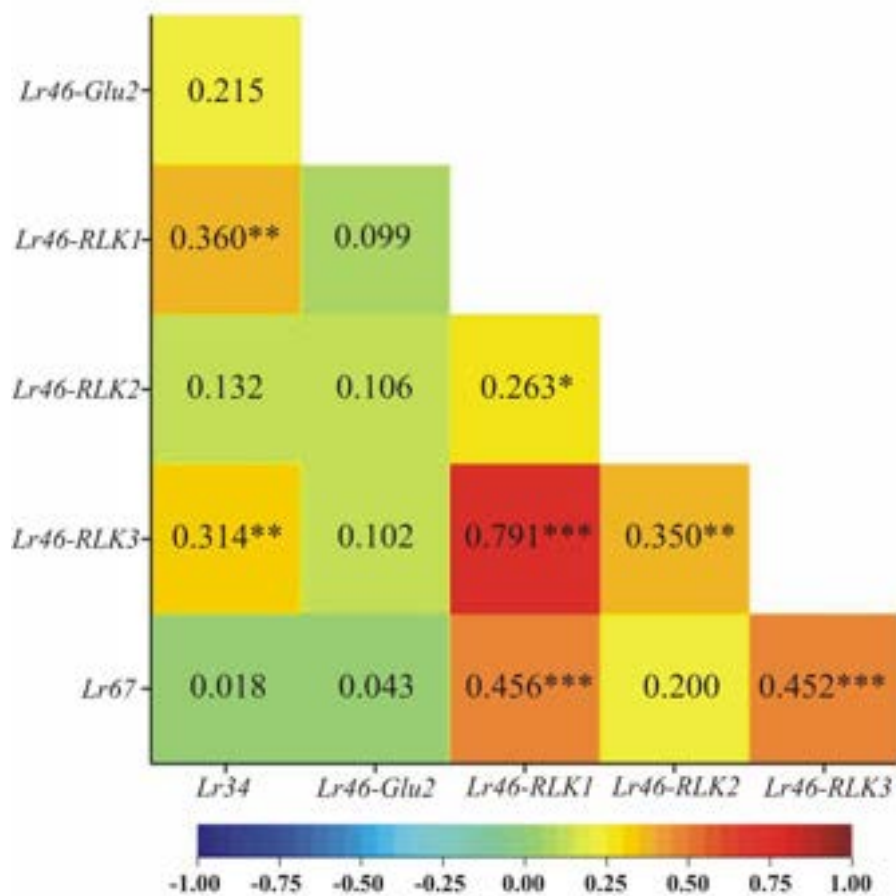
Analiza wariancji wykazała, że główne zależności między formą mieszańcową i punktem czasowym, a także interakcja pomiędzy formą mieszańcową i punktem czasowym

były istotne dla profilu ekspresji wszystkich genów badanych (P4). Z uwagi na fakt, że każdy gen charakteryzuje się innym bazowym poziomem ekspresji, analizę wariancji przeprowadzono dla każdego genu osobno. Podjęto również próbę porównania profili ekspresji między genami za pomocą korelacji liniowej Pearsona (Rycina 9). W wyniku analizy korelacji można było zaobserwować, że pomiędzy *Lr46-RLK1* i *Lr46-RLK3* występuje najwyższa korelacja dodatnia (0,791, $p < 0,001$). W przeciwieństwie do powyższego, nie ma prawie żadnej korelacji między *Lr34* i *Lr67* (0,018) (Rycina 9). Dwukierunkowa analiza wariancji (ANOVA) wskazuje, że główny wpływ form mieszańcowych był istotny dla *Lr34*, *Lr46-Glu2*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK3* i *Lr67*. Główny wpływ punktów czasowych był istotny dla ekspresji wszystkich genów z wyjątkiem *Lr34*. Główny efekt interakcji forma mieszańcowa \times punkt czasowy był istotny statystycznie dla ekspresji trzech genów: *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2* i *Lr46-RLK3* (P4).

Zgodnie z bazą danych, tae-miR9780 jest komplementarny do dwóch genów kandydujących, *Lr46-Glu2* (TraesCS1B02G454200.1) i *Lr46-RLK2* (TraesCS1B02G454100.1). W stosunku do genu *Lr46-Glu2*, tae-miR9775 jest również komplementarny. Niestety, ekspresja tae-miR9775 była na bardzo niskim poziomie i nie pozwoliła na wiarygodną interpretację. Ekspresja tae-miR9780 w większości badanych form mieszańcowych pszenicy była na stałym poziomie, zarówno przed, jak i po inokulacji. Analizując komplementarną do tego genu cząsteczkę tae-miR5384-3p, stwierdzono, że jego poziom ekspresji po inokulacji u czterech form wahał się, ostatecznie przyjmując wartości niższe lub równe wartościom początkowym przed inokulacją. Spośród wszystkich analizowanych mieszańców tylko Aura \times Glenlea wykazała znaczący wzrost ekspresji tae-miR5384-3p w 48 hpi, w porównaniu do poziomu sprzed inokulacji. W przypadku pozostałych form pszenicy odnotowano niższą liczbę kopii tego miRNA w 48 hpi niż przed inokulacją *Pt* (P4). W każdej formie hybrydowej (z wyjątkiem Harenda \times Glenlea) zaobserwowano najwyższą ekspresję tae-miR9780 w 48 hpi. Natomiast tae-miR164, który jest komplementarny do genu kandydującego *Lr46-RLK3* (TraesCS1B02G454400.1) wykazywał zróżnicowaną ekspresję przed i po inokulacji. W przypadku dwóch form mieszańcowych: Jutrzenka \times Glenlea i Aura \times Glenlea, zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji tae-miR164, w stosunku do wartości przed inokulacją. W przypadku pozostałych form ekspresja tae-miR164 wahała się, ostatecznie osiągając niższą wartość niż przed inokulacją (P4). W przypadku tego genu kandydującego nie stwierdzono również istotnych korelacji między jego ekspresją a ekspresją tae-miR164 (P4).



Rycina 8. Wykresy typu „heatmap” przedstawiające ekspresję genów *Lr34*, *Lr67* i czterech wyselekcjonowanych genów kandydujących dla *Lr46/Yr29* w tkankach liści pod wpływem infekcji *Pt*. Analiza ekspresji obejmowała formy mieszańcowe pokolenia F1 (Harenda × Glenlea, Jutrzenka × Glenlea, Aura × Glenlea, Itaka × Glenlea, Merkawa × Glenlea) w pięciu punktach czasowych (0, 6, 12, 24 i 48 hpi). Kolor czerwony oznacza niższą znormalizowaną ekspresję, a niebieski oznacza wyższą znormalizowaną ekspresję.



Rycina 9. Wykres typu „heatmap” prezentujący wartości współczynników korelacji liniowej Pearsona między obserwowanymi genami *Lr34*, *Lr67* i wybranymi genami kandydującymi dla *Lr46/Yr29* na podstawie wartości ich indywidualnych profili ekspresji. Poziomy istotności: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Spychała i in., 2024b).

7.7. Analiza ekspresji genów u form mieszańcowych pszenicy pokoleń BC1F1 i F2

Wyniki ekspresji czterech genów kandydujących dla *Lr46*, prezentowanych w Publikacji 4, pozwoliły na wyselekcjonowanie *Lr46-Glu2* jako genu o najwyższej ekspresji po inokulacji *Pt*. Dlatego też, analiza ekspresji genów u form mieszańcowych pszenicy pokoleń BC1F1 i F2 obejmowała trzy geny badane: *Lr34*, *Lr46-Glu2* i *Lr67* (Rycina 10). W przypadku genu *Lr34*, podobnie jak w poprzednich latach, charakteryzował się niską ekspresją we wszystkich punktach czasowych. Jednakże, można zaobserwować wzrost ekspresji u większości badanych form mieszańcowych, oprócz: (Harenda × Glenlea) × Harenda, (Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka, które wykazały niską ekspresję we wszystkich punktach czasowych. Co ciekawe, u (Aura × Glenlea) × Aura można zaobserwować początkowy wysoki poziom ekspresji w punkcie 0 hpi. Następnie poziom ekspresji waha się, jednak nie osiągając poziomu wyższego niż przed inokulacją patogenem (Rycina 10). Co ciekawe, gen u obu form pokolenia F2, czyli Merkawa × Glenlea oraz Itaka × Glenlea, zareagował bardzo podobnie, osiągając zbliżone wartości ekspresji (Rycina 10).

Wyniki uzyskane w Publikacjach 3 i 4, zdecydowały o wyborze genu kandydującego *Lr46-Glu2* do dalszych badań, obejmujących pokolenia F2 i BCF1. Gen kandydujący *Lr46-Glu2* wykazał najwyższą ekspresję u dwóch form pokolenia F2, czyli Merkawa × Glenlea oraz Itaka × Glenlea, osiągając najwyższe wartości w 6 hpi (Rycina 10). W kolejnych punktach czasowych nastąpił spadek ekspresji, ale w przypadku formy mieszańcowej Itaka × Glenlea zaobserwowano ponowny wzrost poziomu ekspresji *Lr46-Glu2* w 48 hpi (Rycina 10). Podobny wzorzec ekspresji tego genu kandydującego zaobserwowano w poprzednich latach doświadczeń: u odmiany Glenlea (Rycina 6) oraz u form mieszańcowych pokolenia F1 (Rycina 8). Natomiast u dwóch form mieszańcowych BC1F1: (Harenda × Glenlea) × Harenda oraz (Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka, profile ekspresji genu były bardzo zbliżone - największy wzrost poziomu ekspresji *Lr46-Glu2* nastąpił w 12 hpi (Rycina 10).

Analiza ekspresji *Lr67* wykazała, że reakcja na inokulację była bardzo zróżnicowana pomiędzy badanymi formami mieszańcowymi (Rycina 10). Najbardziej dynamiczny wzorzec ekspresji zaobserwowano tylko u (Harenda × Glenlea) × Harenda, z przejściowym spadkiem ekspresji w 12 hpi. Ciekawy profil ekspresji tego genu można zaobserwować także u drugiej formy mieszańcowej z pokolenia BC1F1, czyli (Aura ×

Glenlea) × Aura, gdzie obserwujemy wysoki poziom ekspresji jeszcze przed inokulacją (0 hpi). Następnie można zaobserwować spadek ekspresji do 12 godzin po inokulacji i dynamiczny wzrost ekspresji w 24 hpi (Rycina 10). Bardzo podobne wzorce ekspresji można zaobserwować u form mieszańcowych F1 (Rycina 8), z wyjątkiem Jutrzenka × Glenlea.

Przeprowadzono również analizę statystyczną genów badanych, czyli *Lr34*, *Lr46-Glu2* oraz *Lr67*. Test Kołmogorowa-Smirnowa został wykorzystany do przetestowania hipotezy zerowej, zgodnie z którą zestaw znormalizowanych danych ekspresji dla określonego genu i linii pochodzi z rozkładu normalnego. Test ten został zaliczony dla wszystkich kombinacji form mieszańcowych i genów z wyjątkiem *Lr46-Glu2* u formy mieszańcowej Itaka × Glenlea (wartość $p = 0,02397$) (Tabela 11, Tabela 12, Tabela 13). Do oceny równości wariancji zastosowano test Levene'a w wariancie Browna-Forsythe'a. Wynik tego testu okazał się pozytywny dla wszystkich badanych kombinacji form mieszańcowych i punktów czasowych. W celu porównania średnich wykonano dwustronny test t-Studenta (Tabela 11, Tabela 12, Tabela 13).

Celem sprawdzenia i oceny stabilności genów referencyjnych *ARF* oraz *TUBβ* przeprowadzono następujące porównanie, obejmujące wartość progową cyklu przeprowadzonej reakcji RT-qPCR (cT) w każdym punkcie czasowym po inokulacji vs. wartość cT przed inokulacją. Test ten wykazał znaczny wzrost wartości referencyjnych cT w niektórych porównaniach, głównie na początku przeprowadzonego eksperymentu lub w środkowych punktach czasowych, co mogło ostatecznie skutkować wzrostem obliczonej znormalizowanej ekspresji badanych genów (Tabela 14).

Tabela 11. Analiza statystyczna genu *Lr34* dla pokoleń BC1 i F2

Forma mieszańcowa	Czas	T/0h <i>Lr34</i>	Test Kolmogorowa- Smirnowa (<i>Lr34</i>)	Test Levene'a (<i>Lr34</i>)	Test t- Studenta (<i>Lr34</i>)
(Harenda × Glenlea) × Harenda	00h		0,55686		
(Harenda × Glenlea) × Harenda	06h	1,48		0,3771	0,191489
(Harenda × Glenlea) × Harenda	12h	0,44		0,7633	0,015302
(Harenda × Glenlea) × Harenda	24h	1,17		0,2748	0,802742
(Harenda × Glenlea) × Harenda	48h	1,87		0,2334	0,214812
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	00h		0,34987		
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	06h	1,88		0,4265	0,611788
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	12h	1,00		0,4896	0,974766
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	24h	0,47		0,8512	0,184849
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	48h	1,55		0,2837	0,425004
(Aura × Glenlea) × Aura	00h		0,21132		
(Aura × Glenlea) × Aura	06h	0,50		0,8599	0,439384
(Aura × Glenlea) × Aura	12h	0,05		0,2739	0,101968
(Aura × Glenlea) × Aura	24h	0,48		0,5059	0,347336
(Aura × Glenlea) × Aura	48h	0,38		0,5083	0,268199
Itaka × Glenlea	00h		0,55071		
Itaka × Glenlea	06h	2,07		0,4979	0,3082
Itaka × Glenlea	12h	1,13		0,7392	0,875531
Itaka × Glenlea	24h	3,40		0,5382	0,173593
Itaka × Glenlea	48h	2,96		0,3546	0,189872
Merkawa × Glenlea	00h		0,46751		
Merkawa × Glenlea	06h	1,88		0,3998	0,416864
Merkawa × Glenlea	12h	1,28		0,7706	0,689807
Merkawa × Glenlea	24h	2,18		0,3758	0,458674
Merkawa × Glenlea	48h	2,39		0,601	0,289354

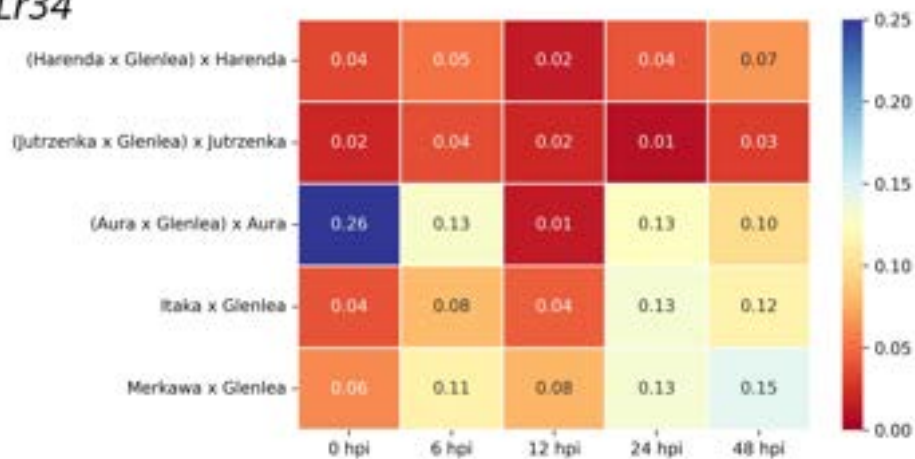
Tabela 12. Analiza statystyczna genu *Lr46-Glu2* dla pokoleń BC1 i F2

Forma mieszańcowa	Czas	T/0h <i>Lr46-Glu2</i>	Test Kolmogorowa- Smirnowa (<i>Lr46-Glu2</i>)	Test Levene'a (<i>Lr46-Glu2</i>)	Test t- Studenta (<i>Lr46-Glu2</i>)
(Harenda × Glenlea) × Harenda	00h		0,93508		
(Harenda × Glenlea) × Harenda	06h	1,63		0.8474	0,297761
(Harenda × Glenlea) × Harenda	12h	1,36		0.9288	0,458419
(Harenda × Glenlea) × Harenda	24h	0,80		0.5644	0,61417
(Harenda × Glenlea) × Harenda	48h	0,64		0.803	0,432481
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	00h		0,21316		
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	06h	1,13		0.586	0,902172
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	12h	2,65		0.7879	0,320085
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	24h	0,30		0.4264	0,503999
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	48h	0,64		0.5387	0,732779
(Aura × Glenlea) × Aura	00h		0,50442		
(Aura × Glenlea) × Aura	06h	0,69		0.3215	0,715965
(Aura × Glenlea) × Aura	12h	0,20		0.3304	0,369011
(Aura × Glenlea) × Aura	24h	0,49		0.5321	0,578119
(Aura × Glenlea) × Aura	48h	0,52		0.4694	0,590078
Itaka × Glenlea	00h		0,02397		
Itaka × Glenlea	06h	6,60		0.1697	0,037973
Itaka × Glenlea	12h	1,25		0.9937	0,561017
Itaka × Glenlea	24h	1,28		0.8027	0,471528
Itaka × Glenlea	48h	4,31		0.4152	0,322773
Merkawa × Glenlea	00h		0,13609		
Merkawa × Glenlea	06h	2,80		0.9563	0,207233
Merkawa × Glenlea	12h	0,56		0.4129	0,630403
Merkawa × Glenlea	24h	0,41		0.5188	0,534022
Merkawa × Glenlea	48h	0,57		0.5434	0,65097

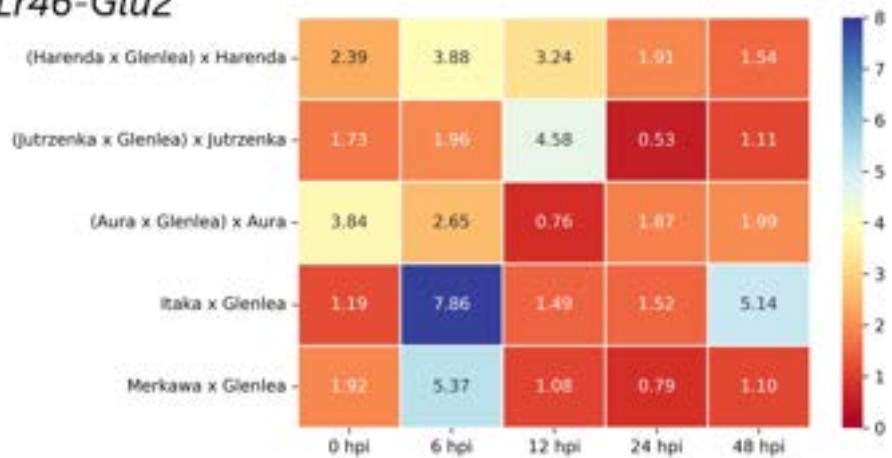
Tabela 13. Analiza statystyczna genu *Lr67* dla pokoleń BC1 i F2

Forma mieszańcowa	Czas	T/0h <i>Lr67</i>	Test Kolmogorowa- Smirnowa (<i>Lr67</i>)	Test Levene'a (<i>Lr67</i>)	Test t- Studenta (<i>Lr67</i>)
(Harenda × Glenlea) × Harenda	00h		0,81493		
(Harenda × Glenlea) × Harenda	06h	1,50		0.3403	0,403446
(Harenda × Glenlea) × Harenda	12h	0,35		0.8376	0,010626
(Harenda × Glenlea) × Harenda	24h	1,99		0.3032	0,063052
(Harenda × Glenlea) × Harenda	48h	2,20		0.62	0,006616
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	00h		0,64007		
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	06h	1,24		0.7158	0,75961
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	12h	0,73		0.9928	0,690573
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	24h	0,60		0.5537	0,462844
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	48h	0,86		0.9565	0,832584
(Aura × Glenlea) × Aura	00h		0,40764		
(Aura × Glenlea) × Aura	06h	0,48		0.7212	0,32484
(Aura × Glenlea) × Aura	12h	0,05		0.185	0,063295
(Aura × Glenlea) × Aura	24h	0,90		0.5274	0,826662
(Aura × Glenlea) × Aura	48h	0,34		0.3603	0,173121
Itaka × Glenlea	00h		0,52279		
Itaka × Glenlea	06h	1,02		0.4934	0,968964
Itaka × Glenlea	12h	0,08		0.1742	0,140844
Itaka × Glenlea	24h	0,74		0.6585	0,686948
Itaka × Glenlea	48h	0,99		0.99	0,987796
Merkawa × Glenlea	00h		0,2408		
Merkawa × Glenlea	06h	1,21		0.9603	0,823572
Merkawa × Glenlea	12h	0,44		0.3915	0,442485
Merkawa × Glenlea	24h	0,35		0.5096	0,397643
Merkawa × Glenlea	48h	0,31		0.4033	0,357508

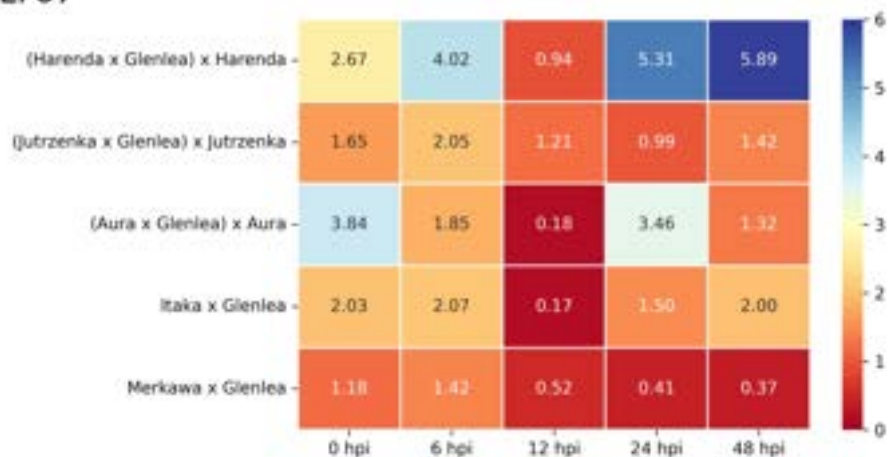
Lr34



Lr46-Glu2



Lr67



Rycina 10. Wykresy typu „heatmap” przedstawiające ekspresję genów *Lr34*, *Lr67* i wyselekcjonowanego genu kandydującego *Lr46-Glu2* w tkankach liści pod wpływem infekcji *Pt*. Analiza ekspresji obejmowała formy mieszańcowe pokoleń BC1F1 i F2, w pięciu punktach czasowych (0, 6, 12, 24 i 48 hpi). Kolor czerwony oznacza niższą znormalizowaną ekspresję, a niebieski oznacza wyższą znormalizowaną ekspresję.

Tabela 14. Analiza statystyczna genów referencyjnych dla pokoleń BC1 i F2

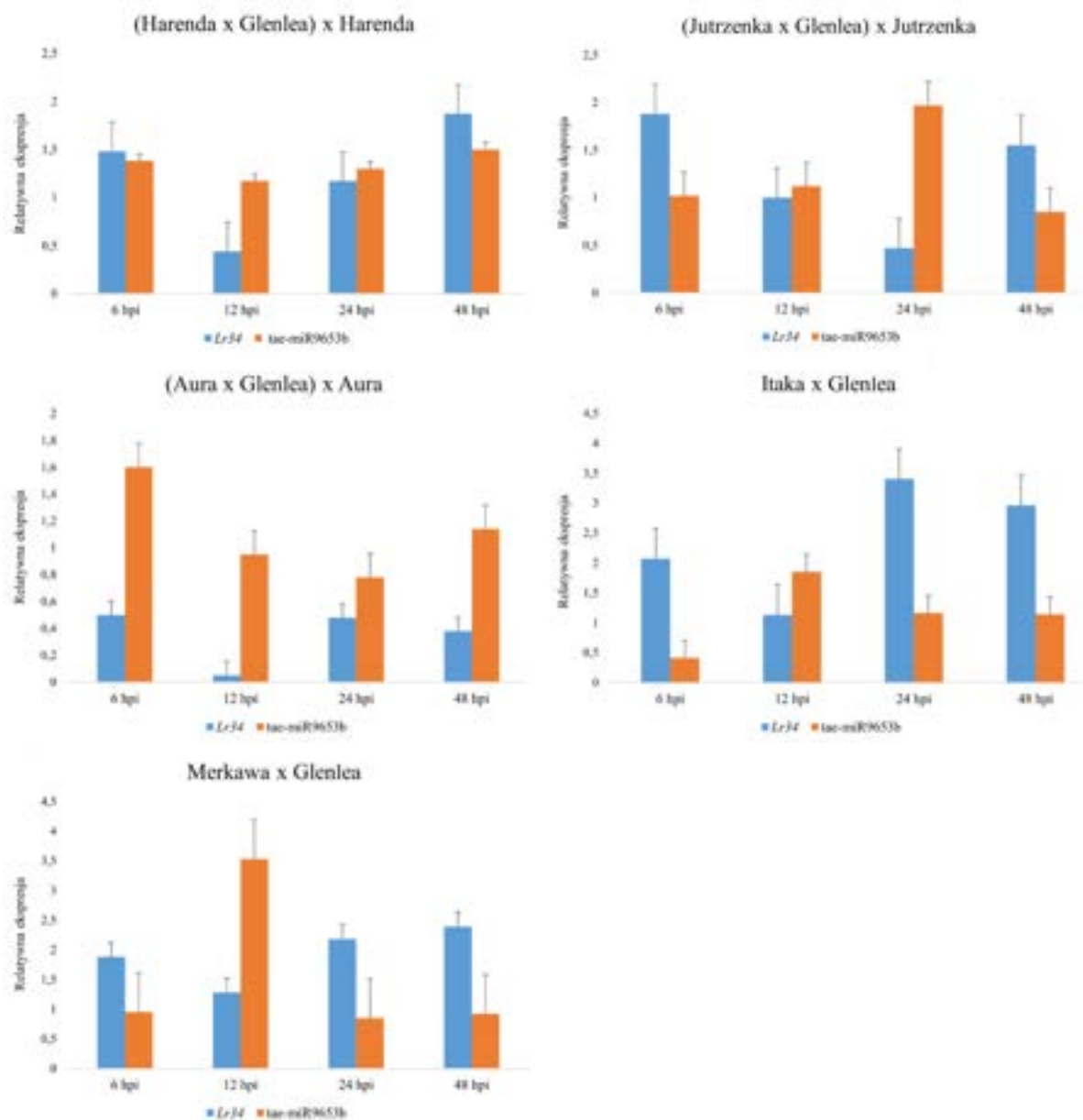
Forma mieszańcowa	Czas	Cq_T-Cq-00h <i>ARF</i>	Cq_T/Cq_0 0h <i>ARF</i>	Test Kolmogorowa- Smirnowa (<i>ARF</i>)	Test Levene'a (<i>ARF</i>)	Test t- Studenta (<i>ARF</i>)	Cq_T- Cq-00h <i>TUBβ</i>	Cq_T/Cq_0 00h <i>TUBβ</i>	Test Kolmogorowa- Smirnowa (<i>TUBβ</i>)	Test Levene'a (<i>TUBβ</i>)	Test t- Studenta (<i>TUBβ</i>)	Test t- Studenta (<i>ARF</i> i <i>TUBβ</i>)
(Harenda × Glenlea) × Harenda	00h			0,82206					0,92933			
(Harenda × Glenlea) × Harenda	06h	2,437	1,10017816		0.2835	0,004629	0,043	1,00160059		0.4271	0,984892	0,245834
(Harenda × Glenlea) × Harenda	12h	1,397	1,05742086		0.9424	0,079174	-0,713	0,97365181		0.2794	0,15059	0,492119
(Harenda × Glenlea) × Harenda	24h	3,283	1,13498698		0.3808	0,036138	1,653	1,0610687		0.6103	0,111766	0,055094
(Harenda × Glenlea) × Harenda	48h	1,527	1,06276552		0.439	0,463383	-0,330	0,98781088		0.4582	0,801447	0,725251
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	00h			0,88381					0,80447			
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	06h	3,093	1,12977206		0.8944	0,004665	3,063	1,11453141		0.7962	0,033458	0,013233
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	12h	2,817	1,11816529		0.9386	0,004095	0,303	1,01134098		0.4006	0,734829	0,044479
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	24h	0,910	1,03817648		0.4934	0,301147	-0,263	0,99015454		0.4285	0,794314	0,621757
(Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka	48h	3,987	1,16724934		0.7847	0,003213	2,633	1,09845464		0.5219	0,037289	0,0089

(Aura × Glenlea) × Aura	00h			0,76827				0,86028			
(Aura × Glenlea) × Aura	06h	1,903	1,07770822		0.6594	0,248269	0,483	1,01813634	0.3482	0,827636	0,524573
(Aura × Glenlea) × Aura	12h	2,017	1,08233533		0.4469	0,065814	0,590	1,02213884	0.9142	0,17851	0,086923
(Aura × Glenlea) × Aura	24h	3,437	1,14031029		0.4888	0,014027	1,873	1,07029393	0.5454	0,035244	0,017643
(Aura × Glenlea) × Aura	48h	3,847	1,15704954		0.4528	0,008856	1,703	1,06391495	0.7747	0,018233	0,010215
Itaka × Glenlea	00h			0,38573				0,7523			
Itaka × Glenlea	06h	1,673	1,06716618		0.504	0,191111	-0,220	0,99178594	0.7971	0,73636	0,44449
Itaka × Glenlea	12h	3,287	1,131924		0.464	0,003295	2,360	1,0881145	0.1649	0,003569	0,003155
Itaka × Glenlea	24h	4,650	1,18664704		0.5443	0,001005	3,213	1,11997511	0.6297	0,002147	0,001386
Itaka × Glenlea	48h	3,027	1,12148782		0.872	0,00975	-0,080	0,99701307	0.469	0,9485	0,132135
Merkawa × Glenlea	00h			0,9393				0,60001			
Merkawa × Glenlea	06h	1,517	1,06293223		0.2707	0,31308	0,167	1,00626174	0.8626	0,874271	0,512911
Merkawa × Glenlea	12h	4,077	1,16915629		0.8964	0,002154	1,847	1,06938009	0.9006	0,112308	0,016934
Merkawa × Glenlea	24h	2,883	1,11964039		0.569	0,025918	0,483	1,01815905	0.8898	0,59208	0,049843
Merkawa × Glenlea	48h	3,030	1,12572614		0.5345	0,015328	1,007	1,03782091	0.6166	0,269548	0,052514

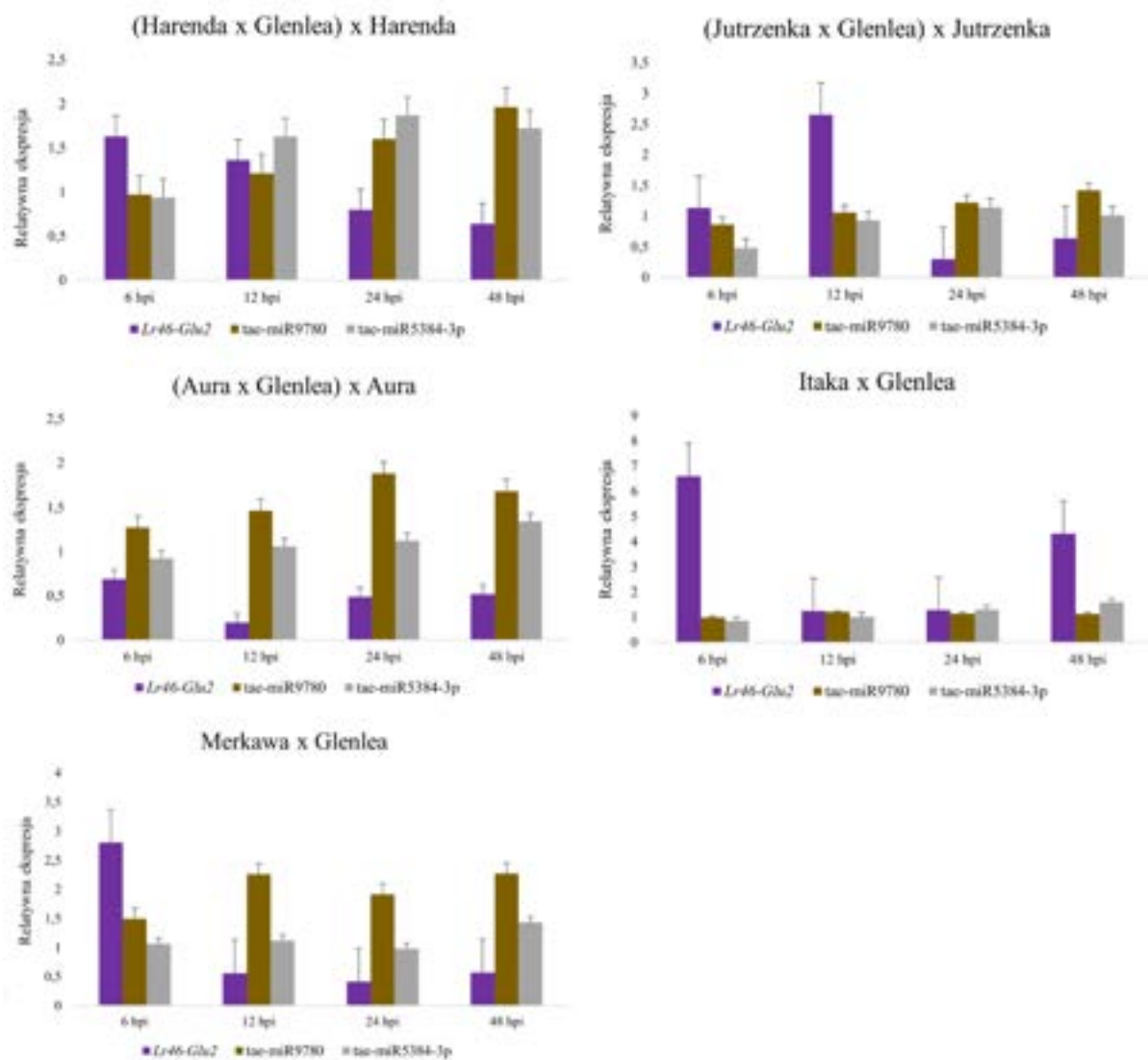
7.8. Analiza ekspresji miRNA form mieszańcowych pszenicy pokoleń BC1F1 i F2

Wykorzystanie metody stem-loop RT-PCR oraz analizy ekspresji metodą ddPCR przeprowadzono analizę ekspresji cząsteczek miRNA wybranych z baz danych jako komplementarnych do *Lr34* i genu kandydującego *Lr46-Glu2* (Rycina 11, Rycina 12). Porównano otrzymane wyniki ekspresji wybranych genów z odpowiednimi wartościami dla komplementarnych do nich cząsteczek miRNA. Analiza ekspresji miRNA przy użyciu ddPCR potwierdziła potencjalną rolę tae-miR9653b hamowania ekspresji genu docelowego, w tym przypadku *Lr34*. Ostatecznie, pomiędzy 24 a 48 hpi, gdy obserwuje się wzrost ekspresji genu *Lr34*, poziom tae-miR9653b spada. Taką tendencję zaobserwowano u form mieszańcowych pokolenia F2: Itaka × Glenlea oraz Merkawa × Glenlea. Co ciekawe, gen *Lr34* zidentyfikowany u Merkawa × Glenlea występował w formie homozygotycznej (Tabela 9). Najwyższą ekspresję cząsteczek tae-miR9653b zaobserwowano u form mieszańcowych pokolenia BCF1: (Aura × Glenlea) × Aura, Merkawa × Glenlea, (Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka w 6, 24 i 48 hpi – odpowiednio (Rycina 11).

Zgodnie z bazą danych tae-miR9780 jest komplementarny do dwóch genów kandydujących, *Lr46-Glu2* (TraesCS1B02G454200.1) i *Lr46-RLK2* (TraesCS1B02G454100.1). W genie *Lr46-Glu2* analizowaliśmy ekspresję dwóch miRNA: tae-miR9780 i tae-miR5384-3p. Ekspresja tae-miR9780 u większości badanych mieszańców pszenicy była na stałym poziomie, zarówno przed, jak i po inokulacji. Analizując komplementarny do tego genu gen tae-miR5384-3p, stwierdzono, że jego poziom ekspresji po inokulacji u czterech form mieszańcowych wahał się, ostatecznie przyjmując wartości niższe lub równe wartościom początkowym przed inokulacją. W związku z tym może to sugerować, że tae-miR5384-3p nie represjonował specyficznie genu *Lr46-Glu2*, ponieważ ekspresja genu wzrosła po inokulacji. Najwyższą ekspresję cząsteczek tae-miR5338-3p zaobserwowano również u form mieszańcowych pokolenia BCF1: (Harenda × Glenlea) × Harenda, (Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka oraz (Aura × Glenlea) × Aura, w 24 hpi i 48 hpi (Rycina 12).



Rycina 11. Analiza ekspresji komplementarnego *tae-miR9653b* w porównaniu do wzorców ekspresji genu *Lr34* podczas infekcji wywołanej *Pt*. Liczby 6, 12, 24 i 48 oznaczają godziny po inokulacji (hpi). Wykresy pokazują względne wartości ekspresji w porównaniu do punktu czasowego 0 hpi. Przedstawione dane dotyczące ekspresji uzyskano ze średniej z trzech powtórzeń biologicznych.



Rycina 12. Analiza ekspresji komplementarnych *tae-miR9780* i *tae-miR5384-3p* w porównaniu do wzorców ekspresji genu *Lr46-Glu2* podczas infekcji wywołanej *Pt*. Liczby 6, 12, 24 i 48 oznaczają godziny po inokulacji (hpi). Wykresy pokazują względne wartości ekspresji w porównaniu do punktu czasowego 0 hpi. Przedstawione dane dotyczące ekspresji uzyskano ze średniej z trzech powtórzeń biologicznych.

8. Dyskusja

Z przeglądu literatury, opisującego postęp naukowy w badaniach mechanizmów odpornościowych pszenicy w odpowiedzi na porażenie rdzą brunatną, wynika, iż dalsze poszukiwania zróżnicowanej i trwałej odporności powinny wykorzystywać zaawansowane narzędzia i techniki genomowe (Prasad i in., 2020). Dokładne rozumienie molekularnych podstaw odpowiedzi obronnej roślin pozwoli na opracowanie nowych strategii hodowli odpornościowej. W niniejszej pracy doktorskiej, dobrze opisane w literaturze geny jak *Lr34* i *Lr67*, wykazywały różnice w profilach ekspresji między odmianami. Genetyczna regulacja ekspresji jest jednym z czynników determinujących podatność lub odporność rośliny. Niemniej jednak należy zauważyć, że białka takie jak transportery ABC, mogą być regulowane przez wiele szlaków sygnałowych i reagować w różny sposób na różne patogeny (Campbell i in., 2003). Wpływ kombinacji genów odporności, obecność niezidentyfikowanych genów i różne poziomy ich ekspresji, w połączeniu z innymi czynnikami biotycznymi i abiotycznymi, mogą powodować różne reakcje odmian na porażenie *P. triticina*.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej analizowano ekspresję genów odporności na rdzę brunatną typu APR (*Lr34*, *Lr67* i genów kandydujących *Lr46*). Publikacja 2 przedstawia wyniki analiz ekspresji genu *Lr34* po inokulacji grzybem *Pt* u czterech odmian pszenicy zwyczajnej jarej i jednej odmiany ozimej, w pięciu punktach czasowych (0, 6, 12, 24 i 48 hpi). Wszystkie odmiany z wyjątkiem Glenlea wykazały spadek poziomu ekspresji *Lr34* natychmiast po inokulacji (6 hpi). Odmiana Glenlea również zareagowała w ten sam sposób, ale z niewielkim opóźnieniem (12 hpi). W tym samym czasie w odmianach Artigas i NP486 zaobserwowano dalszy spadek ekspresji genu *Lr34*. Badane odmiany wykazały znaczące różnice w poziomie ekspresji genu *Lr34* w 48 hpi: u Glenlea i Artigas osiągnęła ona maksymalne wartości, podczas gdy u pozostałych odmian osiągnęła minimum. Zaobserwowane różnice w profilach ekspresji nie wynikały z różnic w fenologii roślin (odmiany jare vs. odmiana ozima). Należy zauważyć, że gen *Lr34* ulega ekspresji na stosunkowo niskim poziomie niezależnie od inokulacji, podczas gdy po inokulacji następuje szybki spadek ekspresji (6 i 12 hpi). W przypadku dwóch odmian spadek ten był przejściowy. W odmianach Glenlea, Lerma Rojo i NP846 spadek ekspresji genu *Lr34* był statystycznie istotny ($p = 0,013-0,048$) (P2).

W prezentowanym cyklu badań przedstawiono również wyniki analiz ekspresji *Lr34* i *Lr67* u form mieszańcowych pszenicy, uzyskanych w wyniku krzyżowania wyselekcjonowanej odmiany Glenlea oraz polskich, wysokoplonujących odmian pszenicy.

Uzyskane formy mieszańcowe obejmowały pokolenia F1 (P4), F2 oraz BC1F1. Podobnie jak w poprzedniej publikacji (P2), geny odporności *Lr34* i *Lr67* wykazywały zróżnicowaną ekspresję w wybranych punktach czasowych. Gen *Lr34* wykazywał stosunkowo niską ekspresję po inokulacji roślin przez *Pt*. Jednak w porównaniu z wynikami opisanymi w poprzedniej pracy, podobieństwo w profilu ekspresji *Lr34* w formie donorowej Glenlea można zaobserwować w badanych formach mieszańcowych F1, gdzie najwyższą ekspresję obserwowano w 24 i 48 hpi (P4). W pokoleniu BC1F1 można zaobserwować wzrost ekspresji genu *Lr34* u większości badanych form mieszańcowych, oprócz: (Harenda × Glenlea) × Harenda, (Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka, które wykazały niską ekspresję we wszystkich punktach czasowych. Co ciekawe, w formie mieszańcowej (Aura × Glenlea) × Aura można zaobserwować początkowy wysoki poziom ekspresji w punkcie 0 hpi. Następnie poziom ekspresji waha się, jednak nie osiągając poziomu wyższego niż przed inokulacją patogenem (Rycina 10). Co ciekawe, gen u obu form pokolenia F2, czyli Merkawa × Glenlea oraz Itaka × Glenlea, zareagował bardzo podobnie, osiągając zbliżone wartości ekspresji (Rycina 10). Z kolei ekspresja *Lr67* wykazała, że reakcja na inokulację była ponownie bardzo zróżnicowana pomiędzy badanymi formami mieszańcowymi F2 i BC1F1 (Rycina 10). Najbardziej dynamiczny wzorzec ekspresji zaobserwowano tylko u (Harenda × Glenlea) × Harenda, z przejściowym spadkiem ekspresji w 12 hpi. Ciekawy profil ekspresji tego genu można zaobserwować także u drugiej formy mieszańcowej z pokolenia BC1F1, czyli (Aura × Glenlea) × Aura, gdzie zaobserwowano wysoki poziom ekspresji jeszcze przed inokulacją (0 hpi), następnie spadek ekspresji do 12 godzin po inokulacji i dynamiczny wzrost ekspresji w 24 hpi (Rycina 10). Bardzo podobne wzorce ekspresji można zaobserwować u form mieszańcowych F1 (P4), z wyjątkiem Jutrzenka × Glenlea.

Zgodnie z literaturą, geny *Lr34* i *Lr67* wykazują kilka podobieństw, ponieważ warunkują odporność na wiele chorób w sposób niespecyficzny dla rasy i odpowiadają za kodowanie transporterów komórkowych. Gen *Lr34* odgrywa kluczową rolę w hodowli pszenicy pod kątem odporności na choroby, w dużej mierze dlatego, że oddziałuje z innymi genami odporności, co daje skuteczną i trwałą odpornością (McCallum i Hiebert, 2022). Celem badania prezentowanego przez MacCallum i Hiebert (2022) było ustalenie, czy gen *Lr67* oddziałuje również z innymi genami odporności w podobny sposób jak *Lr34*. W tym celu opracowano sześć różnych linii podwojonych haploidów, które charakteryzowały się obecnością genu *Lr67* lub *Lr34* wraz z drugim genem odporności: *Lr13*, *Lr16* lub *Lr32*. Obecność genów *Lr67* i *Lr34* znacząco zmniejszyła poziom nasilenia rdzy brunatnej, a gen *Lr34*, w przeciwieństwie do *Lr67*, wykazał znaczącą interakcję z *Lr13*. Oba geny współdziałały

z *Lr16*, a *Lr67* miał znaczącą interakcję z genem *Lr32*. Analiza ta pokazuje podobny wpływ genu *Lr67*, jak w przypadku *Lr34*, na interakcję z innymi genami w celu uzyskania lepszego poziomu odporności niż w przypadku pojedynczych genów. Naukowcy sugerują, że chociaż *Lr67* nie jest szeroko stosowany w rolnictwie, może odgrywać ważną rolę w odporności na choroby (McCallum i Hiebert, 2022). Pomimo wprowadzenia genu *Lr67* do wielu odmianach pszenicy utworzonych przez CIMMYT od lat pięćdziesiątych XX wieku (Huerta-Espino i in., 2020) do tej pory nie występuje w kanadyjskich odmianach pszenicy. Badacze podkreślają, iż wykorzystanie potencjału genu *Lr67* w krajach występowania rdzy brunatnej mogłoby poprawić odporność przyszłych odmian pszenicy (McCallum i Hiebert, 2022). W jednej z najnowszych prac naukowych zespół (Milne i in., 2019) wprowadzili transgen *Lr67* do genotypów jęczmienia, a następnie przeprowadzili analizę jego ekspresji za pomocą RT-qPCR, w celu przeanalizowania odpowiedzi odpornościowej siewek i dorosłych roślin na infekcję patogenem *P. hordei*. Zaobserwowano podwyższenie ekspresji genu *Lr67res* u siewek na *P. hordei*. po 24 godzinach od inokulacji. Co więcej, rośliny posiadające *Lr67res* charakteryzowały się wyższą ekspresją genów związanych z patogenezą (PR). W punkcie czasowym 72 hpi ekspresja *Lr67res* powróciła do poziomu podstawowego, a linie kontrolne nie wykazywały indukcji ekspresji (Milne i in., 2019).

W pracy Bolton i inni (2008) również przeanalizowano ekspresję genu *Lr34* w odpowiedzi na infekcję pszenicy przez *Pt*. Na podstawie wyników autorzy potwierdzili, że gen *Lr34* spowalnia rozwój choroby, ale nie zatrzymuje całkowicie wzrostu patogenu (tzw. efekt *slow rust*). Jego fenotyp odporności przypomina podstawową odporność roślin wynikającą z rozpoznawania ogólnego elicytora grzybowego lub wzorców molekularnych związanych z patogenem (PAMP). Badacze pobrali fragmenty tkanki liściowej w dwóch punktach czasowych: 3 i 7 dpi (ang. *days post inoculation*, dni po inokulacji). Powyższe badanie zostało przeprowadzone na liniach pszenicy zawierających gen *Lr34res*, które wykazały indukcję kilku genów PR (związanych z patogenezą). Fragmenty liści odmiany TcLr34 (Thacher+*Lr34*) pobrano w 3 dpi i stwierdzono znaczny wzrost ekspresji PR-1, PR-2 i PR-3 po infekcji. Ta odpowiedź na poziomie metabolicznym rośliny nie została już zaobserwowana w 7 dpi; może to wyjaśniać, dlaczego gen *Lr34* charakteryzuje się spowalnianiem patogenu, a nie całkowitym zahamowaniem rozwoju choroby. Badania naukowców wskazują, że odporność indukowana genem *Lr34* potęguje zapotrzebowanie na energię, co prowadzi do indukcji wielu reakcji metabolicznych w celu zaspokojenia potrzeb energetycznych komórek. W literaturze kwas abscysynowy (ABA) został zaproponowany jako fitohormon przyczyniający się do odporności na choroby za pośrednictwem *Lr34res* (Krattinger i in., 2019). Inne dane literaturowe

potwierdzają, że ekspresja *Lr34* w transgenicznym jęczmieniu zapewnia odporność na rdzę brunatną i prowadzi do akumulacji ABA w wierzchołkach liści, w rezultacie powodują rozwój nekrozy wierzchołka liścia (ang. *leaf tip necrosis, LTN*) (Bräunlich i in., 2021; Risk i in., 2013). W związku z tym należy oczekiwać, że wzrost ekspresji genu *Lr34* po infekcji jest mechanizmem odpowiedzi obronnej.

W swojej pracy Cobo i inni (2019) podkreślili potrzebę zbadania ekspresji genów kandydujących dla *Lr46/Yr29* u różnych genotypów, przed i po inokulacji patogenem *Pt* w celu ustalenia, czy istnieją różnice w poziomach ich ekspresji. Wspomniane geny kandydujące występują w *locus QYr.ucw-IBL* w chromosomie 1BL, który był porównywalny z obecnymi mapami genetycznymi opisującymi występowanie genu odporności *Yr29* (znanego również jako *Lr46*). Wyniki sugerują, że QTL (*QYr.ucw-IBL*) i *Lr46/Yr29* mapują ten sam gen nadający podobne reakcje odpornościowe. W rezultacie Cobo i inni (2019) zidentyfikowali 13 genów kandydujących dla *Lr46/Yr29*. Trzy z proponowanych genów zostały odrzucone (TraesCS1B02G454300, TraesCS1B02G454700 oraz TraesCS1B02G454900). Pierwszy wymieniony gen kandydujący został określony jako element transpozycyjny, a pozostałe dwa geny zostały opisane jako pseudogeny i nie ulegają ekspresji (Cobo i in., 2019).

W prezentowanej dysertacji podjęłam próbę analizy poziomów ekspresji dziesięciu spośród trzynastu genów kandydujących dla *locus Lr46*, wybranych na podstawie wyników pracy Cobo i inni (2019). W Publikacji 3 analiza ekspresji obejmowała następujące geny kandydujące: TraesCS1B02G453900.1 (*Lr46-Glu1*), TraesCS1B02G454200.1 (*Lr46-Glu2*), TraesCS1B02G454500.1 (*Lr46-Glu3*), TraesCS1B02G454000.2 (*Lr46-RLK1*), TraesCS1B02G454100.1 (*Lr46-RLK2*), TraesCS1B02G454400.1 (*Lr46-RLK3*), TraesCS1B02G454600.1 (*Lr46-RLK4*), TraesCS1B02G453700.1 (*Lr46-Snex*), TraesCS1B02G454800.2 (*Lr46-STR*) oraz TraesCS1B02G455000.1 (*Lr46-WRKY*). Trzy geny zostały zidentyfikowane jako GLUCAN ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASES (*Lr46-Glu1*, *Lr46-Glu2* i *Lr46-Glu3*) (Cobo et al. 2019). Geny *Glu* te występują w wielu gatunkach roślin nasiennych i są zaangażowane w obronę roślin przed patogenami, a ich ekspresja jest aktywowana podczas infekcji powodowanych przez patogeny grzybowe, bakteryjne lub wirusowe (Cobo i in. 2019; Kebede i Kebede 2021). W przypadku badanego genu kandydującego *Lr46-Glu1* ekspresja różniła się znacznie między analizowanymi odmianami pszenicy, a także pomiędzy samymi punktami czasowymi, dlatego nie zaobserwowano wspólnego wzorca ekspresji dla badanych odmian pszenicy (Rycina 6). W przypadku genu kandydującego *Lr46-Glu2*, spadek poziomu ekspresji tego genu zaobserwowano natychmiast po inokulacji (6 hpi) dla wszystkich odmian, z wyjątkiem odmiany Glenlea. W punkcie

czasowym 12 hpi zaobserwowano dalszy spadek poziomu ekspresji *Lr46-Glu2* dla wszystkich odpornych odmian (Rycina 6). Natomiast, poziom ekspresji genu *Lr46-Glu2* znacznie przekroczył poziom wyjściowy (0 hpi). W 48 godzinach po inokulacji poziom ekspresji *Lr46-Glu2* spadł u wszystkich badanych odmian pszenicy, ale nadal przekraczał poziom wyjściowy u odmian Artigas, Glenlea, Lerma Rojo i TX89D6435 (Rycina 3). Z kolei gen kandydujący *Lr46-Glu3* wykazał bardzo niski poziom ekspresji zarówno przed, jak i po inokulacji zarodnikami *Pt* (Rycina 6).

Zgodnie z danymi literaturowymi, endo- β -1,3-glukozydazy należą do enzymów hydrolitycznych wśród białek związanych z patogenezą (białka PR), które występują u wielu gatunków roślin po zakażeniu różnymi rodzajami patogenów (Cheong i in., 2000; Doxey i in., 2007). Pojedynczy gatunek rośliny może mieć różne homologii genów 1,3- β -glukozydaz, ważnych dla hamowania wzrostu patogennych grzybów poprzez rozkład ich ścian komórkowych, które zawierają β -glukany. W literaturze opisywano, że endo-1,3- β -glukozydaza glukanowa ulega ekspresji wraz z chitynazami po infekcji powodowanej przez grzyby. Indukcja tych dwóch enzymów hydrolitycznych została opisana u wielu gatunków roślin, w tym grochu, fasoli, pomidora, tytoniu, kukurydzy, soi, ziemniaka i pszenicy (Confortin i in., 2019; Kebede i Kebede, 2021). W szczególności zaobserwowano wzrost poziomu 1,3- β -glukozydazy podczas stresu suszy (Bernardo, 2021).

W badaniu opisanym w Publikacji 3, cztery z dziesięciu genów kandydujących to geny *RLK* (*Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, *Lr46-RLK3* i *Lr46-RLK4*) i kodują białka ważne dla rozpoznawania sygnałów zewnątrzkomórkowych i inicjowania wewnątrzkomórkowych kaskad sygnalizacyjnych w reakcji na te bodźce (Chen i in., 2017a). Ekspresja genów *Lr46-RLK1* i *Lr46-RLK2* charakteryzowała się wzrostem ekspresji w 6 hpi, a następnie wystąpił spadek i ponowny wzrost w 24 hpi. Najwyższe poziomy ekspresji tych genów w zaobserwowano w odmianach NP846 (6 hpi i 24 hpi) oraz Glenlea (6 hpi). W przypadku *Lr46-RLK3* najwyższy wzrost ekspresji po inokulacji zaobserwowano w 24 hpi w odmianach TX89D6435 i NP946; natomiast w odmianie Glenlea w 6 hpi i 24 hpi. Jednakże, ekspresja tego genu była na stosunkowo niskim poziomie (Rycina 6). Co istotne, podatna odmiana Artigas* konsekwentnie wykazywała niższe poziomy ekspresji badanych genów *RLK* (z wyjątkiem *Lr46-RLK4*), w porównaniu do odmian odpornych, co wskazuje na jej odmienny profil ekspresji genów pod wpływem stresu *Pt* (P3).

U roślin wyróżnia się wiele rodzin genów RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE (*RLK*). Geny te kodują białka błonowe, zlokalizowane w zewnątrzkomórkowej domenie roślinnych sieci receptorowych i są zaangażowane zarówno w biotyczne, jak i abiotyczne

reakcje na stres. Pozakomórkowa domena wiążąca ligand, domena transmembranowa i wewnątrzkomórkowa domena kinazy białkowej są typowymi składnikami *RLK*. Domena zewnątrzkomórkowa, która jest specyficzna dla poszczególnych *RLK*, wiąże określony ligand i pozwala *RLK* reagować na różne rodzaje sygnałów. Wśród *RLK* wyróżnia się takie warianty, jak kinazy bogate w leucynę, lektyny, motyw lizyny lub kinazy związane ze ścianą komórkową (Gu i in., 2020; Yan i in., 2023). *RLK* stanowią największą znaną rodzinę kinaz białkowych, które są ważne w odpowiedzi roślin na infekcję patogenami. Gu i in. (2020) odkryli nowy gen *RLK* bogaty w cysteinę, *TaCRK2*, który pozytywnie regulował odporność na infekcje wywołane przez *Pt* u pszenicy. Geny *RLK* obecne w *locus Lr46/Yr29* kodują białka z dwiema domenami zewnątrzkomórkowymi, które są charakterystyczne dla podgrupy CYSTEINE-RICH RECEPTOR KINASES (Cobo i in. 2019). W literaturze zasugerowano, że geny należące do tej podgrupy mogą być zaangażowane w sygnalizację redoks (Chen, 2001). W kolejnym badaniu (Yadav i in., 2016) naukowcy analizowali zróżnicowaną ekspresję genów pod wpływem stresu *Pt*, która nastąpiła w liniach pszenicy posiadających gen odporności *Lr57*. Yadav wraz z zespołem (2016) wykazali, że największą liczbę transkryptów ulegających ekspresji wykryto w 12 hpi. Co ciekawe, wśród tych transkryptów, bogate w cysteinę *RLK* ulegały ekspresji tylko w 12 hpi, w genotypie pszenicy odpornej.

Rodzina *WRKY* reprezentuje inną grupę czynników transkrypcyjnych ważnych w regulacji odpowiedzi roślin na czynniki stresowe. U *Arabidopsis*, nadekspresja *WRKY63/ABO3* (Ren i in., 2010) oraz *WRKY57* (Jiang i in., 2012) wpłynęła na zwiększoną tolerancję na stres suszy w sposób zależny od ABA (kwas abscysynowy). Liczne dane wskazują, że nadekspresja genów kodujących białka należące do rodziny *WRKY* również zwiększa tolerancję na suszę u gatunków roślin uprawnych (Khosro i in., 2022; Wang i in., 2018). Wiele prac badawczych opisało rodzinę genów *WRKY* u roślin uprawnych, w tym w ryżu (*Oryza sativa*), kukurydzy (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) i kapuście (*Brassica rapa*) (F. Chen i in., 2017; J. Jiang i in., 2017). W prezentowanej rozprawie doktorskiej gen *WRKY* był jednym z genów kandydujących dla *Lr46* (P3). W przypadku genu *Lr46-WRKY* zaobserwowano najwyższe wartości w odmianie Artigas* we wszystkich punktach czasowych, z wyjątkiem 48 hpi, oraz w odmianie Glenlea w 24 hpi (Rycina 6). Jednak wyraźną tendencję zaobserwowano dla genu *Lr46-WRKY*, gdzie zaobserwowano korelacje tylko z dwoma genami: *Lr46-Snex* i *Lr46-RLK4* (odpowiednio 0,703 i 0,702; $p < 0,001$) (Rycina 7).

Wśród dziesięciu analizowanych genów kandydujących wyróżniono również gen *Lr46-Str*. Jednakże, podczas prowadzenia analiz ekspresji genu *Lr46-Str* uzyskano wiele

niespecyficznym produktów PCR, co było szczególnie widoczne na krzywej topnienia. W związku z powyższym, zdecydowano się odrzucić z *Lr46-STR* z dalszych analiz (P3).

Na podstawie otrzymanych wyników w publikacji P3, do dalszych analiz ekspresji wyselekcjonowano cztery następujące geny kandydujące: *Lr46-Glu2*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2* oraz *Lr46-RLK3*. Spośród wyżej wymienionych genów kandydujących, najmniej zróżnicowany profil ekspresji zaobserwowano dla *Lr46-Glu2*. W Publikacji 4 zaprezentowano wyniki ekspresji tych genów kandydujących u form mieszańcowych pokolenia F1. W czterech formach mieszańcowych pszenicy: Jutrzenka × Glenlea, Itaka × Glenlea, Harenda × Glenlea i Merkawa × Glenlea, można zaobserwować silny wzrost ekspresji genu *Lr46-Glu2* w 24 hpi, (Rycina 8). Poziom ekspresji *Lr46-Glu2* znacznie przekroczył poziom wyjściowy sprzed inokulacji. W porównaniu z genem kandydującym *Lr46-Glu2*, geny *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2* i *Lr46-RLK3* wykazują niską ekspresję w czasie, na podobnych poziomach we wszystkich badanych formach mieszańcowych (Rycina 8). W przypadku genu *Lr46-RLK2* poziomy ekspresji wahają się w czasie u wszystkich form badanych pokolenia F1, ostatecznie osiągając niższe wartości niż przed inokulacją (Rycina 8). Co ciekawe, geny te wykazywały bardzo wysoką ekspresję początkową (0 hpi) w dwóch formach mieszańcowych: Merkawa × Glenlea (*Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK3*) i Jutrzenka × Glenlea (*Lr46-RLK1*). Analiza wariancji wykazała, że główne zależności między formą mieszańcową i punktem czasowym, a także interakcja pomiędzy formą mieszańcową i punktem czasowym były istotne dla profilu ekspresji wszystkich genów badanych (P4). Powyższe wyniki, uzyskane w Publikacjach 3 i 4, zadecydowały o wyborze genu kandydującego *Lr46-Glu2* do dalszych badań, obejmujących pokolenia F2 i BCF1. Gen kandydujący *Lr46-Glu2* wykazał najwyższą ekspresję u dwóch form pokolenia F2, czyli Merkawa × Glenlea oraz Itaka × Glenlea, osiągając najwyższe wartości w 6 hpi (Rycina 10). W kolejnych punktach czasowych nastąpił spadek ekspresji, ale w przypadku formy mieszańcowej Itaka × Glenlea zaobserwowano ponowny wzrost poziomu ekspresji *Lr46-Glu2* w 48 hpi (Rycina 10). Podobny wzorzec ekspresji tego genu kandydującego zaobserwowano w poprzednich latach doświadczeń: u odmiany Glenlea (Rycina 6) oraz u form mieszańcowych pokolenia F1 (Rycina 8). Natomiast u form mieszańcowych BC1F1: (Harenda × Glenlea) × Harenda oraz (Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka, profil ekspresji genu był bardzo zbliżony i największy wzrost poziomu ekspresji *Lr46-Glu2* nastąpił w 12 hpi (Rycina 10).

Warto podkreślić, że przedstawione analizy ekspresji dotyczyły wzorców ekspresji genów w różnych odmianach pszenicy (P2, P3) oraz formach mieszańcowych uzyskanych w pokoleniach F1 (P4), F2 i BC1F1, podczas gdy ich podłoże genetyczne i specyficzne mechanizmy odporności nie są dokładnie znane. Zbadanie historii ewolucyjnej tych odmian

mogłoby zapewnić kontekst do interpretacji obserwowanych wzorców ekspresji badanych genów odporności i genów kandydujących. Przyszłe badania powinny dotyczyć funkcjonalnej walidacji wymienionych genów kandydujących, obejmującej między innymi nokaut genowy i analizę nadekspresji. Ponadto, integracja danych transkryptomicznych, proteomicznych i metabolomicznych może zapewnić bardziej kompleksowe zrozumienie mechanizmów molekularnych, leżących u podstaw odporności na *Pt*. Takie podejście wielo-omiczne umożliwia identyfikację kluczowych ścieżek i sieci regulacyjnych, zaangażowanych w odpowiedź odpornościową roślin (Shah i in., 2018).

W ostatnim dziesięcioleciu nacisk na ulepszanie upraw przy użyciu nowych narzędzi i metod genetycznych zwrócił się w kierunku identyfikacji i analizy funkcjonalnej cząsteczek miRNA, czyli jednego z wiodących obszarów badawczych w naukach o roślinach (Salgotra i Zargar, 2020a). W prezentowanej pracy doktorskiej technikę ddPCR wykorzystano do analizy ekspresji cząsteczek miRNA: *tae-miR9653b*, *tae-miR9773* i *tae-miR9677b* związanych z genem *Lr34* oraz *tae-miR5384-3p*, *tae-miR9780*, *tae-miR9775* i *tae-miR164*, związanych z badanymi genami kandydującymi. W przypadku cząsteczek miRNA komplementarnych do genu docelowego *Lr34*, tylko w przypadku *tae-miR9653b* uzyskano wyniki pozwalające na wiarygodne wnioskowanie. W prezentowanym cyklu badań, cząsteczka *tae-miR9653b* wykazywała profil ekspresji sugerujący zaangażowanie w reakcję na stres biotyczny wywołany przez *Pt* (P1, P2, P4). W Publikacji 1 inokulacja odmian pszenicy zarodnikami *Pt* skutkowała zmienioną ekspresją *tae-miR9653b* w odmianach wykazujących obecność allelu *Lr34* determinującego odporność. Poziom ekspresji *tae-miR9653b* różnił się w zależności od odmiany i punktu czasowego. W 6 hpi nastąpił niewielki wzrost poziomu ekspresji *tae-miR9653b* zaobserwowany u wszystkich odmian referencyjnych pszenicy, z wyjątkiem odmiany kontrolnej HN ROD. Większość odmian wykazywała zwiększoną ekspresję tego miRNA w 12, 24 i 48 godzinach po inokulacji. Najszybszą reakcją *tae-miR9653* na inokulację odnotowano u odmiany Myna'S' (P1).

Wcześniejsze badania wykazały, iż wyżej opisane cząsteczki miRNA mogą być zaangażowane w odpowiedź immunologiczną zarówno na stesy biotyczne, jak i abiotyczne. W badaniu Li i współpracowników (2017) zbadano ekspresję szeregu różnych miRNA, w tym również *tae-miR9653b*, po ekspozycji pszenicy na fenantren. Wykazano, że po traktowaniu roślin fenantrenem ekspresja badanego *tae-miR9653b* uległa obniżeniu (Li i in., 2017). Z kolei w badaniu dotyczącym stresu suszy u pszenicy zwyczajnej (Bakhshi i in., 2017) autorzy rozważali rolę cząsteczek miRNA w odpowiedzi na suszę. Jednym z trzech miRNA tłumionych przez suszę w odmianie tolerancyjnej na suszę był *tae-miR9653* (w tym *miR9653a* i

miR9653b). Natomiast w odmianie wrażliwej, ekspresja tae-miR9653b uległa zwiększeniu, podczas gdy poziom ekspresji tae-miR9653a pozostawał niezmienny. Niestety, wiedza na temat roli tae-miR9653b w odpowiedzi roślin na stesy biotyczne jest wciąż ograniczona, aczkolwiek wykazano, że tae-miR9653b pozytywnie reaguje na infekcję *Fusarium graminearum* w liniach pszenicy zwyczajnej niosących *locus* odporności *FHB* w chromosomie 2DL (Biselli i in., 2018).

Cząsteczka tae-miR5384-3p, której ekspresja była badana w prezentowanej pracy doktorskiej, stwierdzono, że jego poziom ekspresji po inokulacji u czterech form mieszańcowych wahał się, ostatecznie przyjmując wartości niższe lub równe wartościom początkowym przed inokulacją. W związku z tym może to sugerować, że tae-miR5384-3p nie represjonował specyficznie genu *Lr46-Glu2* w badanych punktach czasowych, ponieważ ekspresja genu wzrosła po inokulacji. Analizując komplementarną do tego genu cząsteczkę tae-miR5384-3p, stwierdzono, że jego poziom ekspresji po inokulacji u czterech form mieszańcowych pokolenia F1 wahał się, ostatecznie przyjmując wartości niższe lub równe wartościom początkowym przed inokulacją (P4). Spośród wszystkich analizowanych genotypów tylko u Aura × Glenlea wykazano znaczący wzrost ekspresji tae-miR5384-3p w 48 hpi, w porównaniu do poziomów sprzed inokulacji. W przypadku pozostałych form mieszańcowych pokolenia F1 odnotowano niższy poziom ekspresji tego miRNA w 48 hpi niż przed inokulacją przez *Pt.* Z kolei u form mieszańcowych pokolenia BCF1: (Harenda × Glenlea) × Harenda, (Jutrzenka × Glenlea) × Jutrzenka oraz (Aura × Glenlea) × Aura, zaobserwowano wzrost tae-miR5338-3p w 24 i 48 hpi. W doniesieniach literaturowych określono, iż cząsteczka tae-miR5384-3p może hamować szereg genów z podrodziny *TaFAB2*, które są związane z tworzeniem nienasyconych kwasów tłuszczowych, odgrywających rolę w rozwoju roślin oraz w odpowiedzi na stesy biotyczne i abiotyczne (Hajiahmadi i in., 2020). W innym badaniu cząsteczka tae-miR5384-3p wykazywała bardzo wysoki wzrost ekspresji po traktowaniu siewek pszenicy zawiesiną chitozanu (Zhang i in., 2018). Zmienność względnych profili ekspresji jest powszechnie obserwowane w przypadku sekwencjonowania małych RNA lub analizy ekspresji miRNA w różnych warunkach stresu biotycznego i abiotycznego (Pandey i in., 2014). Takie zjawisko może odnosić się do zmieniających się mechanizmów obronnych we wczesnych i późnych etapach odpowiedzi roślin na stesy. Z kolei zespół Gidhi (2022) przeprowadził analizę sekwencji ujawniła zaangażowanie tae-miR5384-3p (jak również tae-miR164 i tae-miR9679-5p) w celowanie w gen *TaAFB6* (TraesCS5A02G281100), który koduje białko *AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB)* (Gidhi i in., 2022). Sugerowało to możliwość potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów typu *TaAFB*. Naukowcy przeanalizowali ekspresję

wybranych genów *AFB* w odpowiedzi na inokulację zarodnikami *Pt*, pobierając fragmenty liści pszenicy w sześciu punktach czasowych (0, 12, 48, 120 i 168 hpi). Część analizowanych genów *AFB* wykazywała najwyższą ekspresję w 12 i 48 hpi, zarówno w podatnych, jak i odpornych liniach pszenicy. Wszystkie znane geny typu *TaAFB* są zaangażowane w aktywowany auksyną szlak sygnałowy, który prowadzi do procesu ubikwitynacji (Gidhi i in., 2022).

Rodzina miR164 jest jedną z najbardziej konserwatywnych grup miRNA występujących u roślin (Feng i in., 2014). Cząsteczka miR164 odgrywa ważną rolę w odpowiedzi na stesy biotyczne; reguluje poziomy transkryptów genów, z którymi się wiąże. Przykładowo, miR164 był aktywowany u ryżu po inokulacji *Magnaporthe oryzae* (grzyb wywołujący zarazę ryżu) (Li i in., 2014). Inne badania wykazały, że miR164 wpływa także na ekspresję specyficznych dla roślin czynników transkrypcyjnych *NAC* (Chi i in., 2023; Fang i in., 2014). Większość czynników *NAC* odgrywa istotną rolę w regulacji rozwoju roślin i odpowiedzi na stesy abiotyczne i biotyczne (Bazzini i in., 2007; Fang i in., 2014; Feng i in., 2014). W innym doświadczeniu badacze sugerują, że miR164 reguluje gen *TaMAPK4*, który należy do grupy wspomnianych w niniejszej rozprawie genów *MAPK*, zaangażowanych w reakcję obronną roślin. W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono badanie wpływu tae-miR164 na gen kandydujący *Lr46-RLK3*. U większości testowanych odmian i form mieszańcowych pszenicy (P3), gdy ekspresja genu kandydującego wzrastała, tae-miR164 ulegał obniżeniu i odwrotnie: gdy ekspresja miRNA wzrastała, wartości ekspresji genu kandydującego ulegały obniżeniu. Spadek ekspresji tae-miR164 może być związany z aktywacją mechanizmów odpornościowych zależnych od genów *Lr46-RLK3*, obserwowanych jako szybka odpowiedź genów na patogen .

Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu molekularnych podstaw odporności na rdzę brunatną, rola miRNA w modulowaniu ekspresji genów została zbadana tylko dla kilku głównych genów R, w tym: *Lr24* i *Lr28* (Jain i in., 2020; D. Kumar i in., 2014). W niektórych z tych prac wykazano, że miRNA odgrywają ważną rolę jako negatywne regulatory poprzez zahamowanie translacji lub degradację docelowych mRNA gospodarza i/lub patogenu (Dutta i in., 2019; Feng i in., 2014). Chociaż rola miRNA w odporności na choroby (w tym odporności na rdzę brunatną z udziałem genu *Lr46*) była analizowana (Tomkowiak i in., 2020), niewiele podobnych badań przeprowadzono dla genów typu APR. Geny kandydujące powinny być weryfikowane za pomocą takich metod, jak analiza ekspresji genów (RT-qPCR), mapowanie sprzężeń i metody TILLING (ang. *Targeting Induced Local Lesions In Genomes*). W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań transkryptomicznych i badań z zakresu genomiki

funkcjonalnej w celu zrozumienia mechanizmów stresu u różnych roślin uprawnych. Jednakże, wiele naukowców podkreśla potrzebę kontynuacji badań z zastosowaniem nowoczesnych technik genomowych (Shah i in., 2018). Warto podkreślić, że jedna cząsteczka miRNA może wywierać wpływ na wiele genów docelowych oraz, podobnie jak roślinne czynniki transkrypcyjne, modulować ich ekspresję. Badanie sieci regulacyjnych, obejmujących między innymi cząsteczki miRNA i ich geny docelowe, może przyczynić się do odkrycia dodatkowych szlaków odpowiedzi odpornościowej pszenicy na *Pt*.

9. Podsumowanie i wnioski

Badania podjęte w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu analizę profili ekspresji genów *Lr34*, *Lr67* oraz genów kandydujących dla genu *Lr46*, po inokulacji zarodnikami grzybów *Pt*. Spośród testowanych genów kandydujących (*Lr46-Glu1*, *Lr46-Glu2*, *Lr46-Glu3*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, *Lr46-RLK3*, *Lr46-RLK4*, *Lr46-Snex* i *Lr46-WRKY*), najwyższe poziomy ekspresji wystąpiły tylko u jednego genu kandydującego (*Lr46-Glu2*), co sugeruje jego potencjalną rolę w odpowiedzi odpornościowej na infekcję powodowaną przez *Pt*. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań podkreślają potrzebę zrozumienia molekularnych podstaw interakcji roślina-patogen, co umożliwi opracowanie nowych strategii odporności na porażenie rdzą brunatną. Analiza funkcjonalna *locus Lr46/Yr29* są niezbędne do określenia zmienności allelicznej genu(ów) i ustalenia ich funkcji. Uzyskanie większej ilości informacji i poznanie sekwencji genu, który nadaje odporność na rdzę brunatną, umożliwiłoby opracowanie bardziej specyficznych markerów molekularnych dla *Lr46/Yr29*, co ułatwiłoby selekcję linii w hodowli odpornościowej pszenicy.

Ze względu na endogeny charakter cząsteczek miRNA, ich ekspresja jest regulowana przez białkowe czynniki transkrypcyjne i mechanizmy epigenetyczne. Czynniki transkrypcyjne, zaangażowane w komórkowe szlaki sygnałowe odpowiedzialne za odpowiedź na wpływ środowiska, mogą również modyfikować pulę miRNA, a tym samym proteom. Przeprowadzone badania wykazały, że miR9653b może być zaangażowany w mechanizmy odporności roślin na rdzę liści powodowaną przez *Pt*. Zgodnie z wykorzystaną bazą danych, cząsteczka ta-miR9653b jest związana z odpornością na rdzę brunatną, nadawaną przez gen *Lr34*, a różnice w ekspresji indukowane przez inokulację *Pt* mogą potwierdzać tę informację.

Badania przeprowadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują na udział wybranych cząsteczek miRNA w dynamicznym procesie reakcji odpornościowej. Jednakże, dalsze badania tych cząsteczek i ich genów docelowych umożliwią głębsze zrozumienie sieci regulacyjnej, w której uczestniczą podczas procesu molekularnej odpowiedzi na stres biotyczny, wywołany infekcją *Pt*.

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Spośród wszystkich analizowanych genów w pracy P4, podobnie jak w publikacji P3, najwyższym poziomem ekspresji po porażeniu roślin przez *Pt* charakteryzował się gen kandydujący *Lr46-Glu2*. Wskazuje to na jego potencjalną rolę w procesach odpornościowych pszenicy. Przedstawione wyniki ekspresji tego genu stanowią ważną podstawę do dalszych analiz funkcjonalnych tego genu.
2. W przypadku genu kandydującego *Lr46-Glu2* wzrost ekspresji nastąpił w 24 i 48 hpi, zdecydowanie przekraczając poziom sprzed inokulacji (P3).
3. Podobieństwo w profilu ekspresji *Lr34* w formie donorowej Glenlea zaobserwowano u większości form mieszańcowych, gdzie najwyższa ekspresja genu *Lr34* nastąpiła w 24 i 48 hpi.
4. Poziom ekspresji genu *Lr67* był zróżnicowany pomiędzy badanymi pokoleniami pszenicy, wykazując wysoki bazowy poziom ekspresji przed inokulacją *Pt* (0 hpi).
5. Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z allelami genów odporności (*Lr34*, *Lr46* oraz *Lr67*) i analiza ich ekspresji pozwoliła na wybranie odmiany Glenlea jako formy donorowej w krzyżowaniach z polskimi odmianami (P2 i P3).
6. Przeprowadzone sekwencjonowanie Sangera umożliwiło scharakteryzowanie uzyskanych amplikonów i potwierdziło specyficzność zaprojektowanych starterów.
7. Zaprojektowane startery do analiz RT-qPCR okazały się skuteczne w badaniu ekspresji wszystkich genów badanych, oprócz genu kandydującego *Lr46-Str* (P2, P3).
8. Zaprojektowane startery do analiz RT-qPCR mogą zostać wykorzystywane w badaniach selekcyjnych podczas dalszych prac nad mechanizmami odporności genów typu APR oraz w programach hodowlanych pszenicy.
9. Na podstawie wyników specyficzności starterów i stabilności ekspresji badanych genów referencyjnych (*TUB β* , *ARF*, *RLI*, *EF2-1*) wybrano dwa (*TUB β* oraz *ARF*), które pozwoliły na poprawną analizę ekspresji badanych genów APR (P2, P3, P4).
10. Analiza reakcji miRNA na inokulację grzybem *Pt* wskazuje na aktywację ekspresji cząsteczki tae-miR9653b oraz możliwość blokowania ekspresji genu *Lr34* w badanych punktach czasowych (P1, P2, P4).
11. Analiza reakcji miRNA na inokulację grzybem *Pt* wskazuje na aktywację ekspresji cząsteczki tae-miR5384-3p oraz udział tej cząsteczki w modulacji odpowiedzi immunologicznej pszenicy (P3, P4).

12. Zgodnie z danymi literaturowymi, cząsteczka tae-miR164 bierze udział w odpowiedzi na stresy biotyczne. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej potwierdzają udział w odpowiedzi odpornościowej tae-miR164 na inokulację grzybem *Pt* oraz możliwą modulację ekspresji genu *Lr46-RLK3* (P3).

10. Literatura

1. Ahmar, S., Gill, R. A., Jung, K.-H., Faheem, A., Qasim, M. U., Mubeen, M., & Zhou, W. (2020). Conventional and Molecular Techniques from Simple Breeding to Speed Breeding in Crop Plants: Recent Advances and Future Outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>
2. Akhunov, E. D., Akhunova, A. R., Anderson, O. D., Anderson, J. A., Blake, N., Clegg, M. T., Coleman-Derr, D., Conley, E. J., Crossman, C. C., Deal, K. R., Dubcovsky, J., Gill, B. S., Gu, Y. Q., Hadam, J., Heo, H., Huo, N., Lazo, G. R., Luo, M.-C., Ma, Y. Q., ... Dvorak, J. (2010). Nucleotide diversity maps reveal variation in diversity among wheat genomes and chromosomes. *BMC Genomics*, *11*(1), 702. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-702>
3. 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>
4. Anderson, J. (2012). Food, Farming and Freedom: Sowing the Arab Spring. *Australian Journal of International Affairs*, *66*(3), 403–404. <https://doi.org/10.1080/10357718.2012.681470>
5. Annan, E. N., & Huang, L. (2023). Molecular Mechanisms of the Co-Evolution of Wheat and Rust Pathogens. *Plants*, *12*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/plants12091809>
6. Bakhshi, B., Fard, E. M., Gharechahi, J., Safarzadeh, M., Nikpay, N., Fotovat, R., Azimi, M. R., & Salekdeh, G. H. (2017). The contrasting microRNA content of a drought tolerant and a drought susceptible wheat cultivar. *Journal of Plant Physiology*, *216*, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.05.012>
7. Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: Concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*, *20*(8), 1163–1178. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>
8. Banasiak, J. (2022). System odpornościowy roślin – model zygzakowy. *Postępy Biochemii*, *68*(2), Article 2. https://doi.org/10.18388/pb.2021_427
9. Bariana, H. S., Babu, P., Forrest, K. L., Park, R. F., & Bansal, U. K. (2022). Discovery of the New Leaf Rust Resistance Gene Lr82 in Wheat: Molecular Mapping and Marker Development. *Genes*, *13*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/genes13060964>
10. Bariana, H. S., Bansal, U. K., Basandrai, D., & Chhetri, M. (2013). Disease Resistance. W C. Kole (Red.), *Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops* (s. 291–314). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37048-9_8
11. Basso, M. F., Ferreira, P. C. G., Kobayashi, A. K., Harmon, F. G., Nepomuceno, A. L., Molinari, H. B. C., & Grossi-de-Sa, M. F. (2019). MicroRNAs and new biotechnological tools for its modulation and improving stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology Journal*, *17*(8), 1482–1500. <https://doi.org/10.1111/pbi.13116>
12. Bazzini, A. A., Hopp, H. E., Beachy, R. N., & Asurmendi, S. (2007). Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with

- symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(29), 12157–12162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705114104>
13. Bentley, A. (2022). Broken bread—Avert global wheat crisis caused by invasion of Ukraine. *Nature*, *603*(7902), 551–551. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-00789-x>
 14. Bernardo, R. (2021). Subgenome contributions to quantitative genetic variation in bread wheat and durum wheat populations. *Crop Science*, *61*(2), 1002–1012. <https://doi.org/10.1002/csc2.20372>
 15. Beukert, U., Liu, G., Thorwarth, P., Boeven, P. H. G., Longin, C. F. H., Zhao, Y., Ganal, M., Serfling, A., Ordon, F., & Reif, J. C. (2020). The potential of hybrid breeding to enhance leaf rust and stripe rust resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *133*(7), 2171–2181. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03588-y>
 16. Bhardwaj, S. C., Gangwar, O. P., Prasad, P., Kumar, S., & Pal, D. (2021). Immunity to rusts in wheat: Theory, fact and practice. *Indian Phytopathology*, *74*(2), 355–363. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00376-6>
 17. Biselli, C., Bagnaresi, P., Faccioli, P., Hu, X., Balcerzak, M., Mattera, M. G., Yan, Z., Ouellet, T., Cattivelli, L., & Valè, G. (2018). Comparative Transcriptome Profiles of Near-Isogenic Hexaploid Wheat Lines Differing for Effective Alleles at the 2DL FHB Resistance QTL. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 37. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00037>
 18. Bobrowska, R., Noweiska, A., Spychała, J., Tomkowiak, A., Nawracała, J., & Kwiatek, M. T. (2022). Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the Lr46/Yr29 “slow rusting” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biomolecular Concepts*, *13*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>
 19. Bokore, F. E., Knox, R. E., Hiebert, C. W., Cuthbert, R. D., DePauw, R. M., Meyer, B., N’Diaye, A., Pozniak, C. J., & McCallum, B. D. (2022). A Combination of Leaf Rust Resistance Genes, Including Lr34 and Lr46, Is the Key to the Durable Resistance of the Canadian Wheat Cultivar, Carberry. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 775383. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.775383>
 20. Bolton, M. D., Kolmer, J. A., Xu, W. W., & Garvin, D. F. (2008). Lr34 -Mediated Leaf Rust Resistance in Wheat: Transcript Profiling Reveals a High Energetic Demand Supported by Transient Recruitment of Multiple Metabolic Pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(12), 1515–1527. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1515>
 21. Bräunlich, S., Koller, T., Glauser, G., Krattinger, S. G., & Keller, B. (2021). Expression of the wheat disease resistance gene Lr34 in transgenic barley leads to accumulation of abscisic acid at the leaf tip. *Plant Physiology and Biochemistry*, *166*, 950–957. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.07.001>
 22. Budak, H., Kantar, M., Bulut, R., & Akpinar, B. A. (2015). Stress responsive miRNAs and isomiRs in cereals. *Plant Science*, *235*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.008>
 23. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR

24. Campbell, E. J., Schenk, P. M., Kazan, K., Penninckx, I. A. M. A., Anderson, J. P., Maclean, D. J., Cammue, B. P. A., Ebert, P. R., & Manners, J. M. (2003). Pathogen-Responsive Expression of a Putative ATP-Binding Cassette Transporter Gene Conferring Resistance to the Diterpenoid Sclareol Is Regulated by Multiple Defense Signaling Pathways in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(3), 1272–1284. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024182>
25. Cavalet-Giorsa, E., González-Muñoz, A., Athiyannan, N., Holden, S., Salhi, A., Gardener, C., Quiroz-Chávez, J., Rustamova, S. M., Elkot, A. F., Patpour, M., Rasheed, A., Mao, L., Lagudah, E. S., Periyannan, S. K., Sharon, A., Himmelbach, A., Reif, J. C., Knauff, M., Mascher, M., ... Krattinger, S. G. (2024). Origin and evolution of the bread wheat D genome. *Nature*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07808-z>
26. Chao, J., Li, Z., Sun, Y., Aluko, O. O., Wu, X., Wang, Q., & Liu, G. (2021). MG2C: A user-friendly online tool for drawing genetic maps. *Molecular Horticulture*, 1(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s43897-021-00020-x>
27. Chen, F., Hu, Y., Vannozzi, A., Wu, K., Cai, H., Qin, Y., Mullis, A., Lin, Z., & Zhang, L. (2017). The WRKY Transcription Factor Family in Model Plants and Crops. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36(5–6), 311–335. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1441103>
28. Chen, Y., & Yu, X. (2023). Endoplasmic reticulum stress-responsive microRNAs are involved in the regulation of abiotic stresses in wheat. *Plant Cell Reports*, 42(9), 1433–1452. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03040-7>
29. Chen, Z. (2001). A Superfamily of Proteins with Novel Cysteine-Rich Repeats. *Plant Physiology*, 126(2), 473–476. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.473>
30. Cheong, Y. H., Kim, C. Y., Chun, H. J., Moon, B. C., Park, H. C., Kim, J. K., Lee, S.-H., Han, C., Lee, S. Y., & Cho, M. J. (2000). Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. *Plant Science*, 154(1), 71–81. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00187-4)
31. Chi, Q., Du, L., Ma, W., Niu, R., Wu, B., Guo, L., Ma, M., Liu, X., & Zhao, H. (2023). The miR164-TaNAC14 module regulates root development and abiotic-stress tolerance in wheat seedlings. *Journal of Integrative Agriculture*, 22(4), 981–998. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.08.016>
32. Cobo, N., Wanjugi, H., Lagudah, E., & Dubcovsky, J. (2019). A High-Resolution Map of Wheat *QYr.ucw-1BL*, an Adult Plant Stripe Rust Resistance Locus in the Same Chromosomal Region as *Yr29*. *The Plant Genome*, 12(1), 180055. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.08.0055>
33. Confortin, T. C., Spannemberg, S. S., Toderò, I., Luft, L., Brun, T., Alves, E. A., Kuhn, R. C., & Mazutti, M. A. (2019). Chapter 21—Microbial Enzymes as Control Agents of Diseases and Pests in Organic Agriculture. W V. K. Gupta & A. Pandey (Red.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (s. 321–332). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00021-9>

34. Dakouri, A., McCallum, B. D., & Cloutier, S. (2014). Haplotype diversity and evolutionary history of the Lr34 locus of wheat. *Molecular Breeding*, 33(3), 639–655. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9981-2>
35. Dinglasan, E., Periyannan, S., & Hickey, L. T. (2022). Harnessing adult-plant resistance genes to deploy durable disease resistance in crops. *Essays in Biochemistry*, 66(5), 571–580. <https://doi.org/10.1042/EBC20210096>
36. Dinh, H. X., Singh, D., Periyannan, S., Park, R. F., & Pourkheirandish, M. (2020). Molecular genetics of leaf rust resistance in wheat and barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 133(7), 2035–2050. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03570-8>
37. Doxey, A. C., Yaish, M. W. F., Moffatt, B. A., Griffith, M., & McConkey, B. J. (2007). Functional Divergence in the Arabidopsis β -1,3-Glucanase Gene Family Inferred by Phylogenetic Reconstruction of Expression States. *Molecular Biology and Evolution*, 24(4), 1045–1055. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm024>
38. Dreisigacker, S., Kishii, M., Lage, J., & Warburton, M. (2008). Use of synthetic hexaploid wheat to increase diversity for CIMMYT bread wheat improvement. *Australian Journal of Agricultural Research*, 59(5), 413–420. <https://doi.org/10.1071/AR07225>
39. Dutta, S., Jha, S. K., Prabhu, K. V., Kumar, M., & Mukhopadhyay, K. (2019). Leaf rust (*Puccinia triticina*) mediated RNAi in wheat (*Triticum aestivum* L.) prompting host susceptibility. *Functional & Integrative Genomics*, 19(3), 437–452. <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00655-6>
40. Dyck, P. L. (1977). Genetics of leaf rust reaction in three introductions of common wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 19(4), 711–716. <https://doi.org/10.1139/g77-077>
41. Dyck, P. L. (1987). The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Genome*, 29(3), 467–469. <https://doi.org/10.1139/g87-081>
42. Ellis, J. G., Lagudah, E. S., Spielmeier, W., & Dodds, P. N. (2014). The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00641>
43. Fang, Y., Xie, K., & Xiong, L. (2014). Conserved miR164-targeted NAC genes negatively regulate drought resistance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 65(8), 2119–2135. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru072>
44. FAO (Red.). (2018). *Building climate resilience for food security and nutrition*. FAO.
45. FAO (Red.). (2019). *The State of Food Security and Nutrition in the World*, FAO.
46. Feng, H., Duan, X., Zhang, Q., Li, X., Wang, B., Huang, L., Wang, X., & Kang, Z. (2014). The target gene of tae-miR164, a novel NAC transcription factor from the NAM subfamily, negatively regulates resistance of wheat to stripe rust. *Molecular Plant Pathology*, 15(3), 284–296. <https://doi.org/10.1111/mpp.12089>

47. Feng, H., Wang, B., Zhang, Q., Fu, Y., Huang, L., Wang, X., & Kang, Z. (2015). Exploration of microRNAs and their targets engaging in the resistance interaction between wheat and stripe rust. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00469>
48. Figlan, S., Ntushelo, K., Mwadzingeni, L., Terefe, T., Tsilo, T., & Shimelis, H. (2020). Breeding Wheat for Durable Leaf Rust Resistance in Southern Africa: Variability, Distribution, Current Control Strategies, Challenges and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, 11, 549. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00549>
49. Figueroa, M., Hammond-Kosack, K. E., & Solomon, P. S. (2018). A review of wheat diseases—A field perspective. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1523–1536. <https://doi.org/10.1111/mpp.12618>
50. Forero, D. A., González-Giraldo, Y., Castro-Vega, L. J., & Barreto, G. E. (2019). qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *BioTechniques*, 67(4), 192–199. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0065>
51. Gidhi, A., Mohapatra, A., Fatima, M., Jha, S. K., Kumar, M., & Mukhopadhyay, K. (2022). Insights of auxin signaling F-box genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) and their dynamic expression during the leaf rust infection. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01808-4>
52. Gu, J., Sun, J., Liu, N., Sun, X., Liu, C., Wu, L., Liu, G., Zeng, F., Hou, C., Han, S., Zhen, W., & Wang, D. (2020). A novel cysteine-rich receptor-like kinase gene, TaCRK2, contributes to leaf rust resistance in wheat. *Molecular Plant Pathology*, 21(5), 732–746. <https://doi.org/10.1111/mpp.12929>
53. Gupta, O. P., Permar, V., Koundal, V., Singh, U. D., & Praveen, S. (2012). MicroRNA regulated defense responses in *Triticum aestivum* L. during *Puccinia graminis* f.sp. *Tritici* infection. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 817–824. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0803-5>
54. Hajiahmadi, Z., Abedi, A., Wei, H., Sun, W., Ruan, H., Zhuge, Q., & Movahedi, A. (2020). Identification, evolution, expression, and docking studies of fatty acid desaturase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 21(1), 778. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07199-1>
55. Hao, C., Wang, L., Ge, H., Dong, Y., & Zhang, X. (2011). Genetic Diversity and Linkage Disequilibrium in Chinese Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Revealed by SSR Markers. *PLOS ONE*, 6(2), e17279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017279>
56. Haq, I. U., & Ijaz, S. (2020). *Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches*. Springer Nature.
57. Hawkins, N. J. (2019). Digest: Plant-pathogen coevolution extends to shifts in plant breeding systems*. *Evolution*, 73(3), 628–629. <https://doi.org/10.1111/evo.13687>
58. Herrera-Foessel, S. A., Singh, R. P., Lillemo, M., Huerta-Espino, J., Bhavani, S., Singh, S., Lan, C., Calvo-Salazar, V., & Lagudah, E. S. (2014). Lr67/Yr46 confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(4), 781–789. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2256-9>

59. Hiebert, C. W., Thomas, J. B., McCallum, B. D., Humphreys, D. G., DePauw, R. M., Hayden, M. J., Mago, R., Schnippenkoetter, W., & 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). *Theoretical and Applied Genetics*, *121*(6), 1083–1091. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1373-y>
60. Huerta-Espino, J., Singh, R., Crespo-Herrera, L. A., Villaseñor-Mir, H. E., Rodriguez-Garcia, M. F., Dreisigacker, S., Barcenas-Santana, D., & Lagudah, E. (2020). Adult Plant Slow Rusting Genes Confer High Levels of Resistance to Rusts in Bread Wheat Cultivars From Mexico. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00824>
61. Huerta-Espino, J., Singh, R., Germán, S., Mccallum, B., Park, R., Chen, W. Q., Bhardwaj, S. C., & Goyeau, H. (2011). Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica*, *179*, 143–160. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x>
62. Hussain, B., Akpinar, B. A., Alaux, M., Algharib, A. M., Sehgal, D., Ali, Z., Aradottir, G. I., Batley, J., Bellec, A., Bentley, A. R., Cagirici, H. B., Cattivelli, L., Choulet, F., Cockram, J., Desiderio, F., Devaux, P., Dogramaci, M., Dorado, G., Dreisigacker, S., ... Budak, H. (2022). Capturing Wheat Phenotypes at the Genome Level. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.851079>
63. International V. GenStat for Windows. Hemel Hempstead, UK: VSN International; 2023.
64. IWGSC (2018) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* *361*: 1–13
65. Jain, N., Sinha, N., Krishna, H., Singh, P. K., Gautam, T., Prasad, P., Balyan, H. S., & Gupta, P. K. (2020). A study of miRNAs and lncRNAs during Lr28-mediated resistance against leaf rust in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *112*, 101552. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101552>
66. Jiang, J., Ma, S., Ye, N., Jiang, M., Cao, J., & Zhang, J. (2017). WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, *59*(2), 86–101. <https://doi.org/10.1111/jipb.12513>
67. Jiang, Y., Liang, G., & Yu, D. (2012). Activated Expression of WRKY57 Confers Drought Tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, *5*(6), 1375–1388. <https://doi.org/10.1093/mp/sss080>
68. Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
69. Juery, C., Concia, L., De Oliveira, R., Papon, N., Ramírez-González, R., Benhamed, M., Uauy, C., Choulet, F., & Paux, E. (2021). New insights into homoeologous copy number variations in the hexaploid wheat genome. *The Plant Genome*, *14*(1), e20069. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20069>
70. Karaman, M., barutçular, C., Mennan, H., Caglayan, K., ERMAN, M., Yildirim, M., Gazel, M., Erdemci, İ., Kendal, E., Pala, F., Sonmez, A., Özer, E., ŞERMET, C., SÜREK, H., Geren, H., Duman, M., Düzgün, M., Albayrak, Ö., KAHRAMAN, T., & Başaran, M. (2021). Theoretical and practical new approaches in cereal science and technology edited by authors.

71. Kashyap, P. L., Gupta, V., Prakash Gupta, O., Sendhil, R., Gopalareddy, K., Jasrotia, P., & Singh, G. P. (Eds.). (2022). *New Horizons in Wheat and Barley Research: Global Trends, Breeding and Quality Enhancement*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-4449-8>
72. 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>
73. Kears, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
74. Kebede, A., & Kebede, M. (2021). In silico analysis of promoter region and regulatory elements of glucan endo-1,3-beta-glucosidase encoding genes in *Solanum tuberosum*: Cultivar DM 1-3 516 R44. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *19*(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00240-0>
75. Khoso, M. A., Hussain, A., Ritonga, F. N., Ali, Q., Channa, M. M., Alshagaihi, R. M., Meng, Q., Ali, M., Zaman, W., Brohi, R. D., Liu, F., & Manghwar, H. (2022). WRKY transcription factors (TFs): Molecular switches to regulate drought, temperature, and salinity stresses in plants. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1039329>
76. Kolmer, J. (2013). Leaf Rust of Wheat: Pathogen Biology, Variation and Host Resistance. *Forests*, *4*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/f4010070>
77. Kolmer, J. A., Ordonez, M. E., & Groth, J. V. (2009). The Rust Fungi. W Wiley, *Encyclopedia of Life Sciences* (1. wyd.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021264>
78. Kolmer, J., Lagudah, E., Lillemo, M., Lin, M., & Bai, G. (2015). The Lr46 Gene Conditions Partial Adult-Plant Resistance to Stripe Rust, Stem Rust, and Powdery Mildew in Thatcher Wheat. *Crop Science*, *55*. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.02.0082>
79. Kramer, M. F. (2011). Stem-Loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*, *95*(1), 15.10.1-15.10.15. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1510s95>
80. Krattinger, S. G., Kang, J., Bräunlich, S., Boni, R., Chauhan, H., Selter, L. L., Robinson, M. D., Schmid, M. W., Wiederhold, E., Hensel, G., Kumlehn, J., Sucher, J., Martinola, E., & Keller, B. (2019). Abscisic acid is a substrate of the ABC transporter encoded by the durable wheat disease resistance gene *Lr34*. *New Phytologist*, *223*(2), 853–866. <https://doi.org/10.1111/nph.15815>
81. 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>
82. Krattinger, S. G., Lagudah, E. S., Spielmeier, W., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L. L., & 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>
83. Kulasek, M., Kęsy, J., & Glazińska, P. (2019). miRNA NARZĘDIEM DO OPTYMALIZACJI PŁONOWANIA ROŚLIN UPRAWNYCH. *Kosmos*, 68(1), Article 1. https://doi.org/10.36921/kos.2019_2494
 84. Kumar, D., Singh, D., Kanodia, P., Prabhu, K. V., Kumar, M., & Mukhopadhyay, K. (2014). Discovery of Novel Leaf Rust Responsive microRNAs in Wheat and Prediction of Their Target Genes. *Journal of Nucleic Acids*, 2014, e570176. <https://doi.org/10.1155/2014/570176>
 85. Kumar, R. R., Pathak, H., Sharma, S. K., Kala, Y. K., Nirjal, M. K., Singh, G. P., Goswami, S., & Rai, R. D. (2015). Novel and conserved heat-responsive microRNAs in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional & Integrative Genomics*, 15(3), 323–348. <https://doi.org/10.1007/s10142-014-0421-0>
 86. Kumar, S., Bhardwaj, S. C., Gangwar, O. P., Sharma, A., Qureshi, N., Kumaran, V. V., Khan, H., Prasad, P., Miah, H., Singh, G. P., Sharma, K., Verma, H., Forrest, K. L., Trethowan, R. M., Bariana, H. S., & Bansal, U. K. (2021). Lr80: A new and widely effective source of leaf rust resistance of wheat for enhancing diversity of resistance among modern cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 134(3), 849–858. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03735-5>
 87. Lagudah, E. S., Krattinger, S. G., Herrera-Foessel, S., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Spielmeyer, W., Brown-Guedira, G., Selter, L. L., & Keller, B. (2009). Gene-specific markers for the wheat gene Lr34/Yr18/Pm38 which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(5), 889–898. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1097-z>
 88. Levy, A. A., & Feldman, M. (2022). Evolution and origin of bread wheat. *The Plant Cell*, 34(7), 2549–2567. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac130>
 89. 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>
 90. Li, J., Yue, L., Shen, Y., Sheng, Y., Zhan, X., Xu, G., & Xing, B. (2017). Phenanthrene-responsive microRNAs and their targets in wheat roots. *Chemosphere*, 186, 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.022>
 91. Li, L.-F., Zhang, Z.-B., Wang, Z.-H., Li, N., Sha, Y., Wang, X.-F., Ding, N., Li, Y., Zhao, J., Wu, Y., Gong, L., Mafessoni, F., Levy, A. A., & Liu, B. (2022). Genome sequences of five *Sitopsis* species of *Aegilops* and the origin of polyploid wheat B subgenome. *Molecular Plant*, 15(3), 488–503. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.019>
 92. Li, Y., Lu, Y.-G., Shi, Y., Wu, L., Xu, Y.-J., Huang, F., Guo, X.-Y., Zhang, Y., Fan, J., Zhao, J.-Q., Zhang, H.-Y., Xu, P.-Z., Zhou, J.-M., Wu, X.-J., Wang, P.-R., & Wang, W.-M. (2014). Multiple Rice MicroRNAs Are Involved in Immunity against the Blast Fungus

- Magnaporthe oryzae. *Plant Physiology*, 164(2), 1077–1092. <https://doi.org/10.1104/pp.113.230052>
93. Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K. C., Germain, H., Hecker, A., & Duplessis, S. (2019). Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist*, 222(3), 1190–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.15641>
 94. Luo, M.-C., Gu, Y. Q., Puiu, D., Wang, H., Twardziok, S. O., Deal, K. R., Huo, N., Zhu, T., Wang, L., Wang, Y., McGuire, P. E., Liu, S., Long, H., Ramasamy, R. K., Rodriguez, J. C., Van, S. L., Yuan, L., Wang, Z., Xia, Z., ... Dvořák, J. (2017). Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. *Nature*, 551(7681), 498–502. <https://doi.org/10.1038/nature24486>
 95. Mayrose, I., & Lysak, M. A. (2021). The Evolution of Chromosome Numbers: Mechanistic Models and Experimental Approaches. *Genome Biology and Evolution*, 13(2), evaa220. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa220>
 96. de Mendiburu MF. Package ‘agricolae’. R Package, version2019. p. 1143–49.
 97. McCallum, B. D., & Hiebert, C. W. (2022). Interactions Between Lr67 or Lr34 and Other Leaf Rust Resistance Genes in Wheat (*Triticum aestivum*). *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.871970>
 98. Milne, R. J., Dibley, K. E., Schnippenkoetter, W., Mascher, M., Lui, A. C. W., Wang, L., Lo, C., Ashton, A. R., Ryan, P. R., & Lagudah, E. S. (2019). The Wheat Lr67 Gene from the Sugar Transport Protein 13 Family Confers Multipathogen Resistance in Barley. *Plant Physiology*, 179(4), 1285–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00945>
 99. Moore, J. W., Herrera-Foessel, S., Lan, C., Schnippenkoetter, W., Ayliffe, M., Huerta-Espino, J., Lillemo, M., Viccars, L., Milne, R., Periyannan, S., Kong, X., Spielmeyer, W., Talbot, M., Bariana, H., Patrick, J. W., Dodds, P., Singh, R., & Lagudah, E. (2015). A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics*, 47(12), 1494–1498. <https://doi.org/10.1038/ng.3439>
 100. Müller, T., Schierscher-Viret, B., Fossati, D., Brabant, C., Schori, A., Keller, B., & Krattinger, S. G. (2018). Unlocking the diversity of genebanks: Whole-genome marker analysis of Swiss bread wheat and spelt. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(2), 407–416. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-3010-5>
 101. Ngou, B. P. M., Ahn, H.-K., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*, 592(7852), 110–115. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03315-7>
 102. Pandey, R., Joshi, G., Bhardwaj, A. R., Agarwal, M., & Katiyar-Agarwal, S. (2014). A Comprehensive Genome-Wide Study on Tissue-Specific and Abiotic Stress-Specific miRNAs in *Triticum aestivum*. *PLOS ONE*, 9(4), e95800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095800>
 103. Peng, F. Y., & Yang, R.-C. (2017). Prediction and analysis of three gene families related to leaf rust (*Puccinia triticina*) resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 17(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1056-9>

104. Pequeno, D. N. L., Ferreira, T. B., Fernandes, J. M. C., Singh, P. K., Pavan, W., Sonder, K., Robertson, R., Krupnik, T. J., Erenstein, O., & Asseng, S. (2024). Production vulnerability to wheat blast disease under climate change. *Nature Climate Change*, *14*(2), 178–183. <https://doi.org/10.1038/s41558-023-01902-2>
105. Periyannan, S., Milne, R. J., Figueroa, M., Lagudah, E. S., & Dodds, P. N. (2017). An overview of genetic rust resistance: From broad to specific mechanisms. *PLOS Pathogens*, *13*(7), e1006380. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006380>
106. Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., & Berthelsen, K. (2006). Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *39*(1), 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.01.023>
107. Petit-Houdenot, Y., & Fudal, I. (2017). Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01072>
108. Prasad, P., Savadi, S., Bhardwaj, S. C., & Gupta, P. K. (2020). The progress of leaf rust research in wheat. *Fungal Biology*, *124*(6), 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.013>
109. Qureshi, N., Bariana, H., Kumran, V. V., Muruga, S., Forrest, K. L., Hayden, M. J., & Bansal, U. (2018). A new leaf rust resistance gene Lr79 mapped in chromosome 3BL from the durum wheat landrace Aus26582. *Theoretical and Applied Genetics*, *131*(5), 1091–1098. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3060-3>
110. Radchenko, O. M., Sandetska, N. V., Morgun, B. V., Karellov, A., Kozub, N., Pirko, Y. V., & Blume, Y. B. (2022). Screening of the Bread Wheat Varieties for the Leaf Rust Resistance Gene Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Bdv1. *The Open Agriculture Journal*, *16*(1), e187433152206272. <https://doi.org/10.2174/18743315-v16-e2206272>
111. Ramírez-González, R. H., Borrill, P., Lang, D., Harrington, S. A., Brinton, J., Venturini, L., Davey, M., Jacobs, J., van Ex, F., Pasha, A., Khedikar, Y., Robinson, S. J., Cory, A. T., Florio, T., Concia, L., Juery, C., Schoonbeek, H., Steuernagel, B., Xiang, D., ... Uauy, C. (2018). The transcriptional landscape of polyploid wheat. *Science*, *361*(6403), eaar6089. <https://doi.org/10.1126/science.aar6089>
112. Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, *16*(13), 1616–1626. <https://doi.org/10.1101/gad.1004402>
113. Ren, X., Chen, Z., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, M., Liu, Q., Hong, X., Zhu, J.-K., & Gong, Z. (2010). ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *63*(3), 417–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04248.x>
114. Reynolds, M., Dreccer, F., & Trethowan, R. (2007). Drought-adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. *Journal of Experimental Botany*, *58*(2), 177–186. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl250>

115. Reynolds, M. P., & Braun, H.-J. (2022). Wheat Improvement. W M. P. Reynolds & H.-J. Braun (Red.), *Wheat Improvement* (s. 3–15). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-90673-3_1
116. Risk, J. M., Selter, L. L., Chauhan, H., Krattinger, S. G., Kumlehn, J., Hensel, G., Viccars, L. A., Richardson, T. M., Buesing, G., Troller, A., Lagudah, E. S., & Keller, B. (2013). The wheat Lr34 gene provides resistance against multiple fungal pathogens in barley. *Plant Biotechnology Journal*, *11*(7), 847–854. <https://doi.org/10.1111/pbi.12077>
117. Rodriguez-Moreno, L., Ebert, M. K., Bolton, M. D., & Thomma, B. P. H. J. (2018). Tools of the crook- infection strategies of fungal plant pathogens. *The Plant Journal*, *93*(4), 664–674. <https://doi.org/10.1111/tpj.13810>
118. Roelfs, A. P., Singh, R. P., & Saari, E. E. (1992). *Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. CIMMYT.
119. Rogalska S., Małuszyńska J., Olszewska M. J. 2012. Podstawy cytogenetyki roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 190 – 199.
120. Salgotra, R. K., & Zargar, S. M. (2020a). Potential of Genetic and Genomic Resources for Genetic Improvement of Food Crops. W R. K. Salgotra & S. M. Zargar (Red.), *Rediscovery of Genetic and Genomic Resources for Future Food Security* (s. 1–23). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0156-2_1
121. Salgotra, R. K., & Zargar, S. M. (Red.). (2020b). *Rediscovery of Genetic and Genomic Resources for Future Food Security*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-0156-2>
122. Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, *3*(3), 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
123. 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.pmp.2012.10.006>
124. Shah, T., Xu, J., Zou, X., Cheng, Y., Nasir, M., & Zhang, X. (2018). Omics Approaches for Engineering Wheat Production under Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ijms19082390>
125. Shiferaw, B., Smale, M., Braun, H.-J., Duveiller, E., Reynolds, M., & Muricho, G. (2013). Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Security*, *5*(3), 291–317. <https://doi.org/10.1007/s12571-013-0263-y>
126. Singh, J., Chhabra, B., Raza, A., Yang, S. H., & Sandhu, K. S. (2023). Important wheat diseases in the US and their management in the 21st century. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1010191>
127. Sofi, P. A., Zargar, S. M., Mir, R. A., & Salgotra, R. K. (2020). Role of Gene Banks in Maintaining Crop Genetic Resources. W R. K. Salgotra & S. M. Zargar (Red.), *Rediscovery of Genetic and Genomic Resources for Future Food Security* (s. 211–224). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0156-2_6

128. Spychała J., Tomkowiak A., Noweiska A., Bobrowska R., Rychel-Bielska S., Bocianowski J., Wolko Ł., Kowalczewski P.Ł., Nowicki M., Kwiatek M.T. (2024a) Expression patterns of candidate genes for the *Lr46/Yr29* “slow rust” locus in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and associated miRNAs inform of the gene conferring the *Puccinia triticina* resistance trait. *PLoS ONE* 19(9): e0309944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944>
129. Spychała, J., Tomkowiak, A., Noweiska, A., Bobrowska, R., Bocianowski, J., Sobiech, A., & Kwiatek, M. T. (2024b). Diversity of Expression Patterns of *Lr34*, *Lr67*, and Candidate Genes towards *Lr46* with Analysis of Associated miRNAs in Common Wheat Hybrids in Response to *Puccinia triticina* Fungus. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cimb46060329>
130. Sucher, J., Menardo, F., Praz, C. R., Boni, R., Krattinger, S. G., & Keller, B. (2018). Transcriptional profiling reveals no response of fungal pathogens to the durable, quantitative *Lr34* disease resistance gene of wheat. *Plant Pathology*, 67(4), 792–798. <https://doi.org/10.1111/ppa.12797>
131. Tomkowiak, A., Jędrzejewski, T., Spychała, J., Kuczyński, J., Kwiatek, M. T., Tyczewska, A., Skowrońska, R., & Twardowski, T. (2020). Analysis of miRNA expression associated with the *Lr46* gene responsible for APR resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics*, 61(4), 503–511. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00573-5>
132. Tong, J., Zhao, C., Liu, D., Jambuthenne, D. T., Sun, M., Dinglasan, E., Periyannan, S. K., Hickey, L. T., & Hayes, B. J. (2024). Genome-wide atlas of rust resistance loci in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 137(8), 179. <https://doi.org/10.1007/s00122-024-04689-8>
133. Tyczewska, A., Gracz, J., Kuczyński, J., & Twardowski, T. (2016). Deciphering the soybean molecular stress response via high-throughput approaches. *Acta Biochimica Polonica*, 63(4), 631–643. https://doi.org/10.18388/abp.2016_1340
134. Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol: A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
135. Vikas, V. K., Pradhan, A. K., Budhlakoti, N., Mishra, D. C., Chandra, T., Bhardwaj, S. C., Kumar, S., Sivasamy, M., Jayaprakash, P., Nisha, R., Shajitha, P., Peter, J., Geetha, M., Mir, R. R., Singh, K., & Kumar, S. (2022). Multi-locus genome-wide association studies (ML-GWAS) reveal novel genomic regions associated with seedling and adult plant stage leaf rust resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Heredity*, 128(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41437-022-00525-1>
136. Walkowiak, S., Gao, L., Monat, C., Haberer, G., Kassa, M. T., Brinton, J., Ramirez-Gonzalez, R. H., Kolodziej, M. C., Delorean, E., Thambugala, D., Klymiuk, V., Byrns, B., Gundlach, H., Bandi, V., Siri, J. N., Nilsen, K., Aquino, C., Himmelbach, A., Copetti, D., ... Pozniak, C. J. (2020). Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. *Nature*, 588(7837), 277–283. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2961-x>

137. Wang, C.-T., Ru, J.-N., Liu, Y.-W., Li, M., Zhao, D., Yang, J.-F., Fu, J.-D., & Xu, Z.-S. (2018). Maize WRKY Transcription Factor ZmWRKY106 Confers Drought and Heat Tolerance in Transgenic Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijms19103046>
138. Wenig, M., Ghirardo, A., Sales, J. H., Pabst, E. S., Breitenbach, H. H., Antritter, F., Weber, B., Lange, B., Lenk, M., Cameron, R. K., Schnitzler, J.-P., & Vlot, A. C. (2019). Systemic acquired resistance networks amplify airborne defense cues. *Nature Communications*, *10*(1), 3813. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11798-2>
139. William, M., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Islas, S. O., & Hoisington, D. (2003). Molecular Marker Mapping of Leaf Rust Resistance Gene Lr46 and Its Association with Stripe Rust Resistance Gene Yr29 in Wheat. *Phytopathology*[®], *93*(2), 153–159. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.2.153>
140. Xie, L., Quan, X., Zhang, J., Yang, Y., Sun, R., Xia, M., Xue, B., Wu, C., Han, X., Xue, Y., & Yang, L. (2019). Selection of Reference Genes for Real-time Quantitative PCR Normalization in the Process of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* Infecting Wheat. *The Plant Pathology Journal*, *35*(1), 11–18. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2018.0038>
141. Yadav, I. S., Sharma, A., Kaur, S., Nahar, N., Bhardwaj, S. C., Sharma, T. R., & Chhuneja, P. (2016). Comparative Temporal Transcriptome Profiling of Wheat near Isogenic Line Carrying Lr57 under Compatible and Incompatible Interactions. *Frontiers in Plant Science*, *7*. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2016.01943>
142. Yan, J., Su, P., Meng, X., & Liu, P. (2023). Phylogeny of the plant receptor-like kinase (RLK) gene family and expression analysis of wheat RLK genes in response to biotic and abiotic stresses. *BMC Genomics*, *24*(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09303-7>
143. Zhang, X., Li, K., Xing, R., Liu, S., Chen, X., Yang, H., & Li, P. (2018). miRNA and mRNA Expression Profiles Reveal Insight into Chitosan-Mediated Regulation of Plant Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(15), 3810–3822. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b06081>
144. Zhou, Y., Zhao, X., Li, Y., Xu, J., Bi, A., Kang, L., Xu, D., Chen, H., Wang, Y., Wang, Y., Liu, S., Jiao, C., Lu, H., Wang, J., Yin, C., Jiao, Y., & Lu, F. (2020). Triticum population sequencing provides insights into wheat adaptation. *Nature Genetics*, *52*(12), 1412–1422. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00722-w>
145. Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, *35*(7), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>

11. Wykaz publikacji wchodzących w skład zbioru

**P1. ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION ASSOCIATED WITH
GENE *Lr34* RESPONSIBLE FOR RESISTANCE
MECHANISMS TO WHEAT LEAF RUST**

Agnieszka Tomkowiak, Roksana Bobrowska, Michał Kwiatek, **Julia
Spychała***, Jakub Kuczyński, Agata Tyczewska, Przemysław Łukasz
Kowalczewski, Dorota Weigt i Tomasz Kosiada

Pak. J. Bot., 55(1): 379-385; (2023)

[http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-1\(6\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-1(6))

ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION ASSOCIATED WITH GENE *Lr34* RESPONSIBLE FOR RESISTANCE MECHANISMS TO WHEAT LEAF RUST

AGNIESZKA TOMKOWIAK¹, ROKSANA BOBROWSKA¹, MICHAŁ KWIATEK¹, JULIA SPYCHAŁA^{1*}, JAKUB KUCZYŃSKI², AGATA TYCZEWSKA², PRZEMYSŁAW LUKASZ KOWALCZEWSKI¹, DOROTA WEIGT¹ AND TOMASZ KOSIADA⁴

¹Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd St., 60-632 Poznań, Poland

²Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 12/14 Noskowskiego St., 61-704 Poznań, Poland

³Department of Food Technology of Plant Origin, Poznań University of Life Sciences, 31 Wojska Polskiego St., 60-624 Poznań, Poland

⁴Department of Phytopathology, Seed Science and Technology, Poznań University of Life Sciences, 159 Dąbrowskiego St., 60-594 Poznań, Poland

*Corresponding author's email: julia.spychala@up.poznan.pl

Abstract

Diseases caused by pathogenic fungi significantly limit the yield and quality of common wheat. The most dangerous fungal diseases of wheat include leaf rust, stripe rust and powdery mildew. Cultivating resistant wheat varieties is the most effective way to minimize the development of fungal diseases. Genetically determined resistance of the horizontal type (racially non-specific, adult plant resistance genes) is preferred due to its more persistent expression compared to the major (R) genes determining race-specific resistance, which is often overcome by pathogens. Currently, hexaploid wheat resistance gene *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* (hereafter referred to as *Lr34*) is the best characterized gene determining horizontal-type resistance. The aim of this study was to analyze miRNA expression in selected common wheat varieties, showing the presence of resistance gene *Lr34* in response to infection with the fungus *Puccinia triticina* responsible for leaf rust. The reference varieties (Pavon'S, Myna'S, Frontana'S and Sparrow'S) contained slow rust resistance genes, including *Lr34*, whereas the control variant HN ROD did not have these genes. The presence of *Lr34* in four reference varieties was confirmed using polymerase chain reaction (PCR). Biotic stress in adult plants was induced by inoculating fungal spores under monitored conditions in a growth chamber. Differences in the expression of various microRNAs (miR9653b, miR9657b, miR9773, miR9677b) associated with gene *Lr34* were tested using emulsion PCR (ddPCR). Plant material for analysis was collected before inoculation and 6, 12, 24 and 48 hours after inoculation. The results showed an increase in miR9653b expression in varieties carrying gene *Lr34* as a result of plant infection with *P. triticina*. The ddPCR analysis of miR9657b, miR9773 and miR9677b yielded too low a copy number for correct inference. The expression level of miR9653b in a control variety (HN ROD) lacking this resistance gene remained stable. This demonstrated that miR9653b could be involved in plant resistance mechanisms in response to leaf rust.

Key words: miR9653b; *Triticum aestivum*; *P. triticina*; APR; plant disease.

Introduction

Currently, wheat breeders focus on increasing resistance to stress and pathogens while maintaining high yield and its quality (Malecka *et al.*, 2018). In addition, due to environmental protection and human health safety, the principle of integrated pest management (IPM) by all agricultural producers in the European Union applies from January 1, 2014. IPM mainly involves the use of non-chemical methods of plant protection in pathogen control, thereby minimizing the risk to humans, animals and environmental health (Sawinska *et al.*, 2020, VIDA *et al.*, 2009). One of the general principles of IPM is to prevent the occurrence of harmful organisms or limit their negative impact, which should be achieved, among others, by using resistant or tolerant varieties. To date, over 100 alleles of genes determining leaf rust resistance, about 130 alleles of genes conditioning stripe rust resistance and over 140 alleles of genes responsible for powdery mildew resistance have been identified (McIntosh *et al.*, 2019, Goriewa-Duba *et al.*, 2020, Tomkowiak *et al.*, 2019). In recent years, special attention has been paid to genetic diversity already at the stage of starting materials for plant breeding. Resistance genes have been divided in two groups and the first one includes the so-called "major resistance genes", responsible for the induction of

vertical-type resistance ("gene-for-gene"), also known as "race-specific resistance" (Flor, 1971). These genes provide resistance throughout the plant's growth cycle. Therefore, this type of resistance is often referred to as "seedling resistance". Vertical immunity is only effective against specific physiological races of pathogenic fungi (McCallum *et al.*, 2007). Expression of resistance is only possible when the resistance gene in the plant and the avirulence effector gene (*Avr*) in the pathogen genotype are present simultaneously. Major genes are very popular among growers due to their strong expression and high efficiency in reducing plant diseases. The plant's hypersensitivity response to pathogen infection is a characteristic feature of the expression of these genes (Bolton *et al.*, 2008, Kolmer *et al.*, 2008). Unfortunately, the basic disadvantage of this resistance is that it is subject to a "breakdown" phenomenon resulting from adaptation processes in pathogen populations. It involves a mutation in the *Avr* gene sequence of the pathogen, resulting in the lack of recognition by the major gene of the host plant (Dodds & Rathjen, 2010). Another type of resistance is adult plant resistance (APR). It is a type of quantitative resistance, usually racially-nonspecific, characterized by slow pathogen development and reduced epidemic risk (Krattinger *et al.*, 2011, Ellis *et al.*, 2014). The action of genes slows down the process of infection,

which is directly related to slow rusting of plants (Tiwari *et al.*, 2009; Singh & Huerta-Espino, 1997). Plants with APR genes are more stable under production conditions.

To date, gene *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* (hereafter referred to as *Lr34*) is the best-known gene conditioning horizontal resistance. It is located on wheat chromosome 7DS and the presence of this gene determines adult plant resistance (APR), which effectively inhibits the development of rust diseases at the adult plant stage. Gene *Lr34* is believed to be the source of permanent and non-specific resistance to leaf, streak and stem rust, as well as to powdery mildew (Lagudah *et al.*, 2009). In addition, gene *Lr34* is also used as a model to study the molecular basis of durable resistance (Kumar *et al.*, 2018).

Disease resistance and susceptibility are regulated by a mechanism for rapid recognition of invading pathogens and efficient activation of host plant defense mechanisms. The hypersensitive response (HR) has an essential function in limiting the spread of the pathogen and activating defense mechanisms in the uninfected part of the plant. Plant functions in response to infection are altered at the cellular level through the action of endogenous small non-coding miRNAs (Dutta *et al.*, 2019; Gupta *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016). In recent years, scientists have turned their attention to small non-coding RNAs (miRNAs, siRNAs) that play a significant role in the control of biological processes (Sanz-Carbone *et al.*, 2019; Tyczewska *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2010). They regulate not only the processes of plant growth and development, but also actively participate in plant responses to biotic stress. Studies in plants have indicated the key importance of miRNAs in various regulatory pathways involving almost all biological processes, including plant growth and defense response development to biotic and abiotic stresses (Guleria *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2016). The miRNA molecules bind to complementary gene sequence fragments, thereby inhibiting the translation process (Li *et al.*, 2017). Another regulatory molecules, siRNAs, arise from longer RNA fragments and can affect DNA methylation of target sequences.

This work is a report of miRNA expression analyses in selected varieties of common wheat (*Triticum aestivum* L.) exhibiting the presence of resistance gene *Lr34* in response to infection with the fungus *Puccinia triticina* responsible for leaf rust.

Materials and Methods

Experimental material: The plant material used in the study consisted of 5 common wheat varieties, and the seeds for the study were obtained from the National Small Grains Collection (Agricultural Research Station in Aberdeen, WA, USA). Four of the wheat varieties tested were considered very valuable sources of leaf rust resistance genes and they also carried gene *Lr34* (Pavon'S', Myna'S', Frontana'S' and Sparrow'S'). In addition to gene *Lr34*, they also had gene *Lr46*. The negative control was the variety HN ROD, which did not carry gene *Lr34*.

Experiment under controlled conditions in a growth chamber: The present experiment was conducted in a growth chamber under controlled conditions. The chamber temperature was initially set to 18°C during the day and

16°C during the night. The emission spectrum of the light source with a photon flux of 572 µE was evaluated. After one month, the temperature was raised to 20°C and 17°C during the day and night, respectively. Induction of biotic stress at the adult plant stage was performed by infecting the plants with fungal spores. For each variety, 5 plants were potted in two variants (inoculated and non-inoculated), in triplicate, for a total of 30 pots (5 varieties x 3 replicates x 2 variants). Leaf tissue samples were taken from each pot for molecular analysis before inoculation and 6, 12, 24 and 48 hours after infection. In total, 150 samples [5 varieties x 3 biological replicates x 5 time points (0 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h) x 2 variants (inoculated and non-inoculated)] were collected to examine the expression of miRNAs associated with gene *Lr34*. The material used to inoculate the tested plants was a mixture of 4 isolates of *Puccinia triticina*. Fungus spores were collected from infected field experiments located in various parts of Poland, including Smolice village (52.1000°N 19.0500°E), Strzelce (53.0167°N 16.9667°E), Kobierzycze (50.9667°N 16.9167°E) and Nagradowice (52.4167°N 16.9667°E), where branches of Polish breeding companies are located. Fungi were propagated on a medium consisting of agar, distilled water, growth factors (glucose, peptone) and penicillin (to inhibit the growth of bacteria). Before inoculating the microorganisms, the medium was sterilized in an autoclave and the pH was adjusted to 5.5. The culture was carried out at the temperature of 25°C. The study wheat varieties were artificially inoculated at the adult plant stage by spraying a spore suspension at a concentration of approximately 5x10⁷ spores/mL.

Identification of the *csLV34* marker of gene *Lr34*:

Genomic DNA was extracted from the leaf tissue using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). The quality and concentration of isolated DNA was determined using a DeNovix spectrophotometer. To identify gene *Lr34*, the *csLV34* STS (sequence tagged site) marker was used, which was mapped 0.4 cM from *Lr34*. The *csLV34* marker was used by coworkers in an earlier study (Skowrońska *et al.*, 2019), which confirmed its effectiveness in identifying the presence of this gene. The primer sequences (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were as follows: *csLV34F* – 5'-GTTGGTTAAGACTGGTGATGG-3', *csLV34R* – 5'-TGCTTGCTATTGCTGAATAGT-3' (Lagudah *et al.*, 2006). A 150 bp band indicated the presence of gene *Lr34*, and a 229 bp product was amplified in susceptible genotypes that did not carry this gene, which was consistent with literature data.

PCR was conducted using Labcycler thermal cyclers (SensQuest GmbH, Göttingen, Germany) and the previously described reaction mixture and PCR profile parameters (Tomkowiak *et al.*, 2020). After amplification, PCR products were separated on a 2% agarose gel (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at 100 V for 2.5 h in 1 x TBE buffer (BioShop Canada Inc., Burlington, Canada) with 0.5 µL of Midori Green Direct (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dören, Germany). A DNA size marker (100 bp ladder) was used to evaluate the size of amplification products. The Molecular Imager Gel Doc™ XR UV system with Bio-Rad Bio Image™ software was used to visualize PCR reaction products.

Expression analysis of individual miRNAs linked to gene *Lr34*:

Gene *Lr34* expression analysis was performed according to the method described in detail by Tomkowiak *et al.*, (2020). Briefly, gene *Lr34* sequence was initially searched and compared between Ensembl Plants and NCBI databases, and the following 4 complementary microRNAs were selected based on the sequence of this gene in the psRNATarget database: miR9653b, miR9657b, miR9773 and miR9677b. The miRNA sequences were found in the miRBase database and reverse transcription and ddPCR primers were designed using the retrieved sequences and IDT software (Integrated DNA Technologies). The mirVana™ miRNA Isolation Kit with phenol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to extract RNA fraction that contained miRNAs, the concentration and quality of which were measured spectrophotometrically. Subsequently, extracted RNA was reverse-transcribed using SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A T100 PCR thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) was used to amplify cDNA. The products were quantified in a QX100 droplet reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Data were acquired and analyzed using QuantaSoft™ Software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Results

The *csLV34* STS molecular marker was mapped 0.4 cM from gene *Lr34* (Lagudah *et al.*, 2006). According to the literature, a 150 bp product indicated the presence of this gene, while a 229 bp band should be amplified in susceptible common wheat genotypes. The product indicating the presence of the *csLV34* marker of gene *Lr34* was detected in the varieties Pavon'S', Myna'S', Frontana'S' and Sparrow'S'. A 229 bp product was amplified in the control variety HN ROD, which indicated the absence of the analyzed gene (Fig. 1).

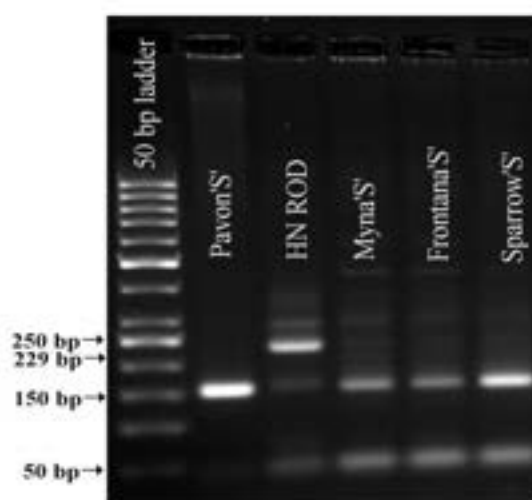


Fig. 1. Electropherogram showing the occurrence of the *csLV34* marker in the varieties of wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare* L.).

The study analyzed the expression of four miRNAs associated with gene *Lr34*. Complementary miRNAs (miR9653b, miR9657b, miR9773 and miR9677b) were selected based on nucleotide sequence analysis of *Lr34* gene using the psRNATarget tool (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>). The quantity of all analyzed miRNAs was assessed using ddPCR. Ultimately, a sufficient number of copies for correct inference and further statistical analysis were obtained only for miR9653b. In the experimental variant without inoculation, miR9653b concentrations in the analyzed varieties in all replications (biological and technical) and time point variants (0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h) did not show significant differences, i.e. miR9653b (complementary to gene *Lr34*) expression was not observed. However, expression of this miRNA was observed in the inoculated variant. The results were averaged and presented in Table 1 as no significant differences in miR9653b concentration were observed between biological and technical replicates. The lack of significant differences between replicates is the result of well-designed reaction conditions. An instance of ddPCR analysis is shown in (Fig. 2).

All the tested varieties, except the control variety HN ROD, responded to *Puccinia triticina* infection (Table 1). The number of miR9653b copies/ μ L before inoculation varied among varieties from 126 (Myna'S') to 216 (Sparrow'S'). A slight increase in miR9653b expression could be observed in all varieties, except Frontana'S', six hours after infestation (Table 1), while a simultaneous reduction in miR9653b copy number from 215 to 201 was recorded. This difference could be due to an increase in gene *Lr34* activity caused by infection. Over time, increased miR9653b expression was observed in all varieties 12, 24 and 48 hours after inoculation, except the HN ROD control. The observed growth rate depended on the variety. Sparrow'S' showed the slowest response to infection, as miR9653b concentration 12 h after inoculation was only 17 copies/ μ L higher than before inoculation. For this cultivar, the breakthrough occurred after 24 h, when a doubling of miR9653b copies/ μ L was recorded (Table 1). This could mean that plants of this variety were able to defend themselves against the pathogen for the longest time. The fastest plant response to infection was recorded for the variety Myna'S', in which miR9653b quantity increased by 61 copies/ μ L 6 h after inoculation, 229 copies/ μ L after 12 h, and 157 copies/ μ L after 24 h. In this case, the genetic resistance mechanism was rapidly blocked by the pathogen. The expression of miR9653b in varieties with gene *Lr34* in comparison to the control variety HN ROD is presented in separate charts (Fig. 3). The graphs clearly indicate that, unlike other varieties carrying gene *Lr34*, we did not observe clear differences in miRNA expression in the control variety HN ROD after plant infection with *Puccinia triticina*.

Table 1. Concentration of miR9653b in the analyzed varieties (tested before infection and 6, 12, 24 and 48 hours after infection in biological and technical replicates) – replicate means.

Analyzed genotypes	miR9653b concentration (copy number/ μ L) – replicate means				
	before infection	6 hours post infection	12 hours post infection	24 hours post infection	48 hours post infection
HN ROD	197	198	200	170	221
Pavon 'S'	165	234	289	393	607
Myna 'S'	126	187	416	573	600
Frontana 'S'	215	201	366	489	719
Sparrow 'S'	216	227	233	515	650

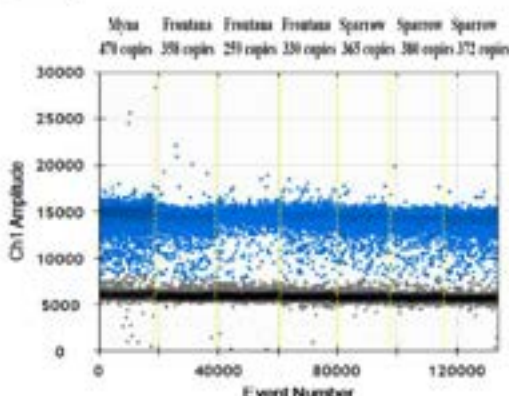


Fig. 2. Example of dIPCR reaction showing miR9653b concentrations (copy numbers/ μ L) for selected cultivars and replicates.

Discussion

Common wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important crop species of great civilization importance. The economic value of this species is determined by many traits, although the most important of them are the size and quality of the yield. Currently, breeders strive to create highyielding varieties that are also resistant to biotic stresses. In recent years, horizontal adult plant resistance (APR) has been preferred in individual varieties because it is mostly racially non-specific, more persistent and reduces the risk of epidemics (Lagudah *et al.*, 2009).

Currently, gene *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* (hereafter referred to as *Lr34*) is the best-known gene conditioning horizontal resistance of wheat varieties. Thus far, gene *Lr34* has been recognized as a source of persistent and racially non-specific resistance to leaf, stripe and stem rust and powdery mildew. Gene *Lr34* has been cloned and its sequence is known (Krattinger *et al.*, 2009). It encodes an ATP-binding transporter (so-called ABC transporter – ATP-binding cassette transporter), a multi-domain membrane protein that uses energy from ATP hydrolysis to translocate substances across the cell membrane in all living organisms. Therefore, gene *Lr34* is present in all hexaploid wheat varieties in several allelic variants. The resistance-conferring allele (*Lr34res*) differs from the commonly present *Lr34sus* allele in three SNP (single nucleotide polymorphism) mutations in intron 4 and exons 11 and 12 of the gene *Lr34* sequence (Krattinger *et al.*, 2009). The specific action of this allele is to increase

resistance to infection regardless of race and type of pathogen. Gene *Lr34* is widely applied in breeding due to its stability and universality (non-specific immunity).

This work confirmed the association of the *csLV34* marker with gene *Lr34* in four reference varieties derived from the GeneBank "National Small Grains Collection" located at the Agricultural Research Station in Aberdeen USA. The varieties have been described as resistant to leaf rust. A 150 bp product indicating the presence of the *csLV34* marker was found in the reference varieties Pavon'S', Myna'S', Frontana'S' and Sparrow'S', while a 229 bp product, indicating the absence of the analyzed gene, was amplified in the control variety HN ROD.

In addition, this gene (*Lr34*) has been shown to provide not only increased resistance to leaf rust, but also to stripe rust (*Yr18*), powdery mildew (*Pm38*) and in certain forms to leaf rust (*Sr57*). The morphological characteristic of the *Lr34res* allele is leaf necrosis conditioned by gene *Ltn1* (leaf-tip necrosis). It probably originated from local Chinese varieties (Kolmer *et al.*, 2008, Krattinger *et al.*, 2009). Gene *Lr34* is present in European varieties, which have varieties Mentana and Ardito in their pedigree, registered at the beginning of the 20th century (Lagudah *et al.*, 2009).

Gene *Lr34* is effective in the adult plant stage and under favorable conditions, i.e., at 4–10°C, at the flag leaf and seedling stage (Risk *et al.*, 2012). Unfortunately, plant resistance conditioned by *Lr34* is less effective at high environmental temperatures (Wellings 2011). Inoculation assays conducted under field conditions on inbred wheat lines (F6) with the *Lr34res* allele indicated 50% infestation with 15% yield reduction compared to control forms, where 100% infestation and 84% yield reduction were observed (Singh & Huerta-Espino 2003).

This study investigated the expression of various miRNAs associated with gene *Lr34* in plant response to *Puccinia triticina* infection. Four miRNAs associated with *Lr34* have been identified: miR9653b, miR9657b, miR9773 and miR9677b. As a result of dIPCR analyses, the highest copy number necessary for correct inference was obtained only for miR9653b. Various authors have previously reported that miRNAs analyzed in this study are involved in the immune response to both biotic and abiotic stress. According to a study of Li *et al.*, (2017), miR9773 demonstrated an important role in wheat response to biotic stress. Although miRNAs are small in size, they play key regulatory roles in many abiotic stress reactions such as soil salinity (Gao *et al.*, 2011), nutrient deficiency (Liang *et al.*, 2015), UV-B radiation (Casadevall *et al.*, 2013), heat (Goswami *et al.*, 2014) or metal stress (Gupta *et al.*, 2014).

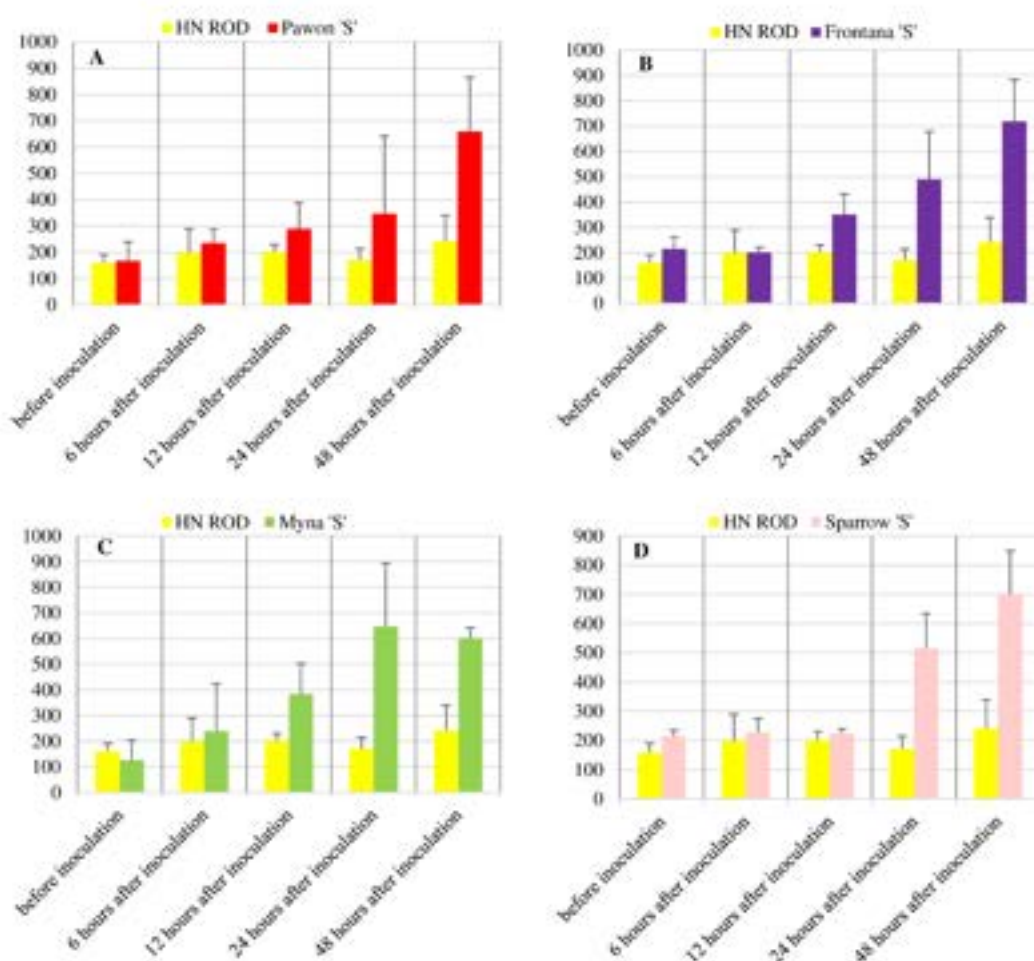


Fig. 3. miR9653b concentration (copy number/ μ L) in the varieties Pavon'S', Myna'S', Frontana'S' and Sparrow'S' compared to HN ROD (control genotype) before and 6, 12, 24 and 48 hours post-infection.

Chu *et al.*, (2016) claimed that miR9657b was associated with a protein kinase belonging to the CDPK family, which was also involved in signal transduction pathways in response to injury and the presence of a pathogen. Many authors (Cheng *et al.*, 2002, Rudd & Franklin-Tong, 2001) have shown in their works that Ca^{2+} acts as an intracellular regulator in many aspects of plant growth and development, as well as in stress response. It is a key messenger that plays an important role in cell signaling. Under the influence of stimuli, spatio-temporal calcium waves are generated with a frequency and amplitude characteristic of the acting stimulus. Such specific increases in the concentration of Ca^{2+} ions in the cytosol, called ' Ca^{2+} signature', are received, interpreted and transferred to effector elements by special types of sensor proteins, such as calmodulin (CaM), calcineurin B-like proteins (CBL) or calcium-dependent kinases (CDPK) containing Ca^{2+} ion-binding structural motifs called EF hand motifs. Recently, *In vivo* activation of

CDPK after Cf-9/Avr9 interaction has been demonstrated in Cf-9 transgenic tobacco plants, suggesting that CDPKs are important calcium-induced sensors in defense responses (Romeis *et al.*, 2000, Romeis *et al.*, 2001).

Kumar *et al.*, (2016) analyzed ten miRNAs responding to leaf rust infection using wheat varieties carrying gene *Lr24* (resistant genotypes) and varieties lacking this gene (susceptible genotypes). The latter authors applied stem-loop qPCR to identify and analyze the expression of individual miRNAs. The expression patterns of individual miRNAs differed, which according to these authors could have indicated their role at different time points after pathogen infection. Maximum expression of two miRNAs, miR119 and miR256, occurred at 48 hpi (hours post-infection) while four miRNAs: miR148, miR181, miR383 and miR441 demonstrated maximum expression at 12 hpi, which decreased with time. On the other hand, three other miRNAs: miR218, miR337 and miR358 showed

maximum expression at 168 hpi, suggesting their late response to leaf rust. As indicated by the researchers, a significant correlation was observed for all the analyzed miRNAs, whose pathogen-induced expression levels were higher in susceptible plants compared to resistant ones, revealing an important role of gene *Lr24*.

Bulut (2016) showed in her work that miR9677 was associated with plant response to drought stress. The latter author tested the expression of various miRNAs in response to drought using qPCR. Her study demonstrated average expression levels of miR395, miR2275 and miR9677, but increased miR166 and miR397 expression during water scarcity. The latter author showed that the expression level of different miRNAs fluctuated depending on the type of tissue exposed to drought stress and stress duration. In the case of leaf tissues, Bulut (2016) observed that the expression of miR156, miR164, miR9673, miR9772 and miR9778 increased due to water deficiency. Similar fluctuations in miRNA expression under different biotic and abiotic stress conditions were also observed by other authors (Pandey *et al.*, 2014, Wu *et al.*, 2014).

Li *et al.*, (2017) examined various miRNAs after wheat exposure to phenanthrene and found that miR9653b expression was down-regulated. Sibisi (2020) analyzed the expression of eleven miRNAs, including miR9653b, using the qPCR method. Expression of miR9653b was up-regulated in a susceptible wheat cultivar after RWASA1 infection (Russian wheat aphid). Unfortunately, knowledge about the role of miR9653b in plant pathogen stress responses is still limited. The present study showed that inoculation of wheat varieties with *P. triticina* spores resulted in altered miR9653b expression in the varieties carrying gene *Lr34*. The concentration of this miRNA varied depending on the variety and time since inoculation. A slight increase in miR9653b expression could be observed in all varieties, except the HN ROD control, 6 hours after infection. These varieties showed an enhanced expression of this miRNA 12, 24 and 48 hours post-infection. The rate of an increase in miR9653b expression depended on the variety. The slowest reaction to infection was observed in the variety 'SparrowS', which could indicate that plants of this variety defended themselves the longest against the pathogen. The fastest plant response to infection was recorded in the variety 'MynaS', where the genetic mechanism of resistance was quickly blocked by the pathogen.

Conclusions

The discovery of miRNAs as particles that specifically modulate proteome composition has unveiled a new level of control over cellular processes. Since miRNAs are endogenous molecules, their expression is regulated by protein transcription factors and epigenetic mechanisms. Transcription factors, involved in cellular signaling pathways responsible for response to environmental influences, can also modify the miRNA pool, and thus the proteome. The current study has indicated that miR9653b may be involved in plant resistance mechanisms to leaf rust caused by *P. triticina*. According to the psRNATarget database, miR9653b is associated with leaf rust resistance conferred by gene *Lr34*, and expression differences induced by fungus infection seem to confirm this

information. These small miRNAs are a key component of the cellular response to stress, in this case biotic stress. They enable the cell to adapt to the external environment or survive its adverse effects.

References

- Bolton, M.D., J.A. Kolmer and D.F. Garvin. 2008. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Mol. Plant Pathol.*, 9 (5): 563-75.
- Bulut, R.F. 2016. Genome-wide microRNA identification in drought tolerant wild emmer wheat: assessment of antimicrobial activity of surface active antimicrobial agent on raw fruit and vegetable packaging. (Doctoral dissertation).
- Casadevall, R., R.E. Rodriguez, J.M. Debernardi, J.F. Palanik and P. Casati. 2013. Repression of growth regulating factors by the microRNA396 inhibits cell proliferation by UV-B radiation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, 25: 3570-3583.
- Cheng, S.H., R.M. Willmann, H. Chen and J. Sheen. 2002. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.*, 129: 469-485.
- Chu, Z., J. Chen, H. Xu, Z. Dong, F. Chen and D. Cui. 2016. Identification comparative analysis of micro RNA in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus derived from mature and immature embryos during in vitro culture. *Front. Plant Sci.*, 7: 1302.
- Dodds, P.N. and J.P. Rathjen. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.*, 11(8): 539-48.
- Dutta, S., S.K. Jha, K.V. Prabhu, M. Kumar and K. Mukhopadhyay. 2019. Leaf rust (*Puccinia triticina*) mediated RNAi in wheat (*Triticum aestivum* L.) prompting host susceptibility. *Fun. & Integ. Genom.*, 19(3): 437-452.
- Ellis, J.G., E.S. Lagudah, W. Spielmeier and P.N. Dodds. 2014. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Front. Plant Sci.*, 5: 641. doi:10.3389/fpls.2014.00641eCollection 2014.
- Fior, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 9: 275-296.
- Gao, P., X. Bai, L. Yang, D. Lv, X. Pan, Y. Li, H. Cai, W. Ji, Q. Chen and Y. Zhu. 2011. Osa-MIR393: a salinity-and alkaline stress-related microRNA gene. *Mol. Biol. Rep.*, 38: 237-242.
- Goriewa-Duba, K., A. Duba, E. Suchowilska and M. Wiwart. 2020. An Analysis of the genetic diversity of bread wheat x spelt breeding lines in terms of their resistance to powdery mildew and leaf rust. *Agronomy*, 10(5): 658.
- Goswami, S., R.R. Kumar and R.D. Rai. 2014. Heat-responsive microRNAs regulate the transcription factors and heat shock proteins in modulating thermo-stability of starch biosynthesis enzymes in wheat (*Triticum aestivum* L.) under the heat stress. *Aust. J. Crop. Sci.*, 8: 697.
- Guleria, P., M. Mahajan, J. Bhardwaj and S.K. Yadav. 2011. Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. *Genom. Proteom. & Bioinform.*, 9(6): 183-199.
- Gupta, O.P., P. Sharma, R.K. Gupta and I. Sharma. 2014. MicroRNA mediated regulation of metal toxicity in plants: Present status and future perspectives. *Plant Mol. Biol.*, 84: 1-18.
- Kolmer, J.A., R.P. Singh, D.F. Garvin, L. Viccars, H.M. William, J. Huerta-Espino, F.C. Ogbonnaya, H. Raman, S. Orford, H.S. Bariana and E.S. Lagudah. 2008. Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Sci.*, 48: 1841-1852.

- Krattinger, S.G., E.S. Lagudah, T. Wicker, J.M. Risk, A.R. Ashton, L.L. Selter, T. Matsumoto and B. Keller. 2011. *Lr34* multi-pathogen resistance ABC transporter: Molecular analysis of homoeologous and orthologous genes in hexaploid wheat and other grass species. *Plant J.*, 65: 392-403.
- Krattinger, S.G., E.S. Lagudah, W. Spielmeier, R.P. Singh, J. Huerta-Espino, H. McFadden, E. Bossolini, L.L. Selter and B. Keller. 2009. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, 323(5919): 1360-1363.
- Kumar, D., S. Dutta, D. Singh, K.V. Prabhu, M. Kumar and K. Mukhopadhyay. 2016. Uncovering leaf rust responsive miRNAs in wheat (*Triticum aestivum* L.) using high-throughput sequencing and prediction of their targets through degradome analysis. *Planta*, 245(1): 161-182.
- Kumar, S., R.P. Singh, A.K. Joshi, M.S. Roder, P. Chhuneja, G.S. Mavi and U. Kumar. 2018. Association of *Lr34* gene complex with spot blotch disease resistance at molecular level in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ind. J. Genet.*, 78(3): 302-308.
- Lagudah, E.S., S.G. Krattinger, S. Herrera-Foessel, R.P. Singh, J. Huerta-Espino, W. Spielmeier, G. Brown-Guedira, L.L. Selter and B. Keller. 2009. Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theor. & Appl. Genetics*, 119(5): 889-898.
- Lagudah, E.S., H. McFadden, R.P. Singh, J. Huerta-Espino, H.S. Bariana and W. Spielmeier. 2006. Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor. & Appl. Genetics*, 114(1): 21-30.
- Li, J., L. Yoe, Y. Shen, Y. Sheng, X. Zhan, G. Xu and B. Xing. 2017. Phenanthrene-responsive microRNAs and their targets in wheat roots. *Chemosphere*, 186: 588-598.
- Liang, G., Q. Ai and D. Yu. 2015. Uncovering miRNAs involved in crosstalk between nutrient deficiencies in *Arabidopsis*. *Sci. Reports*, 5: 11813.
- Malecka, I., A. Blecharczyk, Z. Sawinska, D. Swędrzyńska and T. Pieschota. 2018. Winter wheat yield and soil properties response to long-term non-inversion tillage. *J. Agric. Sci. Technol.*, 17: 1571-1584.
- McCallum, B.D., T. Feuch and J. Chong. 2007. Cereal rust control in Canada. *Aust. J. Agric. Res.*, 58: 639-647.
- McInosh, R.A., J. Dubcovsky, W.J. Rogers, C. Morris and X.C. Xia. 2019. Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement. *Annu. Wheat Newsletter*, vol. 55, p. 256-278.
- Pandey, R., G. Joshi, A.R. Bhardwaj, M. Agarwal and S. Katiyar-Agarwal. 2014. A comprehensive genome-wide study on tissue-specific and abiotic stress-specific miRNAs in *Triticum aestivum*. *PLoS One*, 9(4): e95800.
- Risk, J.M., L.L. Selter, S.G. Krattinger, L.A. Viccars, T.M. Richardson, G. Boesing, G. Herren, E.S. Lagudah and B. Keller. 2012. Functional variability of the *Lr34* durable resistance gene in transgenic wheat. *Plant Biotech. J.*, 10(4): 477-487.
- Romeis, T., A.A. Ludwig, R. Martin and J.D. Jones. 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *E.M.B.O. J.*, 20: 5556-5567.
- Romeis, T., P. Poldras and J.D. Jones. 2000. Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *The Plant Cell*, 12(5): 803-815.
- Rudd, J.J. and V.E. Franklin-Tong. 2001. Unravelling response-specific in Ca²⁺ signalling in plants cell. *New Phytol.*, 151: 7-33.
- Sanz-Carbonell, A., M.C. Marques, A. Bustamante, M.A. Fares, G. Rodrigo and G. Gomez. 2019. Inferring the regulatory network of the miRNA-mediated response to biotic and abiotic stress in melon. *B.M.C. Plant Biol.*, 19(1): 1-17.
- Sawinska, Z., S. Świątek, R. Głowicka-Woloszyn and P.L. Kowalczyński. 2020. Agricultural Practice in Poland Before and After Mandatory IPM Implementation by the European Union. *Sustainability*, 12(3): 1107.
- Sibiś, P.P. 2020. Characterisation of microRNA and selected targets in the wheat defence response against *Diatraea inornata*. (Doctoral dissertation).
- Singh, R.P. and J. Huerta-Espino. 1997. Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on grain yield and agronomic traits of spring wheat. *Crop Sci.*, 37(2): 390-395.
- Singh, R.P. and J. Huerta-Espino. 2003. Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. *Euphytica*, 129(3): 371-76.
- Skowrońska, R., M. Kwiatek, A. Tomkowiak and J. Nawracala. 2019. Development of multiplex PCR to detect slow rust resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *J. Appl. Genet.*, 60(3): 301-304.
- Tiwari, P.R., M.S. Saharan, R. Chitrath, P. Siwach and B. Mishra. 2009. STS marker based tracking of slow rusting *Lr34* gene in Indian wheat genotypes. *Ind. J. Biotechnol.*, 8: 07-213.
- Tomkowiak, A., R. Skowrońska, A. Buda, D. Kurasiak-Popowska, J. Nawracala, P.L. Kowalczyński, M. Plata and D. Radzikowska. 2019. Identification of leaf rust resistance genes in selected wheat cultivars and development of multiplex PCR. *Open Life Sci.*, 14: 327-334.
- Tomkowiak, A., T. Jędrzejewski, J. Szychała, J. Kuczyński, M.T. Kwiatek, A. Tyczeńska, R. Skowrońska and T. Twardowski. 2020. Analysis of miRNA expression associated with the *Lr46* gene responsible for APR resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Appl. Genet.*, 61: 503-511.
- Tyczeńska, A., J. Gracz, J. Kuczyński and T. Twardowski. 2017. Deciphering soybean molecular stress response via high-throughput approach. *Acta Biochim. Pol.*, 63(4): 631-643.
- Vida, G., M. Gül, A. Uhrin, O. Veisz, N.H. Syed, A.J. Flavell, Z. Wang and Z. Bodo. 2009. Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica*, 170: 67-74.
- Wellings, C.R. 2011. Global status of stripe rust: a review of historical and current threats. *Euphytica*, 179(1): 129-41.
- Wu, F., J. Shu and W. Jin. 2014. Identification and validation of miRNAs associated with the resistance of maize (*Zea mays* L.) to *Exserohilum tauricum*. *PLoS One*, 9(1): e87251.
- Yao, Y., Z. Ni, H. Peng, F. Sun, M. Xin, R. Sunkar, J.K. Zhu and Q. Sun. 2010. Non-coding small RNAs responsive to abiotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Fun. Integr. Genomics*, 10: 187-190.

(Received for publication 26 April 2021)

**P2. Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance
Genes *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* in Common Wheat (*Triticum
aestivum* L.) and Associated miRNAs Patterns**

Julia Sychała, Agnieszka Tomkowiak, Aleksandra Noweiska,
Roksana Bobrowska, Jan Bocianowski, Michał Książkiewicz,
Aleksandra Sobiech i Michał Tomasz Kwiatek

Genes,14(7): 1376; (2023)

<https://doi.org/10.3390/genes14071376>

Article

Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance Genes *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Associated miRNAs Patterns

Julia Spychała ¹, Agnieszka Tomkowiak ^{1,*}, Aleksandra Noweńska ¹, Roksana Bobrowska ¹, Jan Bocianowski ², Michał Książkiewicz ³, Aleksandra Sobiech ¹ and Michał Tomasz Kwiatek ¹

¹ Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, 11 Dejad Str., 60-632 Poznań, Poland; julia.spychala@up.poznan.pl (J.S.); aleksandra.nowenska@up.poznan.pl (A.N.); roksana.bobrowska@up.poznan.pl (R.B.); aleksandra.sobiech@up.poznan.pl (A.S.); michal.kwiatek@up.poznan.pl (M.T.K.)

² Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, 28 Wojska Polskiego St., 60-637 Poznań, Poland; jan.bocianowski@up.poznan.pl

³ Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Straszynska 34, 60-479 Poznań, Poland; mks@igp.poznan.pl

* Correspondence: agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl



Citation: Spychała, J.; Tomkowiak, A.; Noweńska, A.; Bobrowska, R.; Bocianowski, J.; Książkiewicz, M.; Sobiech, A.; Kwiatek, M.T. Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance Genes *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Associated miRNAs Patterns. *Genes* **2023**, *14*, 1376. <https://doi.org/10.3390/genes14071376>

Academic Editor: Qinghu Ma

Received: 13 June 2023

Revised: 26 June 2023

Accepted: 27 June 2023

Published: 29 June 2023



Copyright: © 2023 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/>).

Abstract: The main efforts in common wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding focus on yield, grain quality, and resistance to biotic and abiotic stresses. One of the major threats affecting global wheat cultivation and causing significant crop production losses are rust diseases, including leaf rust caused by a biotrophic fungus *Puccinia triticina* Eriks. Genetically determined resistance to leaf rust has been characterized in young plants (seedling resistance) as well as in plants at the adult plant stage. At the seedling stage, resistance is controlled vertically by major R genes, conferring a race-specific response that is highly effective but usually short-lived due to the rapid evolution of potentially virulent fungi. In mature plants, horizontal adult plant resistance (APR) was described, which provides long-term protection against multiple races of pathogens. A better understanding of molecular mechanisms underlying the function of APR genes would enable the development of new strategies for resistance breeding in wheat. Therefore, in the present study we focused on early transcriptomic responses of two major wheat APR genes, *Lr34* and *Lr67*, and three complementary miRNAs, taemir9653b, taemir9773 and taemir9677b, to inoculation with *P. triticina*. Plant material consisted of five wheat reference varieties, Artigas, NP846, Glenlea, Lerma Rojo and TX89D6435, containing the *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* resistance genes. Biotic stress was induced by inoculation with fungal spores under controlled conditions in a phytotron. Plant material consisted of leaf tissue sampled before inoculation as well as 6, 12, 24 and 48 h postinoculation (hpi). The APR gene expression was quantified using real-time PCR with two reference genes, whereas miRNA was quantified using droplet digital PCR. This paper describes the resistance response of APR genes to inoculation with races of leaf rust-causing fungi that occur in central Europe. The study revealed high variability of expression profiles between varieties and time-points, with the prevalence of downregulation for APR genes and upregulation for miRNAs during the development of an early defense response. Nevertheless, despite the downregulation initially observed, the expression of *Lr34* and *Lr67* genes in studied cultivars was significantly higher than in a control line carrying wild (susceptible) alleles.

Keywords: leaf rust; APR resistance; slow rusting; microRNA; RT-qPCR; ddPCR

1. Introduction

Leaf (brown) rust represents one of the world's greatest threats to wheat production. The disease is caused by the pathogenic fungus *Puccinia triticina* Eriks. The appearance of the disease is observed globally, particularly in regions where common wheat is grown

intensively, including Europe, Australia, China and North America [1,2]. The *P. tritricina* fungus is a representative of the order *Pucciniales* (formerly *Uredinales*). All representatives of the order *Pucciniales* are absolute parasitic pathogens of vascular plants with a rather complicated life cycle. In addition to common wheat, the pathogen is capable of infecting other cereals, i.e., rye (*Secale cereale*), barley (*Hordeum vulgare* L.) and triticale (\times *Triticosecale*). Globally, under optimal conditions, the disease can cause a significant yield decrease of up to 40% [3,4]. Infection occurs with the aid of wind, which carries the spores to the host plants. Optimal conditions for the development of infection are between 15 and 20 °C, although disease emergence is also possible in a wider temperature range of 2 to 35 °C. A factor particularly conducive to infection is high humidity. Under favorable environmental conditions, urediniospores emerge 7–10 days after infection [5–7].

The selection of varieties with favorable traits, such as high yield potential and desirable nutritional quality, requires also improved resistance to pathogenic fungi. The understanding of molecular mechanisms underlying plant–pathogen interactions will enable the development of new strategies for resistance breeding in wheat. Genetically determined resistance to leaf rust has been characterized both in young plants (seedling resistance) and in plants at the mature stage. At the seedling stage, resistance is controlled vertically by R major genes, which are frequently broken by coevolving fungal pathogens. In mature rust-resistant plants, horizontal adult plant resistance (APR) is observed, which is characterized by better durability. The occurrence of non-race-specific resistance is often manifested as a *slow rust* effect, which is associated with slower infection development, a longer latency period and the formation of fewer uredinia. APR provides partial but durable resistance to the pathogen [8]. However, most *Lr* genes confer race-specific resistance, consistent with the “gene-for-gene” concept [9]. In total, approximately 80 leaf rust resistance genes have been identified and characterized in bread wheat, durum wheat species and diploid wheat [10]. The distribution of resistance genes in the wheat genome is very dispersed, as *Lr* genes were found on 20 of the 21 chromosome pairs present in a hexaploid wheat. A collection of different enzymatic markers and PCR-based molecular and microsatellite markers have been used to identify these genes [11]. Although many rust resistance genes have been identified, the main problem is short-term effectiveness due to the rapid occurrence of new pathotypes capable of breaking resistance. To date, at least four effective genes have been identified: *Lr34/Yr18/Pm38*, *Lr46/Yr29/Pm39*, *Sr2/Lr27/Yr30* and *Lr67/Yr46/Pm46*, which conferred partial but durable long-term resistance. This type of resistance determines the slow rusting effect and contributes to reducing the rate of disease development. The advantage of using varieties carrying this type of genes in resistance breeding is the pleiotropic effect of their expression, which contributes to an increase in the level of resistance due to intergene interaction and immunization against other wheat diseases such as yellow rust (*Puccinia striiformis* Westend.) and powdery mildew caused by *Blumeria graminis* (DC.) Speer [11]. At present, only APR genes such as *Lr34*, *Lr46* and *Lr67* are significantly exploited in resistance breeding, because they confer consistent and long-lasting resistance to diverse fungal pathotypes found under different climatic and environmental conditions. Recent scientific reports indicate that rust resistance, which results from a combination of genes conferring race-specific resistance and genes that are nonspecific to a particular race of the pathogen, is the more durable and most preferred resistance in cultivated wheat varieties [2,5].

The *Lr34* gene was first described in 1977 in Canada in wheat line PI58548 [12]. Later studies showed that it is also present in many other wheat varieties. Further analysis of the *Lr34* gene revealed its location in the genome, so that it was shown to be located on wheat chromosome 7DS. The *Lr34* gene was first identified in the “Frontana” variety [13]. The *Lr34/Yr18/Pm38* gene complex confers partial resistance to leaf rust, yellow rust and powdery mildew, respectively. In addition, the locus is associated with tolerance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers.) and barley yellow dwarf virus (*BfdV*) [8,14]. The *Lr34* is the most well-studied APR-type gene and is also being used as a model to study the molecular basis of the persistent resistance phenomenon [6,15]. The *Lr34* gene is effective at the adult

plant stage and, under favorable conditions, at the flag leaf stage. *Lr34* gene expression was higher at lower temperatures of 13–17 °C than at 25–30 °C [16,17]. Unfortunately, resistance conditioned by gene *Lr34* is less effective at high temperatures.

The length of the *Lr34* gene is 11,805 base pairs (bp). The *Lr34* gene encodes the membrane protein ABC transporter, consisting of 1401 amino acids (24 exons). The gene has been cloned and two allelic variants have been distinguished in it: susceptible (*Lr34sus*) and resistant (*Lr34res*) [18,19]. These alleles differ in by 3-nucleotide indel resulting in a deletion of phenylalanine (Phe) at position 546 (exon 11) and a single nucleotide polymorphism (SNP) resulting in a tyrosine (Tyr) to histidine (His) substitution at position 634 (exon 12) in the *Lr34Res* protein [20,21]. Moreover, additional A/T SNP polymorphisms were discovered in intron 4 and a 1-nucleotide indel in exon 10 that causes a frameshift [18].

The *Lr67* gene was identified in the common wheat cultivar “PI 250413” and transferred to the cultivar “Thatcher” to produce the line “RL6077”. The *Lr67* gene also shows pleiotropic effects on stem rust and yellow rust, but with a lower effect on leaf rust resistance than *Lr34*. The *Lr67/Yr46/Pm46* gene complex has been mapped to chromosome arm 4DL. The *Lr67* gene encodes a hexose transporter in two allelic variants, with resistant—the *LR67res* protein differing from the susceptible form *LR67sus* by two amino acids, leucine (Leu) and arginine (Arg). Both allelic variants have identical promoter regions. The *Lr67* gene has homeologous genes on common wheat chromosomes 4A and 4B [8,22].

Interestingly, both *Lr34* and *Lr67* genes also induce premature aging of mature leaf tips (leaf tip necrosis) suggesting mechanistic commonality. Consistent with this hypothesis is the lack of additivity of these two resistance genes for adult plants. However, the products of these two genes are different. *Lr34* encodes an ABC transporter protein that is suggested to transport abscisic acid while *Lr67* encodes a hexose transporter protein no longer capable of sugar transport. The manner in which these two genes provide resistance has not yet been fully established; however, a remarkable feature of *Lr34* is its durability having been used in agriculture for many decades without being overcome [8].

Modern breeding technologies and biotechnology strategies are valuable tools to create climate-resilient crops. In addition, to understand plant responses against various abiotic and biotic stresses, research efforts have been undertaken to reveal the genetic basis underlying resistance/tolerance mechanisms [2,23]. Race-specific disease resistance is based on rapid recognition of invading pathogens and effective activation of plant–host defense mechanisms. At the onset of disease, the hypersensitive response (HR) limits the spread of the pathogen and activates defense mechanisms in the uninfected part of the plant. Considerable progress has been made in understanding the signaling process involved in several plant pathogen interactions. However, there is little research on the interaction of fungal pathogens infecting wheat during the early stages of nonrace-specific APR defense response. Upon infection, expression of resistance genes can be also regulated by endogenous small noncoding miRNAs [7]. Plant miRNAs are small molecules of approximately 21 nucleotides that complementary bind to target mRNAs and repress gene expression by targeting the mRNA for degradation or by inhibiting translation. Plant studies have revealed the key role of miRNAs in various regulatory pathways involving almost all biological processes, including auxin signaling, meristem formation, leaf formation, lateral root formation, reproduction, and defense responses to biotic and abiotic stresses [24,25].

The significant role of slow rusting resistance genes *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* in global common wheat breeding contrasts with the relatively limited knowledge of the early stages of APR defense response deployment. Therefore, in the present study, we focused on transcriptomic profiling of these genes and candidate complementary miRNAs in a timeline spanning the first 48 h postinoculation. Five reference wheat varieties (Artigas, NP846, Glenlea, Lerma Rojo and TX89D6435) carrying resistant alleles of studied genes were analyzed. The expression of *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* genes

was quantified using real-time PCR, whereas the level of miRNA was evaluated using droplet digital PCR (ddPCR).

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Leaf Rust Inoculation in Controlled Conditions

Reference common wheat varieties carrying the resistant alleles of *Lr34* and *Lr67* genes were obtained from the National Small Grains Collection of the National Plant Germplasm System (NPGS) of the United States Department of Agriculture—Agricultural Research Service (USDA-ARS), located at the Agriculture Research Station in Aberdeen, Idaho (USA). Four resistant spring varieties: NP846 (PI 322263), Glenlea (Cltr 17272), Artigas (PI 192535), Lerma Rojo (Cltr 13651) and one winter variety TX89D6435 (PI 584759) were selected. The negative control in the experiment was the Artigas* (PI 73046) variety, which has no *Lr* resistance genes. Molecular analysis of the reference varieties using flanking markers confirmed the presence of resistant alleles of *Lr34* and *Lr67* genes. The spores of the fungus were collected from infected field experiments located in different parts of Poland, in localities where branches of Polish breeding companies are located: Smolice 52.1000° N 19.0500° E, Strzelce 53.0167° N 16.9667° E, Koblizyca 50.9667° N 16.9167° E, Nagradowice 52.4167° N 16.9667° E. The inoculation experiment was established under controlled conditions in a phytotron. At the beginning of the experiment the temperature in the phytotron chamber was set at 18 °C and 16 °C during the day and night, respectively. Photoperiod 18 h, humidity in the range of 70–90%. The emission spectrum of a light source with a photon flux of 572 µE. After one month, the temperature was raised to 20 °C during the day and 17 °C at night. Biotic stress was induced at the adult plant stage (60 days from sowing) by spraying whole plants with a spore suspension at a concentration of approx. 5×10^5 spores/mL (with Tween 20 reagent). The infectious material was a mixture of *P. triticina* isolates from different regions of Poland. The mixture was prepared immediately before inoculation. Leaf tissue fragments for molecular analyses were taken immediately before inoculation (0 h) and 6, 12, 24 and 48 h postinoculation (hpi). Three biological replicates per time period and genotype were sampled.

2.2. RNA Isolation and Synthesis of cDNA

Isolation of RNA from wheat leaves was carried out using the Maxwell[®] RSC Plant RNA isolation Kit, according to the protocol provided by the manufacturer. RNA concentration was measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Synthesis of single-stranded cDNA was carried out using 1 µg of isolated RNA and iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The temperature profile of the cDNA synthesis reaction was as follows: priming for 5 min at 25 °C, reverse transcription for 60 min at 46 °C, inactivation of reverse transcriptase for 1 min at 95 °C, cooling to 4 °C and storage at –20 °C.

2.3. Primer Design and Development of Standard Curves for *Lr34* and *Lr67* Genes

Primers for quantitative PCR were designed based on gene sequences (LOC123169079 for *Lr34*, MK425206 for *Lr67*) from the NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, accessed on 14 August 2019) and Ensembl Plants (https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index, accessed on 7 April 2021) databases using the Primer3Plus tool (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, accessed on 1 January 2006). For both *Lr34* and *Lr67* genes three very similar duplicates were identified in common wheat genome (LOC123169079, LOC123087958, LOC123152986 and LOC123092952, LOC123098224, LOC123085159, respectively); therefore, universal primers were designed, amplifying studied genes together with other similar homologs (Table 1). For each primer pair (i.e., each gene), a PCR with gradient of annealing temperature in the range of 50–58 °C was performed to select optimal annealing temperature common for both analyzed genes. The matrix for this PCR was composed as an equalized mixture

of cDNAs, derived from 12, 24 and 48 hpi RNA samples, to increase the likelihood of remarkable expression levels of resistance genes. GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) was used. The composition of the reaction mixture was as follows: PCR buffer—4 μ L, dNTP (10 μ M)—1.6 μ L, nuclease-free water—10.1 μ L, MgCl₂ (25 mM)—1.6 μ L, primers (10 μ M)—0.5 μ L each, polymerase (5 u/ μ L)—0.2 μ L, cDNA mixture—1.5 μ L. PCR profile was as follows: initial denaturation for 2 min at 94 °C, followed by 35 cycles including denaturation for 1 min at 95 °C, annealing of primers for 30 s in temperature gradient of 50–58 °C, extension for 30 s at 72 °C, final extension for 5 min at 72 °C and cooling to 4 °C. PCR products were separated by electrophoresis (10 V/cm) in a 2% agarose gel in Tris EDTA buffer pH 8.0 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with SYBR Safe DNA staining (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and visualized on UV-transilluminator (Uvitec, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As a result of these analyses, optimal annealing temperature for quantitative PCR was selected (53.5 °C). Once the reaction conditions were established, five PCR runs in a volume of 20 μ L each were performed to obtain a volume of 100 μ L of the target amplicons. The amplification temperature profile was as follows: initial denaturation for 2 min at 94 °C, followed by 35 cycles, denaturation for 1 min at 95 °C, annealing of primers for 30 s at 53.5 °C, extension for 30 s at 72 °C and final extension for 5 min at 72 °C. Amplicon purification was carried out using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the protocol provided by the manufacturer. Concentration of purified PCR products was measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). In order to make standard curves, a series of dilutions was prepared for each analyzed gene. Standard curves were developed following previously reported protocol [26].

Table 1. Name and sequence of designed primers based on *Lr34* and *Lr67* sequences gene.

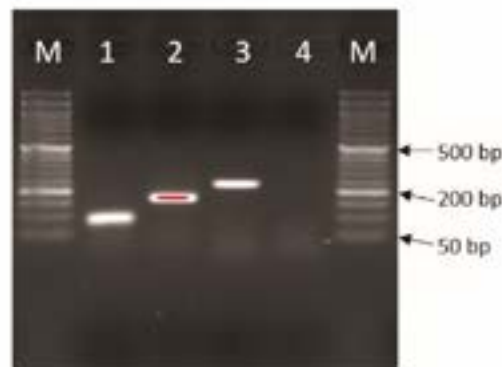
No.	Gene Name	Primer Sequence (5'-3')	Product Size (bp)	Amplification Efficiency (E%)	R ²	T _m (°C)
1.	<i>Lr34</i>	F GGTAGTAGCAGTTGAAGCR CTCTTCTCATTGCCATCCC	110	109.4	0.994	81.0
2.	<i>Lr67</i>	F CGCCATCTTCATCTTCTTCR CTGCTCCACACCTTGTC	118	100	1.000	85.0

2.4. Selection of Reference Genes for Quantitative PCR

Results of quantitative PCR are usually referred to the reference genes that are expected to have stable expression profile in a specific experimental setup. Based on the literature data, four common wheat genes were selected (Table 2) as candidate references: *TUB β* (β -Tubulin, U76897), *ARF* (ADP-ribosylation factor, AB050957), *RLI* (Rnase L inhibitor-like protein, AK331207.1) and *EF2-1* (Elongation factor, XM_009218808) [27,28]. They were tested by performing PCR amplification on cDNA pooled array (samples collected at 12, 24 and 48 hpi), followed by electrophoresis (10 V/cm) in a 2% agarose gel (Figure 1, Table 2). At this stage, nonspecific products were obtained for the *RLI* gene after real-time PCR reactions, which was the cause of discarding the reference gene. The occurrence of nonspecific products was observed by analyzing melting curves. For the remaining candidate reference genes, a standard curve was developed using the same approach as for *Lr34* and *Lr67* genes (except for primer annealing temperature: 60 °C instead of 53.5 °C). After analysis of standard curves, two genes with the highest efficiency values and R² > 0.98, *TUB β* and *ARF*, were selected as references for quantitative PCR (Table 2).

Table 2. Primer sequences for selected reference genes.

Gene Name	Gene Function/Product	Primer Sequence (5'-3')	qPCR Efficiency (%)	R ²	T _m (°C)	Size Product (bp)
<i>TUBβ</i>	β-Tubulin	F:CAAGGAGGTGGACGACAGATGR GACTTGACCGTGTGGGGATCCA	101.1	0.998	82.0	84
<i>ARF</i>	ADP-ribosylation factor	F:GCTCTCCAACAACATGGCCAACR GCTTCGCTGTACATAAGC	93.5	0.999	82.0	165
<i>RLI</i>	RNase L inhibitor-like protein	F:GGAFTCAGAGCCAGCGATGFTGR AGTTGATCGGGTCTCTCAAASG	-	-	-	242
<i>EF2-1</i>	Elongation factor	F:CATCAAGCCGATGCTTCGCR GGTCGACCGTGTCTCCAT	100.4	0.997	80.5	90

**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis showing amplification results for reference genes: 1—*TUBβ*, 2—*ARF*, 3—*RLI*, 4—*EF2-1*, M—size marker; 50 bp DNA Ladder (NIPPON Genetics EUROPE GmbH).

2.5. Quantitative (Real-Time) PCR

Expression analysis using real-time PCR was performed in 96-well plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) using iTaq Universal SYBR Green Supermix and CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The composition of the qPCR reaction mixture was as follows: Supermix—5 μ L, “forward” and “reverse” primers (10 μ M)—0.5 μ L each, nuclease-free water—3 μ L and cDNA template—1 μ L. In accordance with current MIQE recommendations for the validity of real-time PCR analyses, for every genotype/time points three biological replicates were used, and three technical replicates were prepared for each [29]. The qPCR reactions were performed with NTC (no template control), representing the reaction mixture itself, and with inter-run calibration sample (*ARF*), both were applied in three technical replicates. The following temperature profile was used for quantitative PCR: initial denaturation for 3 min at 95 °C; then, 40 cycles: denaturation for 10 s at 95 °C and annealing of primers for 30 s at 53.5 °C (*Lr34* and *Lr67* genes) or 60 °C (*TUBβ* and *ARF*) with fluorescence measurement. High resolution DNA melting was performed after PCR to control the specificity of amplification: melting temperature range 65–90 °C; every 5 s the temperature was increased by 0.5 °C and fluorescence measurement was taken. Calculations of $\Delta\Delta C_q$ included both reference genes using CFX Maestro (Bio-Rad).

2.6. Expression Analysis of miRNAs Using Droplet Digital PCR

In this study, the expression of three miRNAs (*tae-miR9653b*, *tae-miR9773*, *tae-miR9677b*) related to the *Lr34* was analyzed. Available databases for common wheat and literature data did not show miRNA molecules complementary to the *Lr67* gene. The coding sequence of the *Lr34* gene (*TraesCS7D02G080300.1*) was downloaded from the Ensembl.

Plants database for common wheat (https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index, accessed on 7 April 2021) was analyzed in the psRNAtarget database (<http://plantgrn.noble.org/psRNAtarget/>, accessed on 1 January 2017). The “Submit Target Candidates” option was selected, which allowed analysis of the selected sequence and searching for related miRNAs. The sequences of the three miRNAs analyzed were found in the miRBase database (<https://www.mirbase.org/>, accessed on 5 June 2009) and, using the Integrated DNA Technologies (IDT) website (<https://eu.idtdna.com/pages>, accessed on 15 June 2012), stem-loop primers were designed for miRNA reverse transcription and ddPCR reactions according to the protocol [30,31]. The primer sequences intended for both reactions are shown in the listing (Tables 3 and 4). The species *Triticum aestivum* was selected and the names of the selected miRNAs were searched. A mature sequence was required to design primers for complementary miRNAs, so the “Mature sequence” function was selected. The mirVana™ miRNA Isolation Kit with phenol (Thermo Fisher Scientific) was used to extract the RNA fraction containing miRNA, whereas the concentration and quality of isolates were measured spectrophotometrically using NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). The concentration and quality of the isolated RNA was checked using a spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, DE, USA) at 260 nm. A fixed amount of isolated RNA (1 µg sRNA and 1.5 µg total RNA) was reverse transcribed using SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), stem-loop primers and the following protocol: incubate for 30 min at 16 °C; 60 cycles at 30 °C for 30 s, 42 °C for 30 s and 50 °C for 1 s; and incubation at 85 °C for 5 min. To quantify the number of miRNA molecules in plant samples, a ddPCR mixture composed of 10 µL of ddPCR Super Mix Eva Green (Bio-Rad), primers (to reach final concentration of each primer 200 nM), template (reverse transcribed, elongated miRNA) and RNase-free H₂O was used. A 20 µL reaction mixture was used to generate droplets in an 8-well cartridge placed in a QX100 droplet generator (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The droplets were carefully transferred to a 96-well ddPCR plate and heat-sealed with foil (Bio-Rad). Then, cDNA was amplified in a T100 PCR thermal cycler (Bio-Rad) under the following cycling conditions: 5 min denaturation at 95 °C, followed by 40 cycles with a three-step thermal profile of 30 s denaturation at 95 °C, 30 s annealing at 58 °C and 45 s extension at 72 °C. Subsequently, the products were kept at 72 °C for 2 min for the final extension. After amplification, the products were cooled to 4 °C for 5 min, then heated to 90 °C for 5 min and finally cooled again to 12 °C. The droplets were quantified in a QX100 droplet reader (Bio-Rad). Data acquisition and analysis were performed using QuantaSoft software (Bio-Rad). Positive droplets containing amplification products were distinguished from negative droplets by setting the fluorescence amplitude threshold to the lowest value in the positive droplet cluster.

Table 3. Stem-loop primer sequences designed for miRNA reverse transcription reactions and universal primers.

Gene	No.	Primer Name	Stem-Loop Primers Sequence (5'-3')
<i>Lr34</i>	1.	RT miR9653b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCCTC
	2.	RT miR9773	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTCA
	3.	RT miR9677b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCCAC
Reference gene	4.	Scrabled short RNA (SCR)	AUAGGCCAUAAAGGAGUCUCGGUACGUCULGU/AUG
	5.	SCR-Forward RT	ATAGGCCATAAGGAGTCTCGGTACGTCT

Table 4. Primers designed for ddPCR reactions to analyze miRNAs expression.

Gene	No.	Primer Name	Primers Sequence (5'-3')
<i>Lr34</i>	1.	miR9653b F	ACGCAGTGGCCAAGGTCTCTT
	2.	miR9773 F	GGCGCGGTTTGTTTTATGTTATT
	3.	miR9677b F	ACTCATCAGCCCGGGGAACAG
	4.	Universal R	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

2.7. Preparation of *Lr34* and *Lr67* Amplicons for Sanger Sequencing

Sanger sequencing was performed to confirm that the desired amplicons were obtained for the *Lr34* and *Lr67* genes and to characterize the differences between the resistant genotypes and the susceptible genotype (Artigas* variety). For the *Lr34* and *Lr67* genes, 5 PCR reactions were performed for the corresponding primer pairs. The composition of the reaction mixture was as follows: nuclease-free H₂O—10.1 µL; buffer—4 µL; dNTP (10 µM)—1.6 µL; MgCl₂ (25 mM)—1.6 µL; primer F (10 µM)—0.5 µL; primer R (10 µM)—0.5 µL; polymerase (5 u/µL)—0.2 µL; and template—1.5 µL. GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase reagents from Promega were used to prepare the PCR reaction. The following amplification temperature profile was used: initial denaturation for 2 min at 94 °C; followed by 35 cycles: denaturation for 1 min at 95 °C, primer annealing for 30 s at 60 °C, extension for 30 s at 72 °C; final extension for 5 min at 72 °C and cooling to 4 °C. Purification of the amplicons was performed using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), according to the protocol provided by the manufacturer. After purification, the samples were resuspended in Elution Buffer in a volume of 30 µL. Sanger sequencing was performed by Genomed (Warsaw, Poland). Obtained results were processed using Geneious software.

2.8. Statistical Analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was used to test the null hypothesis that a set of normalized expression data for a particular gene and line comes from a normal distribution. This test was passed for all gene × genotype combinations except *Lr34* in TX89D6435 and *tae-miR9773* in NP846 (*p*-values 0.028 and 0.023, respectively). To assess the equality of variances, Brown–Forsythe variant of Levene’s test was calculated (passed for all tested time point × gene × genotype combinations). For comparison of means, a two-tailed *t*-Student was performed. The following comparisons were performed for *Lr34* and *Lr67* genes and studied miRNAs: (i) expression in each examined time point after inoculation vs. expression before inoculation and (ii) expression in each examined time point vs. expression in a correlated time point in Artigas line carrying susceptible allele. To test stability of reference genes, the following comparisons were performed: cycle threshold (cT) value in each time point after inoculation vs. cT value before inoculation (Supplementary Table S3). This test revealed significant increase in reference cT values in some comparisons, mostly at the beginning of experiment or in the middle time points, that could eventually result in increase in calculated expression of studied genes. However, in all those cases, expression of studied genes was not significantly increased; therefore, observed transient instability of reference genes did not contribute to false positives. For visualization of gene expression results, cluster analysis (UPGMA method) with the Euclidean distances was performed.

3. Results

3.1. Expression of Gene *Lr34* and *Lr67* Genes in Analyzed Varieties at Different Time Points

The response of the *Lr34* gene to inoculation with *P. tritici* was analyzed in four spring (NP846, Glenlea, Artigas, Lerma Rojo) and one winter (TX89D6435) common wheat varieties at five time points (0, 6, 12, 24 and 48 hpi). All varieties except Glenlea revealed a decrease in *Lr34* expression levels immediately after inoculation (6 hpi) (Figure 2). The Glenlea variety also responded in the same way but with a slight delay (12 hpi). Meanwhile, at that time point Artigas and NP486 responded with a further decrease in *Lr34* expression. After 24 h, an increase in *Lr34* expression occurred in all varieties except for TX89D6435, reaching in Glenlea and Lerma Rojo levels similar to that before inoculation. Studied cultivars significantly differed in *Lr34* expression at 48 hpi: in Glenlea and Artigas it reached the maximum values, whereas in the other cultivars it reached the minimum (TX89D6435 and NP846) or very close to the minimum (Lerma Rojo). Observed differences in expression profiles did not follow differences in plant phenology (spring vs. winter). It should be noted that despite significant repression after inoculation, *Lr34* expression did not drop below the level observed in the Artigas* variety (having a susceptibility allele) in

all tested time point \times genotype combinations except for 6 hpi Lerma Rojo. It appears that the *Lr34* gene is expressed at a relatively high level regardless of inoculation, while after inoculation there is a rapid decrease in expression (realized within 6–12 h). In two lines, this decrease was transient. In Glenlea, Lerma Rojo and NP846, the decrease in expression was statistically significant (p -value 0.013–0.048). The lack of statistical support for Artigas and TX89D6435 results from a high variance between biological replicates.

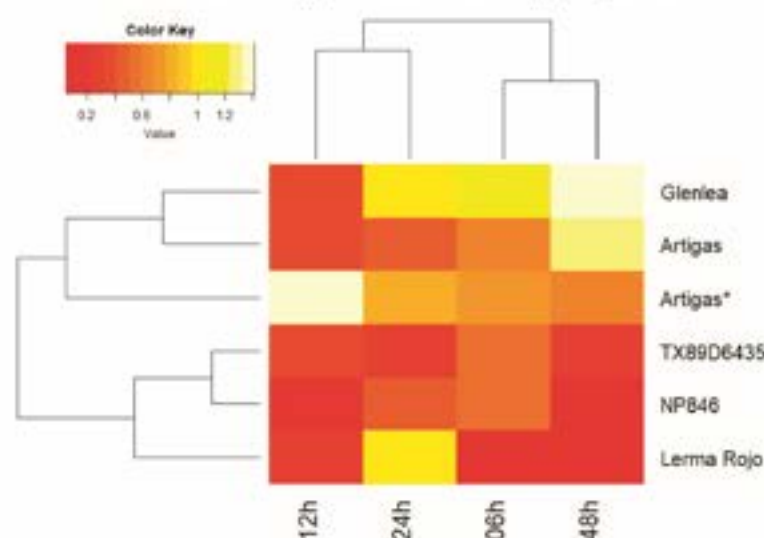


Figure 2. The heatmap diagram shows the expression profiles of the *Lr34* gene obtained using quantitative real-time PCR analysis. The assay included reference varieties of common wheat (Glenlea, Artigas, Artigas*, TX89D6435, NP846 and Lerma Rojo) at four time points (6, 12, 24 and 48 hpi). Red indicates lower relative expression and yellow indicates higher expression.

The *Lr67* gene, as compared to the *Lr34*, showed a partially different expression pattern also shown by the analysis of variance (Figure 3). In the case of the Artigas, NP846 and TX89D6435 varieties, the expression of the *Lr67* gene decreased immediately after inoculation (6 and 12 hpi) and began to increase after 24 h. In the case of the Lerma Rojo variety, *Lr67* gene expression decreased after inoculation and fluctuated thereafter, while in the Glenlea variety, *Lr67* expression first increased (6 hpi) and then decreased reaching a minimum at 24 hpi, followed by another increase at 48 hpi. The *Lr67* gene in Artigas and Glenlea varieties revealed a similar response to stress like the *Lr34* gene, surpassing in at least one time point after inoculation the level observed in control plants. In the Artigas* line, carrying a susceptible *Lr67* allele, changes in expression levels relative to the first term were not statistically significant. This would imply that only the functional copy of the gene is regulated. Both tested genes are transporters, and as such may have a remarkable effect on the phenotype in terms of the level of accumulation and secretion of the compounds they transport. Interestingly, both genes showed a similar response to inoculation; the correlation between them was 0.675 and that value is statistically significant (p -value = 0.0003). On the other hand, considering the difference in expression levels relative to the first term in each line (response to inoculation), those differences were statistically significant for both genes and for the Glenlea, Lerma Rojo, NP846 and TX89D6435 lines, but only for selected time points and only in the direction of a decrease in expression (Supplementary Table S1).

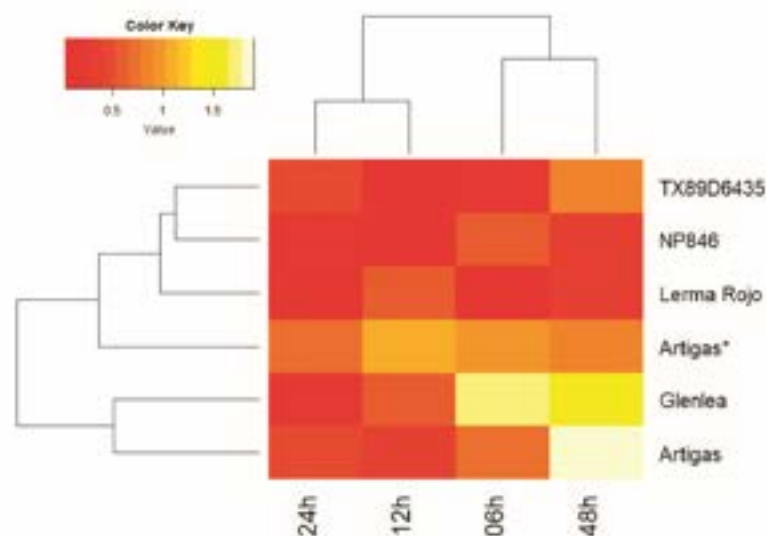


Figure 3. The heatmap diagram shows the expression profiles of the *Lr67* gene obtained using quantitative real-time PCR analysis. The assay included reference varieties of common wheat (TX89D6435, NP846, Lerma Rojo, Artigas*, Glenlea and Artigas) at four time points (6, 12, 24 and 48 hpi). Red indicates lower relative expression and yellow indicates higher gene expression.

3.2. Sanger Sequencing Results

During quantitative PCR analysis of *Lr34* gene expression on the template, differences in melting temperatures (T_m) were observed between resistant and susceptible varieties (Artigas*), suggesting putative differences in the sequence of the obtained amplicons. Similar observations were made for the *Lr67* gene. Sanger sequencing was performed to verify if there is any polymorphism. The sequence of the *Lr34* gene was confirmed to be complementary to the region 141,646–141,853 bp on reverse-complement reference *Lr34* locus sequence FJ436983.1, spanning exons 7 and 8, 967 bp upstream of the TTC insertion that differentiate resistant and susceptible accessions. The resulting product was identical to the reference sequence with several heterozygous nucleotide positions. The alternative nucleotides present at heterozygous positions which correspond to homologs localized in chromosomes 4A and 7A. For the *Lr67* gene, a PCR product was aligned to the region localized at 1350–1467 bp on reference *Lr67* locus sequence MK425206.1 in 3rd exon, 191 bp downstream of the 1159T/G (Leu387/Val) substitution distinguishing between resistant and susceptible accessions. One heterozygous nucleotide was identified (25C/G), corresponding to homologs present in 4A and 4B chromosomes. Sequences of both PCR products were provided in Supplementary Table S2.

3.3. Expression Profiles of miRNAs Associated with the *Lr34* Gene

Analysis of miRNA molecules using ddPCR revealed a potential downregulatory link between *tae-miR9653b* and *Lr34* gene expression in Artigas and Glenlea cultivars (Table 5). In the Artigas variety, an increase of *tae-miR9653b* copy number immediately after inoculation (6 hpi) was observed, putatively corresponding to a decrease in *Lr34* gene expression. Systematic decline of *tae-miR9653b* copy number that occurred in further time points correlates with an increase in *Lr34* gene expression observed in that variety. A similar scenario was also revealed in Glenlea. These results indicate that *tae-miR9653b* may control the degradation of *Lr34* gene transcripts in these two cultivars. Interestingly, the Artigas cultivar revealed the induction of all three studied miRNAs in response to

inoculation; however, these changes were only statistically significant in all time points for *tae-miR9653b*. The comparative data are shown as a heatmap plot for *tae-miR9653b* expression (Figure 4).

Table 5. Copy number of *tae-miR9653b* corresponding to its expression level in the analyzed varieties; tested before inoculation and after 6, 12, 24 and 48 hpi in biological and technical replicates (average value for all replicates).

Common Wheat Varieties	<i>tae-miR9653b</i> Concentration (Number of Copies/ μ L)				
	0 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi	48 hpi
Artigas	375	1474	1067	998	900
Glenlea	576	737	1117	845	886
Lerma Rojo	1226	806	852	632	926
NP846	712	821	738	410	1182
TX89D6435	1278	2117	1475	1911	2292

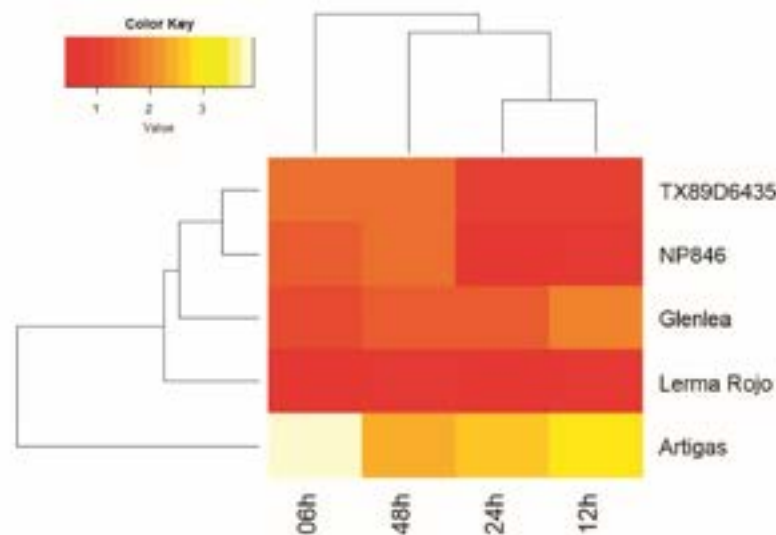


Figure 4. The heatmap shows the expression profiles of *tae-miR9653b* molecules. The red color indicates downregulation, and yellow indicates upregulation. The assay included reference varieties of common wheat (TX89D6435, NP846, Glenlea, Lerma Rojo and Artigas) at four time points (6, 12, 24 and 48 hpi).

4. Discussion

Recent insight into the scientific progress in deciphering of molecular mechanisms underlying wheat resistance to leaf rust led to the conclusion that further search for diverse and durable resistance to leaf rust should harness advanced tools and techniques [2]. Understanding the molecular basis of defense response will allow the development of new strategies for rust resistance in wheat. Even in the presented study, the well-established *Lr34* and *Lr67* genes showed differences in expression profiles between cultivars, despite the presence of the same resistant alleles. It may indicate that there is some variability between studied lines in regulatory pathways acting upstream of these genes. In one of the most recent papers [32], researchers conducted an expression analysis using qRT-PCR after running the *Lr67* transgene into barley to analyze the resistance response of seedlings and adult plants to infection by the leaf rust pathogen. Seedling resistance to the barley-specific

diseases *P. hordei* and *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* was seen in stable transgenic *Lr67res* barley lines at 24 h postinoculation (hpi). *Lr67res* was two to three times more induced in the *Lr67res* lines following the inoculation of barley plants with *Puccinia hordei*. At 72 hpi, *Lr67res* expression returned to basal levels, and controls did not exhibit induction. Moreover, higher expression of pathogenesis-related (PR) genes and early senescence were both seen in barley plants harboring *Lr67res*.

Genetic expression regulation is one of the factors that determine a plant's susceptibility or resistance. Nevertheless, it should be noted that such proteins such as ABC transporters may be regulated by multiple signaling pathways and response in different way to different pathogens, including transient downregulation [33]. In our experiments, we revealed that the resistance response of *Lr34* gene in Glenlea and Artigas cultivars to inoculation with *P. tritricina* resembled expected scenario for an active antifungal component, i.e., increase of expression after colonization of plant tissue by the fungus. In the work of Bolton et al. (2008), *Lr34* gene expression was analyzed in response to *P. tritricina* infection of wheat, and according to the authors, the *Lr34* gene slows disease development, but does not stop pathogen growth [34]. Its resistance phenotype resembles basal plant immunity resulting from recognition of a generic fungal elicitor or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Leaf tissue was collected at two time points: 3 and 7 days (days postinoculation). The above test was conducted on lines containing *Lr34res*, which showed the induction of several PR genes (pathogenesis-related). *TcLr34* leaves taken at 3 dpi were examined and found significant upregulation of PR-1, PR-2 and PR-3 after infection. This response at the metabolic level of the plant did not persist for 7 dpi; this may explain why the *Lr34* gene is characterized by slowing down the pathogen rather than inhibiting disease development. Researchers' studies indicate that *Lr34*-induced resistance imposes a high energy demand, which leads to the induction of multiple metabolic reactions to support cellular energy requirements. An abscisic acid (ABA) has been proposed as a candidate molecule that contributes to *Lr34res*-mediated disease resistance [35]. Indeed, the expression of *Lr34* in transgenic barley provides resistance to leaf rust and leads to the accumulation of ABA at the leaf tip and the development of leaf tip necrosis [36,37]. Therefore, upregulation of the *Lr34* gene after infection should be expected as a defense response mechanism.

Recent work [38] has described the interactions of these two APR genes with other *Lr* resistance genes. The researchers compared the effects of *Lr34* and *Lr67* alone, as well as in combination with *Lr13*, *Lr16* or *Lr32*. The *Lr67* and *Lr34* genes significantly reduced the level of severity of rust disease, *Lr34* showed a significant interaction with *Lr13* unlike *Lr67*. Both genes interacted with *Lr16*, and *Lr67* had a significant interaction with *Lr32*. This analysis demonstrates a similar effect of the *Lr67* gene, as observed for *Lr34*, to interact with other resistance genes to achieve better levels of resistance than single resistance genes. The researchers suggest that although *Lr67* is not widely used in agriculture, it may play an important role in disease resistance in future wheat varieties.

In the present study, the expression of candidate miRNA molecules (*tae-miR9653b*, *tae-miR9773* and *tae-miR9677b*) that could be hypothetically associated with the *Lr34* resistance gene when the plant response to leaf rust disease was analyzed. One of these genes, *tae-miR9653b*, revealed an expression profile supporting the hypothesis of *Lr34* miRNA dependent decay. Moreover, we conducted preliminary studies with analysis of complementary miRNAs to the *Lr34* and *Lr46* gene [39,40]. Previous studies have already reported that the miRNAs analyzed in this study may be involved in the immune response to both biotic and abiotic stresses. According to studies, *tae-miR9773* plays an important role in the biotic stress response in wheat [41]. Kumar et al. (2017) in their work analyzed ten miRNA molecules responsive to leaf rust disease using wheat varieties with the *Lr24* resistance gene (resistant) and varieties lacking the *Lr24* resistance gene (susceptible) [42]. The researchers used stem-loop RT-qPCR to identify and analyze their expression. The researchers reported that the results of their analysis showed differential expression patterns of each miRNA, which may indicate their differential role at different time points after

pathogen infection. The maximum expression of two miRNAs, TamiR119 and TamiR256, occurred at 48 hpi while four, TamiR148, TamiR181, TamiR383 and TamiR441, showed a maximum expression at 12 hpi. In contrast, three more miRNA molecules (TamiR218, TamiR337 and TamiR358) showed a maximum expression at 168 hpi, which may indicate their late immune response to leaf rust. As the researchers have pointed out, a significant correlation was observed for all the analyzed miRNA molecules, whose pathogen-induced expression levels were higher in susceptible plants compared to resistant plants, which may indicate an important role for the *Lr24* gene [32]. Li et al. (2017) examined various miRNAs after exposing wheat to phenanthrene, including miR9653b, whose expression was downregulated [41]. In a study on drought stress in common wheat [43], authors considered the role of miRNA molecules on the drought response. The only miRNA suppressed by drought in the drought-tolerant variety was miR9653 (including miR9653a and miR9653b members). In contrast, in the more sensitive wheat variety, the abundance of miR9653b was increased by stress, while the number of miR9653a was unchanged. Unfortunately, there is still limited knowledge about the role of miR9653b in plant pathogen stress responses albeit it was shown that it is positively responsive to *Fusarium graminearum* infection in common wheat lines carrying the 2DL FHB resistance locus [44].

5. Conclusions

The presented study showed that the expression of *Lr34* and *Lr67* genes varied at selected time points. After the inoculation, there was a decrease in the level of gene expression in most lines, and then an increase to the level before was observed. The immune system responded most effectively in the Glenlea and Artigas varieties, as 48 h after infection the expression levels of both genes exceeded their baseline expression levels. Based on this study, in the case of the *Lr34* gene, the activation of the immune system in all analyzed varieties was recorded 24 h after inoculation. On the other hand, the *Lr67* gene showed differential expressions within varieties, as shown by the analysis of variance. Finally, the Artigas and Glenlea varieties responded most strongly to stress, as the expression level of the *Lr67* gene 48 h postinoculation, like that of the *Lr34* gene, exceeded the preinoculation baseline. The results indicate that *Lr34* gene expression may be blocked by *tae-miR9653b* complementary to its sequence in Artigas and Glenlea cultivars. For these two varieties, the expression level of *Lr34* was negatively correlated with the microRNA level of *tae-miR9653b*, which hypothetically may indicate downregulation. Similar relationships were observed for NP846 and TX89D6435 varieties at almost all time points. These relationships also coincided at some time points for Glenlea (12 hpi and 24 hpi) and Lerma Rojo (24 hpi and 48 hpi) cultivars.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes14071376/s1>, Table S1: Changes in expression levels postinoculation (i.e., relative to the first term) for the *Lr34* and *Lr67* genes; Table S2: PCR product sequences for *Lr34* and *Lr67* genes; Table S3: Change in expression levels after inoculation (i.e., relative to the first term) for reference genes *TUBB1* and *ARF*.

Author Contributions: Conceptualization, A.T. and M.T.K.; data curation, J.S.; formal analysis, J.S. and A.T.; investigation, J.S. and A.T.; methodology, J.S. and A.T.; supervision, A.T.; visualization, J.B.; writing—original draft, J.S. and M.K.; writing—review and editing, A.T., J.S., A.N., R.B. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of 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.” (DHR.hm.802.11.2022); Project leader: M.T. Kwiatek. This publication was financed by the framework of the Ministry of Science and Higher Education program as “Regional Initiative Excellence” in years 2019–2023, project No. 005/RID/2018/19, financing amount 12,000,000.00 PLN.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

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

References

- Akhtar-Uz-Zaman, M.; Tubhina-Khatun, M.; Hanafi, M.M.; Sabehi, M. Genetic Analysis of Rust Resistance Genes in Global Wheat Cultivars: An Overview. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2017**, *31*, 431–445. [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]
- Chai, Y.; Parsley, P.G.; Hurley, T.M.; Senay, S.D.; Beddow, J.M. A Probabilistic Bio-Economic Assessment of the Global Consequences of Wheat Leaf Rust. *Phytopathology* **2020**, *110*, 1886–1896. [CrossRef] [PubMed]
- Yahya, M.; Saeed, N.A.; Nadeem, S.; Hamed, M.; Saleem, K. Effect of Leaf Rust Disease on Photosynthetic Rate, Chlorophyll Contents and Grain Yield of Wheat. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2020**, *53*, 425–439. [CrossRef]
- Dinh, H.X.; Singh, D.; Periyannan, S.; Park, R.F.; Pourkheirandish, M. Molecular Genetics of Leaf Rust Resistance in Wheat and Barley. *Theor. Appl. Genet.* **2020**, *133*, 2035–2050. [CrossRef]
- Ellis, J.G.; Lagudah, E.S.; Spielmeier, W.; Dodds, P.N. The Past, Present and Future of Breeding Rust Resistant Wheat. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 641. [CrossRef]
- Gupta, O.P.; Permat, V.; Koundal, V.; Singh, U.D.; Praveen, S. MicroRNA Regulated Defense Responses in *Triticum Aestivum* L. during *Puccinia Graminis* f.sp. *Tritici* Infection. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 817–824. [CrossRef]
- Reynolds, M.P.; Braun, H.-J. Wheat Improvement. In *Wheat Improvement*; Reynolds, M.P., Braun, H.-J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022; pp. 3–15. ISBN 978-3-030-90672-6.
- Flor, H.H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1971**, *9*, 275–296. [CrossRef]
- McIntosh, R.A.; Dubcovsky, J.; Rogers, W.J.; Morris, C.; Xia, X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2017 SUPPLEMENT. Available online: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/kazunagi/genes/macgene/supplement2017.pdf> (accessed on 30 March 2022).
- Herrera-Foessel, S.A.; Singh, R.P.; Lillemo, M.; Huerta-Espino, J.; Bhavani, S.; Singh, S.; Lan, C.; Calvo-Salazar, V.; Lagudah, E.S. *Lr67/Yr46* Confers Adult Plant Resistance to Stem Rust and Powdery Mildew in Wheat. *Theor. Appl. Genet.* **2014**, *127*, 781–789. [CrossRef]
- Dyck, P.L. Genetics of Leaf Rust Reaction in Three Introductions of Common Wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* **1977**, *19*, 711–716. [CrossRef]
- Dyck, P.L. The Association of a Gene for Leaf Rust Resistance with the Chromosome 7D Suppressor of Stem Rust Resistance in Common Wheat. *Genome* **1987**, *29*, 467–469. [CrossRef]
- Lagudah, E.S.; Krattinger, S.G.; Herrera-Foessel, S.; Singh, R.P.; Huerta-Espino, J.; Spielmeier, W.; Brown-Guedira, G.; Selter, L.L.; Keller, B. Gene-Specific Markers for the Wheat Gene *Lr34/Yr18/Pw38* Which Confers Resistance to Multiple Fungal Pathogens. *Theor. Appl. Genet.* **2009**, *119*, 889–898. [CrossRef]
- Kumar, U.; Kumar, S.; Singh, R.P.; Joshi, A.K.; Röder, M.S.; Chhuneja, P.; Mavi, G.S. Association of *Lr34* Gene Complex with Spot Blotch Disease Resistance at Molecular Level in Wheat (*T. aestivum* L.). *Indian J. Genet. Plant Breed.* **2018**, *78*, 302–308. [CrossRef]
- Risk, J.M.; Selter, L.L.; Krattinger, S.G.; Viccars, L.A.; Richardson, T.M.; Buising, G.; Herres, G.; Lagudah, E.S.; Keller, B. Functional Variability of the *Lr34* Durable Resistance Gene in Transgenic Wheat. *Plant Biotechnol. J.* **2012**, *10*, 477–487. [CrossRef]
- McCallum, B.D.; Cloutier, S.; Hiebert, C.; Jordan, M. Leaf Tip Necrosis and Seedling Leaf Rust Resistance Conditioned by *Lr34* in Wheat Grown at Low Temperatures. *Can. J. Plant Pathol.* **2021**, *43*, S211–S217. [CrossRef]
- Dakouri, A.; McCallum, B.D.; Cloutier, S. Haplotype Diversity and Evolutionary History of the *Lr34* Locus of Wheat. *Mol. Breed.* **2014**, *33*, 639–655. [CrossRef]
- Krattinger, S.G.; Lagudah, E.S.; Spielmeier, W.; Singh, R.P.; Huerta-Espino, J.; McFadden, H.; Bossolini, E.; Selter, L.L.; Keller, B. A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat. *Science* **2009**, *323*, 1360–1363. [CrossRef] [PubMed]
- Rajagopalan, N.; Lu, Y.; Burton, I.W.; Montell-Rivera, F.; Halasz, A.; Reimer, E.; Tweidt, R.; Brülé-Babel, A.; Katcher, H.R.; You, F.M.; et al. A Phenylpropanoid Diglyceride Associates with the Leaf Rust Resistance *Lr34res* Gene in Wheat. *Phytochemistry* **2020**, *178*, 112456. [CrossRef]
- Kaur, S.; Pennington, T.; Conley, E.J.; Green, A.; Kolmer, J.; Anderson, J.; Gupta, R.; Gill, U. High-Resolution Melting-Based Marker Development for Wheat Leaf Rust Resistance Gene *Lr34*. *Phytopathology* **2023**, *113*, 508–515. [CrossRef] [PubMed]
- Moore, J.W.; Herrera-Foessel, S.; Lan, C.; Schnippenkoetter, W.; Ayliffe, M.; Huerta-Espino, J.; Lillemo, M.; Viccars, L.; Milne, R.; Periyannan, S.; et al. A Recently Evolved Hexose Transporter Variant Confers Resistance to Multiple Pathogens in Wheat. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1494–1498. [CrossRef] [PubMed]
- Raza, A.; Razaq, A.; Mehmood, S.; Zou, X.; Zhang, X.; Lv, Y.; Xu, J. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants* **2019**, *8*, 34. [CrossRef] [PubMed]
- Kumar, R.R.; Pathak, H.; Sharma, S.K.; Kala, Y.K.; Nirjal, M.K.; Singh, G.P.; Goswami, S.; Rai, R.D. Novel and Conserved Heat-Responsive MicroRNAs in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct. Integr. Genom.* **2015**, *15*, 323–348. [CrossRef] [PubMed]

25. Ramachandran, S.R.; Mueth, N.A.; Zheng, P.; Hulbert, S.H. Analysis of MiRNAs in Two Wheat Cultivars Infected with *Puccinia Striiformis* f. sp. *Tritici*. *Front. Plant Sci.* **2020**, *10*, 1574. [CrossRef] [PubMed]
26. Rychel-Bielska, S.; Plewinski, P.; Kozak, B.; Galek, R.; Książkiewicz, M. Photoperiod and Vernalization Control of Flowering-Related Genes: A Case Study of the Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 572135. [CrossRef]
27. Scholtz, J.J.; Visser, B. Reference Gene Selection for qPCR Gene Expression Analysis of Rust-Infected Wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2013**, *81*, 22–25. [CrossRef]
28. Xie, L.; Quan, X.; Zhang, J.; Yang, Y.; Sun, R.; Xia, M.; Xue, B.; Wu, C.; Han, X.; Xue, Y.; et al. Selection of Reference Genes for Real-Time Quantitative PCR Normalization in the Process of *Gaeumannomyces graminis* Var. *Tritici* Infecting Wheat. *Plant Pathol. J.* **2019**, *35*, 11–18. [CrossRef]
29. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 611–622. [CrossRef]
30. Foren, D.A.; González-Giraldo, Y.; Castro-Vega, L.J.; Barreto, G.E. qPCR-Based Methods for Expression Analysis of MiRNAs. *BioTechniques* **2019**, *67*, 192–199. [CrossRef]
31. Kramer, M.F. Stem-Loop RT-qPCR for MiRNAs. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2011**, *9*, 1–10. [CrossRef]
32. Milne, R.J.; Dibley, K.E.; Schnippenkoetter, W.; Mascher, M.; Luk, A.C.W.; Wang, L.; Lo, C.; Ashton, A.R.; Ryan, P.R.; Lagudah, E.S. The Wheat *Lr67* Gene from the Sugar Transport Protein 13 Family Confers Multipathogen Resistance in Barley. *Plant Physiol.* **2019**, *179*, 1285–1297. [CrossRef]
33. Campbell, E.J.; Schenk, P.M.; Kazan, K.; Perennéckx, L.A.M.A.; Anderson, J.P.; Maclean, D.J.; Cammue, B.P.A.; Elbert, P.R.; Manners, J.M. Pathogen-Responsive Expression of a Putative ATP-Binding Cassette Transporter Gene Conferring Resistance to the Diterpenoid Sclerotol Is Regulated by Multiple Defense Signaling Pathways in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2003**, *133*, 1272–1284. [CrossRef]
34. Bolton, M.D.; Kolmer, J.A.; Xu, W.W.; Garvin, D.F. *Lr34*-Mediated Leaf Rust Resistance in Wheat: Transcript Profiling Reveals a High Energetic Demand Supported by Transient Recruitment of Multiple Metabolic Pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2008**, *21*, 1515–1527. [CrossRef] [PubMed]
35. Krattinger, S.G.; Kang, J.; Bräunlich, S.; Boel, R.; Chauhan, H.; Selter, L.L.; Robinson, M.D.; Schmid, M.W.; Wiederhold, E.; Hensel, G.; et al. Abscisic Acid Is a Substrate of the ABC Transporter Encoded by the Durable Wheat Disease Resistance Gene *Lr34*. *New Phytol.* **2019**, *223*, 853–866. [CrossRef] [PubMed]
36. Bräunlich, S.; Koller, T.; Glauser, G.; Krattinger, S.G.; Keller, B. Expression of the Wheat Disease Resistance Gene *Lr34* in Transgenic Barley Leads to Accumulation of Abscisic Acid at the Leaf Tip. *Plant Physiol. Biochem.* **2021**, *166*, 950–957. [CrossRef]
37. Risk, J.M.; Selter, L.L.; Chauhan, H.; Krattinger, S.G.; Kümlehn, J.; Hensel, G.; Viccars, L.A.; Richardson, T.M.; Buesing, G.; Tröller, A.; et al. The Wheat *Lr34* Gene Provides Resistance against Multiple Fungal Pathogens in Barley. *Plant Biotechnol. J.* **2013**, *11*, 847–854. [CrossRef]
38. McCallum, B.D.; Hiebert, C.W. Interactions Between *Lr67* or *Lr34* and Other Leaf Rust Resistance Genes in Wheat (*Triticum aestivum*). *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 871970. [CrossRef] [PubMed]
39. Tomkowiak, A.; Jedrzejewski, T.; Szychala, J.; Kuczyński, J.; Kwiatek, M.T.; Tyczewska, A.; Skowronska, R.; Twardowski, T. Analysis of MiRNA Expression Associated with the *Lr46* Gene Responsible for APR Resistance in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Appl. Genet.* **2020**, *61*, 503–511. [CrossRef]
40. Tomkowiak, A.; Bobotowska, R.; Kwiatek, M.; Szychala, J.; Kuczyński, J.; Tyczewska, A.; Kowalczyński, P.; Weigt, D.; Kosiada, T. Analysis of MiRNA Expression Associated with Gene *Lr34* Responsible for Resistance Mechanisms to Wheat Leaf Rust. *Pak. J. Bot.* **2023**, *55*, 379–385. [CrossRef]
41. Li, J.; Yue, L.; Shen, Y.; Sheng, Y.; Zhan, X.; Xu, G.; Xing, B. Phoranthrene-Responsive MicroRNAs and Their Targets in Wheat Roots. *Chemosphere* **2017**, *186*, 588–598. [CrossRef]
42. Kumar, D.; Dutta, S.; Singh, D.; Prabhu, K.V.; Kumar, M.; Mukhopadhyay, K. Uncovering Leaf Rust Responsive MiRNAs in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Using High-Throughput Sequencing and Prediction of Their Targets through Degradome Analysis. *Planta* **2017**, *245*, 161–182. [CrossRef]
43. Bakhshi, B.; Fard, E.M.; Gharechahi, J.; Sofarzadeh, M.; Nikpay, N.; Fotovat, R.; Azimi, M.R.; Salekdeh, G.H. The Contrasting MicroRNA Content of a Drought Tolerant and a Drought Susceptible Wheat Cultivar. *J. Plant Physiol.* **2017**, *216*, 35–43. [CrossRef] [PubMed]
44. Biselli, C.; Bagnaresi, P.; Faucioli, P.; Hu, X.; Balcerzak, M.; Mittera, M.G.; Yan, Z.; Ouellet, T.; Cattivelli, L.; Valè, G. Comparative Transcriptome Profiles of Near-Isogenic Hexaploid Wheat Lines Differing for Effective Alleles at the 2DL FHB Resistance QTL. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 37. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Changes in expression levels post inoculation (i.e., relative to the first term) for the *Lr34* and *Lr67* genes.

		Change after inoculation <i>Lr34</i>	Normal distribution (<i>Lr34</i>)	Equality of variances (<i>Lr34</i>)	No difference between means (<i>Lr34</i>)	Correlation between <i>Lr34</i> and <i>Lr67</i>	Change after inoculation <i>Lr67</i>	Normal distribution (<i>Lr67</i>)	Equality of variances (<i>Lr67</i>)	No difference between means (<i>Lr67</i>)
Line	Time	T0h <i>Lr34</i>	Kolmogorov-Smirnov test	Levene's test	Two-tailed t-Student test	0.675191992	T0h <i>Lr67</i>	Kolmogorov-Smirnov test	Levene's test	Two-tailed t-Student test
Artigas	00h		0.33063					0.64822		
Artigas	06h	0.66		0.8877	0.328182		0.73		0.3277	0.478664
Artigas	12h	0.33		0.7626	0.09917		0.29		0.1986	0.09688
Artigas	24h	0.49		0.6482	0.160616		0.42		0.5631	0.20285
Artigas	48h	1.25		0.6301	0.63467		1.90		0.4418	0.068915
Glenlea	00h		0.46378					0.7998		
Glenlea	06h	1.06		0.3846	0.909998		1.75		0.3065	0.352663
Glenlea	12h	0.36		0.3172	0.013023		0.65		0.8707	0.372808
Glenlea	24h	1.01		0.6651	0.98669		0.28		0.6244	0.049027
Glenlea	48h	1.40		0.4119	0.730744		1.47		0.44	0.411655
Lerma Rojo	00h		0.24242					0.64438		
Lerma Rojo	06h	0.05		0.2972	0.032906		0.13		0.5463	0.020879
Lerma Rojo	12h	0.23		0.3515	0.062264		0.59		0.9217	0.246334
Lerma Rojo	24h	1.00		0.5129	0.991322		0.13		0.3339	0.019846
Lerma Rojo	48h	0.07		0.3566	0.036737		0.40		0.9401	0.102186
NPS46	00h		0.54393					0.2528		
NPS46	06h	0.54		0.4925	0.247717		0.57		0.5177	0.215078
NPS46	12h	0.15		0.2011	0.047797		0.09		0.1792	0.002264
NPS46	24h	0.49		0.3626	0.191111		0.23		0.3396	0.035186
NPS46	48h	0.04		0.1585	0.03236		0.30		0.7344	0.035289
TX89D6 435	00h		0.02799					0.36779		
TX89D6 435	06h	0.53		0.5764	0.602064		0.28		0.3695	0.104666
TX89D6 435	12h	0.33		0.3729	0.442623		0.04		0.1228	0.037423
TX89D6 435	24h	0.32		0.376	0.435676		0.41		0.2006	0.140425
TX89D6 435	48h	0.26		0.4265	0.404337		0.87		0.7883	0.816887
Artigas*	00h		0.96761					0.47516		
Artigas*	06h	0.76		0.2669	0.489588		0.99		0.222	0.982821
Artigas*	12h	1.41		0.5659	0.080655		1.05		0.4515	0.642397
Artigas*	24h	0.78		0.188	0.536839		0.77		0.3577	0.614254
Artigas*	48h	0.67		0.3095	0.241431		0.83		0.1485	0.614393

Table S2. PCR product sequences for *Lr34* and *Lr67* genes.

Gene	Line	Sequences
<i>Lr34</i>	Artigas*	GGTAGTAGCAGTTGAAGCTTCAGAGCGAAGCCTACAGACAGATTATATTTTGAAGGT ACCCCTTGCCAAAACATCTAAGTTTATGCATAACTTGGTGCTGAAGGCAGATAGGAA CAAGATACTAACAGAATCACAACTGATTTATTTGTAGATCATGGGGCTAGAGATA TGGCAGACACGATGGTTGGGGATGCAATGAGAAGAG
	Glenlea	GGTAGTAGCAGTTGAAGCTTCAGAGCGAAGCCTACAGACAGATTATATTTTGAAGGT AaCtTTGCCAAAACATaTAAGTTTATGCATAACTTGGTGCTGAAGGCAGATAGGAA CAAaATACTAACAGAATCACAaTACTGATTTATTTGTAGATCATGGGGCTAGAGAAaAT GCGCAGACACGATGGTTGGGGATGCAATGAGAAGAG
<i>Lr67</i>	Artigas*	CGCCATCTTCATCTTCTTC CGGCSTGGGTGCTCGTCATGTCCGTCTTCGTGCTCTTCTT CCTCCCGGAGACCAAGAACGTGCCCATCGAGGAGATGACC GACAAGGTGTGGAAGC AG
	Glenlea	CGCCATCTTCATCTTCTTC CGGCSTGGGTGCTCGTCATGTCCGTCTTCGTGCTCTTCTT CCTCCCGGAGACCAAGAACGTGCCCATCGAGGAGATGACC GACAAGGTGTGGAAGC AG

Table S3. Change in expression levels after inoculation (i.e., relative to the first term) for reference genes *TUBβ* and *ARF*.

		Difference after inoculation <i>TUBβ</i>	Change after inoculation <i>TUBβ</i>	Normal distribution (<i>TUBβ</i>)	Equality of variances (<i>TUBβ</i>)	No difference between means (<i>TUBβ</i>)	Difference after inoculation <i>ARF</i>	Change after inoculation <i>ARF</i>	Normal distribution (<i>ARF</i>)	Equality of variances (<i>ARF</i>)	No difference between means (<i>ARF</i>)	No difference between means - both references
Line	Time	Cq_T - Cq_00h	Cq_T / Cq_00h	Kolmogorov-Smirnov test	Levene's test	Two-tailed t-Student test	Cq_T - Cq_00h	Cq_T / Cq_00h	Kolmogorov-Smirnov test	Levene's test	Two-tailed t-Student test	Two-tailed t-Student test
Artigas	00h			0.95454					0.22863			
Artigas	06h	1.593	1.05431201		0.1626	0.030043	0.960	1.032989691		0.2906	0.223466	0.043641
Artigas	12h	-0.847	0.971139643		0.7089	0.410666	-1.437	0.950630011		0.4796	0.263805	0.296333
Artigas	24h	1.633	1.055675491		0.9521	0.076802	1.297	1.044558992		0.7223	0.033396	0.042652
Artigas	48h	-0.920	0.968639927		0.7187	0.400171	-0.857	0.970561283		0.3809	0.415778	0.306787
Gleslea	00h			0.6789					0.23878			
Gleslea	06h	1.487	1.051123338		0.4082	0.030354	0.127	1.004286037		0.8069	0.440032	0.096806
Gleslea	12h	1.637	1.056281522		0.2962	0.034952	0.420	1.014211595		0.5766	0.504937	0.021232
Gleslea	24h	1.377	1.047340669		0.8298	0.158302	2.453	1.08301376		0.4407	0.11911	0.099561
Gleslea	48h	-0.880	0.969738652		0.4112	0.474999	-1.567	0.946988495		0.2305	0.190415	0.308638
Lenna Rojo	00h			0.86625					0.62449			
Lenna Rojo	06h	1.057	1.038114705		0.7991	0.064677	2.130	1.07596291		0.4908	0.555619	0.425515
Lenna Rojo	12h	0.723	1.026091139		0.8683	0.243417	0.993	1.035425583		0.5303	0.265889	0.179871
Lenna Rojo	24h	3.157	1.113863172		0.9314	0.002255	3.110	1.110912981		0.3869	0.012561	0.004638
Lenna Rojo	48h	-1.070	0.96284718		0.7944	0.121469	-1.130	0.959700428		0.3783	0.193768	0.1482
NPS46	00h			0.89829					0.89651			
NPS46	06h	1.983	1.069925961		0.272	0.007126	1.097	1.039758308		0.4756	0.075348	0.009003
NPS46	12h	1.230	1.043365848		0.4395	0.013219	1.830	1.066344411		0.7153	0.022311	0.013284
NPS46	24h	2.243	1.079002725		0.2413	0.048836	3.767	1.136555891		0.4604	0.038252	0.025251
NPS46	48h	-1.523	0.946292161		0.2628	0.200372	-0.713	0.974138973		0.729	0.230815	0.184133
TX 89D6435	00h			0.99762					0.87176			
TX 89D6435	06h	3.440	1.128955038		0.8188	0.013352	4.010	1.154210999		0.9203	0.116369	0.055147
TX 89D6435	12h	1.290	1.048320639		0.3396	0.119585	1.480	1.05691578		0.1836	0.348179	0.234443
TX 89D6435	24h	2.690	1.100761643		0.8005	0.028141	3.527	1.135623638		0.2098	0.061867	0.041902
TX 89D6435	48h	1.220	1.045698589		1	0.247515	2.333	1.089732086		0.7699	0.251491	0.234053

**P3. Expression patterns of candidate genes for
the *Lr46/Yr29* “slow rust” locus in common wheat (*Triticum
aestivum* L.) and associated miRNAs inform of the gene conferring
the *Puccinia triticina* resistance trait**

**Julia Spychała, Agnieszka Tomkowiak, Aleksandra Noweiska,
Roksana Bobrowska, Sandra Rychel-Bielska, Jan Bocianowski,
Łukasz Wolko, Przemysław Łukasz Kowalczewski, Marcin Nowicki,
Michał Tomasz Kwiatek**

PLoS ONE 19(9): e0309944.; (2024)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944>

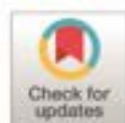
RESEARCH ARTICLE

Expression patterns of candidate genes for the *Lr46/Yr29* “slow rust” locus in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and associated miRNAs inform of the gene conferring the *Puccinia triticina* resistance trait

Julia Spychala^{1,2}, Agnieszka Tomkowiak^{1*}, Aleksandra Noweiska^{1,2}, Roksana Bobrowska¹, Sandra Rychel-Bielska³, Jan Bocianowski⁴, Łukasz Wolko⁵, Przemysław Łukasz Kowalczewski⁶, Marcin Nowicki^{7*}, Michał Tomasz Kwiatek^{1,8}

1 Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland, **2** Plant Breeding and Acclimatization Institute - National Research Institute in Radzików, Poznań Division, Department of Oilseed Crops, Poznań, Poland, **3** Department of Genetics, Plant Breeding and Seed Production, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland, **4** Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland, **5** Department of Biochemistry and Biotechnology, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland, **6** Department of Food Technology of Plant Origin, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland, **7** Department of Entomology and Plant Pathology, Institute of Agriculture, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, United States of America, **8** Plant Breeding and Acclimatization Institute - National Research Institute in Radzików, Radzików, Poland

* agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl (AT); mnowicki@utk.edu (MN)



OPEN ACCESS

Citation: Spychala J, Tomkowiak A, Noweiska A, Bobrowska R, Rychel-Bielska S, Bocianowski J, et al. (2024) Expression patterns of candidate genes for the *Lr46/Yr29* “slow rust” locus in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and associated miRNAs inform of the gene conferring the *Puccinia triticina* resistance trait. PLoS ONE 19(9): e0309944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944>

Editor: Vaibhav Kumar Singh, Indian Agricultural Research Institute, INDIA

Received: May 19, 2024

Accepted: August 22, 2024

Published: September 6, 2024

Copyright: © 2024 Spychala et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This study was 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

Abstract

Leaf rust caused by *Puccinia triticina* (*Pt*) is one of the most impactful diseases causing substantial losses in common wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. In adult plants resistant to *Pt*, a horizontal adult plant resistance (APR) is observed: APR protects the plant against multiple pathogen races and is distinguished by durable persistence under production conditions. The *Lr46/Yr29* locus was mapped to chromosome 1B of common wheat genome, but the identity of the underlying gene has not been demonstrated although several candidate genes have been proposed. This study aimed to analyze the expression of nine candidate genes located at the *Lr46/Yr29* locus and their four complementary miRNAs (*tae-miR5384-3p*, *tae-miR9780*, *tae-miR9775*, and *tae-miR164*), in response to *Pt* infection. The plant materials tested included five reference cultivars in which the molecular marker *csLV46G22* associated with the *Lr46/Yr29*-based *Pt* resistance was identified, as well as one susceptible control cultivar. Biotic stress was induced in adult plants by inoculation with fungal spores under controlled conditions. Plant material was sampled before and at 6, 12, 24, 48 hours post inoculation (hpi). Differences in expression of candidate genes at the *Lr46/Yr29* locus were analyzed by qRT-PCR and showed that the expression of the genes varied at the analyzed time points. The highest expression of *Lr46/Yr29* candidate genes (*Lr46-Glu1*, *Lr46-Glu2*, *Lr46-Glu3*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, *Lr46-RLK3*, *Lr46-RLK4*, *Lr46-Snex*, and *Lr46-WRKY*) occurred at 12 and 24 hpi and such expression profiles were obtained only for one

slow rusting genes conferring resistance to rusts caused by *Puccinia* sp." (DHR.fm.802.11.2023); Project leader: M.T. Kivilek. Publication costs were covered by the University of Tennessee Open Access Publishing Fund awarded to M. Nowicki. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

candidate gene among the nine genes analyzed (*Lr46-Glu2*), indicating that it may be a contributing factor in the resistance response to *Pt* infection.

Introduction

Common wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of staple crop species of enormous global importance. Worldwide, wheat cultivation is extremely relevant as it is connected with the crop's large share in human and animal nutrition. Currently, the primary directions of wheat breeding focus mainly on high yield, high commercial quality, and resistance to biotic and abiotic stresses [1–3]. Among the most threatening diseases leading to substantial losses in world's wheat crops is leaf rust caused by the fungus *Puccinia triticina* Erikss (*Pt*). It occurs more frequently than other rust diseases and is comparatively more prevalent worldwide [4]. Wheat leaf rust contributes substantially to the crop losses [4, 5]. *Pt* is an obligate parasite capable of producing infectious urediniospores that can spread over long distances, which may result in an epidemic of leaf rust on a national or even continental scale [6]. Scientists' efforts are being focused on the possible future threats posed by climate change that renders negative impacts on global crop production and food security. Modern breeding technologies and biotechnology strategies are valuable tools to create climate-smart crops. In addition, to understand plant responses under various abiotic and biotic stresses, the most urgent need currently is to investigate their respective genetic basis and molecular mechanisms [7]. In 2020, Prasad et al. [5] analyzed hundreds of major scientific reports on mechanisms of plant resistance to fungal pathogens, including *Pt*. So far, the number of identified leaf rust resistance genes (*Lr*) is limited, and potential co-expression data have not yet been sufficiently examined. To understand the variability of *Lr* genes and the molecular mechanisms used to activate their expression after infection, the pursuit to clone more *Lr* genes is essential. The search for diverse and durable resistance to *Pt* must continue using advanced tools and techniques, including molecular methods [5].

Common wheat (*Triticum aestivum* L.) is an allohexaploid species ($2n = 6 \times = 42$ chromosomes; AABBDD) as a result of its dynamic domestication history [8]. This polyploidy is the result of two rounds of hybridization: the first interspecific between *T. urartu* ($2n = 2 \times = 14$ chromosomes; AA) and *Aegilops* spp. (genome BB), then between *T. turgidum* ($2n = 4 \times = 28$ chromosomes; AABB) and *A. tauschii* ($2n = 2 \times = 14$ chromosomes; DD) [9, 10]. The resulting common wheat genome is exceptionally large (approximately 16 Gbp) and, similar to other large plant genomes, its repeat sequences (including retrotransposons) account for as much as about 85%. Over the past decades, numerous studies have led to the identification of approximately 100 *Lr* genes and many important quantitative trait loci (QTLs) on various chromosomes of wheat genome [11, 12]. However, due to the size and complexity of the wheat genome, only a few *Lr* genes have been cloned so far. These include seven genes (*Lr1*, *Lr10*, *Lr21*, *Lr34*, *Lr42*, *Lr47*, and *Lr67*) cloned by classical map-based cloning and four genes obtained by rapid gene-cloning approaches (*Lr9*, *Lr13*, *Lr14a*, and *Lr22a*) [5, 13]. Genetically determined resistance to *Pt* has been characterized both in young plants (seedling resistance; SR) and plants at the mature stage (adult plant resistance; APR). APR is characterized by a comparatively greater persistence than SR [14]. Genes that underlie APR confer quantitative resistance, also known as horizontal resistance, that provides trait stability and reduced risk of future susceptibility. Majority of characterized *Lr* genes confer the SR type resistance at the seedling stage and are race-specific; exceptions include the few known APR genes such as

Lr34/Yr18/Sr57, *Lr46/Yr29/Sr58*, *Lr67/Yr46/Sr55*, and *Lr68* [15–18]. In the APR-type *Pt*-resistant wheat cultivars, the observed slow rust impacts manifest as partial but durable *Pt* resistance [19]. An example of a gene with such resistance is the well-studied *Lr34* gene [20–25]. *Lr* genes have been successfully used in many breeding programs to develop novel wheat cultivars with improved pathogen resistance. Currently, only a few APR genes, such as *Lr34* and *Lr46*, are meaningfully useful in *Pt*-resistance breeding and are widely used in wheat breeding [25–27].

The *Lr46* gene was first described in the cultivar 'Pavon 76' [28]. Wheat genotypes showing *Lr46/Yr29* are characterized by resistance to leaf and stripe rust pathogens; in addition, they have been characterized as donors of resistance to powdery mildew (*Pm39*) and stem rust pathogens (*Sr58*) [6]. The associated locus *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39* was mapped to chromosome 1BL, but the specific genes are yet to be identified. Based on high-resolution mapping of wheat *QYr.ucw-1BL*, 13 candidate genes for *Lr46/Yr29* were selected and analyzed [29]. However, it remains unclear whether this locus of resistance to multiple pathogens is the result of the pleiotropic action of a single causal gene or a small cluster of tightly linked genes [30]. Detailed functional characterization of the *Lr46/Yr29* is essential to determine the allelic variability of the gene(s) that underlies the *Pt* resistance trait and to establish the molecular mechanism(s) of such a function [20].

Resistance and susceptibility are regulated by mechanisms for rapid recognition of invading pathogens and efficient activation of host plant defense mechanisms. Small non-coding RNAs, which can be subdivided into microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs), are global regulators of gene expression. In recent years, many miRNAs specific for plant development and various biotic and abiotic stress responses have been identified in wheat. In plants, regulation of expression by miRNAs is mainly through post-transcriptional regulation. miRNAs regulate not only the processes of plant growth and development but also actively participate in plant responses to biotic stress agents [31–34]. Plant miRNAs are small molecules of approximately 21 bp (base pairs) [35]. They recognize specific target mRNAs based on sequence complementarity and repress expression of the target gene(s) by targeting the mRNA for degradation or by inhibiting translation [36–38]. Obtaining a holistic knowledge of the functional dynamics and conservation of miRNAs in wheat can provide valuable information for the development of cultivars with improved stress resistance and yield [31, 39].

In this study, we analyzed the expression levels of nine candidate genes encompassed by *Lr46/Yr29*, selected based on the work by Cobo et al. [29]. These candidate genes mapped the *QYr.ucw-1BL* region to chromosome 1BL, which overlapped with the current genetic maps of the *Pt* resistance gene *Yr29* (also known as *Lr46*) [28]. The results suggest that QTL (*QYr.ucw-1BL*) and *Lr46/Yr29* map to the same gene conferring similar resistance responses. Previous data [29] highlighted the need to investigate the trait's expression in different genotypes with and without pathogen inoculation to determine whether there are differences in the expression levels among candidate genes for *Lr46/Yr29*. As a result, 13 candidate genes were identified for *Lr46/Yr29*, but three of them were discarded (*TraesCS1B02G454300*, *TraesCS1B02G454700*, and *TraesCS1B02G454900*), because the first gene is annotated as a transposable element and there are no exome capture data; the other two genes were excluded because they are likely to be unexpressed pseudogenes. To confirm the obtained amplicons, we performed Sanger sequencing of all amplified products and compared the assembled sequences with homologues of genes located on other chromosomes: 1A, 1D, 2A, 2B, and 2D. Furthermore, we used stem-loop Reverse Transcription PCR (RT-PCR) and droplet digital PCR (ddPCR) methods to analyze the expression of miRNA molecules complementary to candidate genes for *Lr46/Yr29*, which can influence or modulate their expression over time.

Materials and methods

Plant growth, pathogen inoculation, and leaf sample collection

Plant materials consisted of six common wheat cultivars whose seeds were obtained from the National Small Grains Collection (Agricultural Research Station in Aberdeen, WA, USA). Five of the common wheat cultivars tested were found to be highly valuable sources of *Pt* resistance genes: spring cultivars Artigas ("PI 192535"), NP846 ("PI 322263"), Glenlea ("Citr 17272"), Lerma Rojo ("Citr 13651"), and one winter wheat cultivar TX89D6435 ("PI 584759"). The susceptibility control (lack of molecular markers linked to *Lr34*, *Lr46*, or *Lr67*) was the spring cultivar Artigas* ("PI 73046") [20, 40]. Identification of molecular markers for the *Lr46/Yr29* locus of Artigas* and the listed *Pt*-resistant wheat cultivars analyzed in this paper was recently carried out by our research team [20]. The *csLV46G22* marker linked to the *Lr46/Yr29* locus (E. Lagudah, unpublished data) was identified in all five resistant wheat genotypes [20].

The experiment was conducted in a growth chamber under controlled conditions: the temperature was set at 18 °C during the day and 16 °C at night with a 16-hour photoperiod, a relative humidity of 60 to 70% was established. In addition, the emission spectrum of the light source was fixed with a photon flux of 572 μE . One month after setting up the experiment, the temperature in the phytotron was raised to 20 °C and 17 °C during the day and night, respectively. Plants were grown to the adult plant stage, i.e., the formation of the flag leaf; plants were inoculated at 34 days after sowing. Cultivars at the adult plant stage were inoculated with *Pt* by spraying a suspension of urediniospores at a concentration of approximately 5×10^5 spores/mL. Inoculum suspension was an equimolar mixture of four *Pt* strains suspended in water with 1% v/v Tween 20 reagent and prepared immediately before inoculation [40, 41]. Fungal spores were collected from infected field experiments located in various parts of Poland [40]. Samples of leaf tissue fragments were collected at five time points: 0 (before inoculation), 6, 12, 24, and 48 hours post inoculation (hpi), in three biological replicates. Leaf tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Candidate gene expression analysis using Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

Based on the work of Cobo et al. [29], 10 candidate genes for the *Lr46/Yr29* gene (Table 1) whose sequences were found in the Ensembl Plants database for common wheat (https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index) were selected and downloaded in FASTA

Table 1. Presentation of 10 genes located in the candidate region for *Lr46/Yr29* gene and *QYr.new-1BL* region, predicted function and their localization on reference wheat genome TGACv2 (GCA_900241085.1).

No.	Gene ID	Gene abbreviation	Gene predicted function	Physical localization
1.	TraesCS1B02G453900.1	<i>Lr46-Glu1</i>	Glucan endo-1,3- β -glucosidase	1B: 669,922,599–669,924,501
2.	TraesCS1B02G454200.1	<i>Lr46-Glu2</i>	Glucan endo-1,3- β -glucosidase	1B: 670,142,374–670,144,629
3.	TraesCS1B02G454500.1	<i>Lr46-Glu3</i>	Glucan endo-1,3- β -glucosidase	1B: 670,158,858–670,161,009
4.	TraesCS1B02G454000.2	<i>Lr46-RLK1</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,025,362–670,028,705
5.	TraesCS1B02G454100.1	<i>Lr46-RLK2</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,034,245–670,037,207
6.	TraesCS1B02G454400.1	<i>Lr46-RLK3</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,152,915–670,155,867
7.	TraesCS1B02G454600.1	<i>Lr46-RLK4</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,164,777–670,167,783
8.	TraesCS1B02G454800.2	<i>Lr46-Sfr</i>	Sugar transporter	1B: 670,185,922–670,187,880
9.	TraesCS1B02G453700.1	<i>Lr46-Swea</i>	Sorting nexin	1B: 669,895,813–669,902,629
10.	TraesCS1B02G455000.1	<i>Lr46-WRKY</i>	WRKY transcription factor	1B: 670,202,181–670,203,493

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.t001>

format. These sequences were used to design primers for qRT-PCR reactions, using the Primer3Plus tool (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). The *Lr46/Yr29* region described by Cobo et al. [29] involves four copies of the *RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE (RLK)* gene, three copies of *GLUCAN ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASES (Glu)*, as well as one copy each of *SORTING NEXIN (Snex)*, *SUGAR TRANSPORTER (STr)*, and a *TRANSCRIPTION FACTOR CARRYING THE WRKY DOMAIN (WRKY)*. Of all the candidate genes listed, only the *STr* gene has no other close analogues in the reference wheat genome [42]. The sequences of the two candidate genes *Lr46-Snex* and *Lr46-WRKY* were similar to one another, which allowed universal primers to be designed to detect any transcript including homologues in other chromosomes. For the *Lr46-Snex* gene, a pair of universal primers was designed to allow detection of potential homologue transcripts on chromosomes 1A, 1B, and 1D. Similar was true for the *Lr46-WRKY* gene, for which a pair of universal primers was designed to allow the detection of potential gene transcripts of homologues on chromosomes 1B and 1D. Regarding the *RLK* and *Glu* genes, very similar gene arrangements are found on the other two chromosomes: 1A and 1D, in the region similar to 1B chromosome. Therefore, a comparison was made of only those few copies of genes found in the *QYr.acw-1BL* region described, on chromosome 1B. These genes are so highly differentiated that it is not possible to design universal primers for them. Based on the *T. aestivum* reference genome sequence (taxid: 4565), primers were designed. Isolation of total RNA from leaf tissue samples collected as biological replicates and at variable time points (0, 6, 12, 24, and 48 hpi) was performed using the Maxwell RSC Plant RNA Kit isolation (Promega, Madison, WI, USA). The concentration and purity of isolated total RNA were assessed using a NanoDrop spectrophotometer and A_{260}/A_{280} ratio. First-strand cDNA synthesis was performed using the iScript[™] Reverse Transcription Supermix kit for RT-qPCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), according to the protocol provided by the manufacturer. A temperature gradient PCR was performed for each investigated amplicon (each primer pair) to optimize the thermal profile applied. The gradient was set in the temperature range from 50 °C to 58 °C. The optimized amplification temperature was set at 53.5 °C after obtaining a specific product in a 2% agarose gel. In order to perform amplification standard curves, the amplicons obtained were individually purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) according to the protocol provided by the company. In the next step, a series of dilutions were performed for each purified amplicon to obtain standard curves of qRT-PCR efficiency (%E) and R^2 values (Table 2). The standard curves were developed according to the protocol described previously [43].

qRT-PCR was performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix and CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A negative No Template Control (NTC) was also performed for each analyzed gene. The composition of the qRT-PCR reaction mix was as follows: supermix—5 μ L, primers (10 μ M)—0.5 μ L each, nuclease-free water—3 μ L, and cDNA template—1 μ L. Following current MIQUE recommendations on the validity of real-time PCR analyses, three biological replicates were used for each gene type/ timepoint for a given wheat cultivar, and three technical repeats were prepared for each [44]. The following temperature profile was used: initial denaturation for 3 min at 95 °C; then 40 cycles: denaturation for 10 sec at 95 °C, annealing of primers for 30 sec at 53.5 °C. Melt stage (melt curve): melting temperature range 65 °C to 90 °C; every 5 seconds the temperature was increased by 0.5 °C and a fluorescence measurement was taken. Data analyses were performed using Bio-Rad CFX Maestro software and the Gene Study tool (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), which allowed to compare the expression of all genes at different time points of each cultivar.

Table 2. Name and sequences of designed primers based on candidate gene sequences for *Lr46/Yr29*. The table also shows qPCR efficiency (%) and R^2 values by performing standard curves.

Gene abbreviation	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Amplification efficiency (%)	R^2	T_m (°C)
<i>Lr46-Glu1</i>	F: GGTCCAGNCAATGTGAA R: AGCTGAGAGTTTAGTTGG	102	84.4	0.999	84.5
<i>Lr46-Glu2</i>	F: TATCTCTTGTTCGGCCCC R: CCATCGCATAGTACACAG	103	84.3	0.998	84.5
<i>Lr46-Glu3</i>	F: ACTCCAGACGTCATTCCG R: GAAGGGTCTGTGGAAAA	99	93.1	0.999	85.5
<i>Lr46-RLK1</i>	F: ACCGGGAGGAGAACAT R: ATCCATCATGTCCAAACACC	105	109.4	0.998	79.5
<i>Lr46-RLK2</i>	F: TGAGATCGTGACGGGAG R: CTAGCATCTCCAGTAGTGT	114	95.3	0.998	83.5
<i>Lr46-RLK3</i>	F: CAGGGACCTTAAAGCTAAT R: GGTTFGATATGAGTGTG	109	92.0	0.999	80.5
<i>Lr46-RLK4</i>	F: TTCAGCTTTGGCGTATTGCAAC R: ACCGGTCTAGCATCTCCAGT	101	91.3	0.998	83.0
<i>Lr46-Str</i>	F: GCGCGTGAACGTGTATAT R: GTGTCCGTCCCAITTCAG	107	-	-	-
<i>Lr46-Snec</i>	F: CTTTGATAGTTCGTTTCCG R: TTTGTTTTGGCAAGTGGG	103	92.1	1.000	81.5
<i>Lr46-WRKY</i>	F: TTTTTCGGCTCTTTTGAC R: GTGGAAACCAATTCTCGTA	120	94.2	0.999	82.5

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.t002>

Reference genes for Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

Based on literature data, four reference genes were selected for stable expression: *TUBβ*, *ARF*, *RL1* [45], and *EF2-1* [46]. After analyzing the standard curves for these reference genes, two genes, *TUBβ* and *ARF*, were selected and qRT-PCR analyses were performed for them on a test cDNA template [40]. The selection and testing of reference genes were developed according to a previously reported protocol [40]. The analysis of reference genes for the test samples was essential for statistical calculations because the expression of the reference gene was compared to the expression of the gene analyzed for each sample using the Gene Study tool (CFX Maestro from Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Preparation of candidate gene amplicons for Sanger sequencing

Sanger sequencing was performed to confirm that the desired amplicons were obtained for the candidate genes for *Lr46/Yr29* and to characterize the possible sequence polymorphism(s) among the resistant genotype (Glenlea cultivar) and the susceptible genotype (Artigas[®] cultivar). The majority of amplicons for sequencing were amplified from cDNA. However, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, and *Lr46-RLK4* were exceptions that resulted from obtaining a low quantity and/or quality PCR products using cDNA; in these cases, genomic DNA was used as template, isolated from leaves using the GeneMATRIX Plant and Fungi DNA Purification Kit (EURx Ltd, Gdańsk, Poland), according to the protocol provided by the manufacturer. For sequence confirmation of the analyzed candidate genes in the *Lr46/Yr29* locus, PCR reactions were performed for the respective primer pairs. GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase reagents (Promega, Madison, WI, USA) were used to prepare the PCR reaction [40], otherwise identical in composition to qRT-PCR described above. The following amplification temperature profile was used: initial denaturation for 2 min at 94°C; followed by 35 cycles: denaturation for 1 min

at 95 °C, annealing of primers for 30 s at 53.5 °C, extension for 30 s at 72 °C, extension for 30 s at 72 °C; final extension for 5 min at 72 °C and cooling to 4 °C. Purification of amplicons was performed using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), according to the protocol provided by the manufacturer. After purification, samples were resuspended in an elution buffer in a volume of 30 µL. Purified amplicons were directly sequenced using the Sanger method with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and a 3730xl capillary DNA analyzer (Applied Biosystems) by Genomed (Warsaw, Poland). The results obtained were assembled using Gencious v8.1 software [47].

Validation of miRNAs and analysis of their expression using stem-loop RT-PCR and ddPCR

In this study, the expression of four miRNAs was analyzed: three related to the candidate gene *Lr46-Glu2* (*tae-miR5384-3p*, *tae-miR9780*, *tae-miR9775*, *tae-miR9780* also being complementary to *Lr46-RLK2*), and *tae-miR164* complementary to *Lr46-RLK3*. The coding sequences of these candidate target genes downloaded from the Ensembl Plants database (https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index), were analyzed in the psRNA Target database (<http://plantgrn.noble.org/psRNA/Target/>). The sequences of the four miRNAs analyzed were found in the miRBase database (<https://www.mirbase.org/>) and downloaded in FASTA format and using the Integrated DNA Technologies website (<https://eu.idtdna.com/pages>), stem-loop primers were designed for miRNA reverse transcription and ddPCR reactions according to the protocols [48–50]. The mirVana™ miRNA Isolation Kit with phenol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to extract the RNA fraction containing miRNA, the concentration and purity of which were measured spectrophotometrically using NanoDrop. The extracted miRNA fraction was then reversely transcribed using SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), using stem-loop primers and the following protocol: incubation at 16 °C for 30 min; 60 cycles at 30 °C for 30 sec, 42 °C for 30 sec, and 50 °C for 1 sec; incubation at 85 °C for 5 min [51]. To quantify the number of miRNA molecules in the plant samples, a ddPCR mixture composed of 10 µL of ddPCR Super Mix Eva Green, primers (the final concentration of each primer was 200 nM), template (reversely transcribed, elongated miRNA), and RNase-free H₂O was used. A 20 µL reaction mixture was used to generate the reaction droplets in an 8-well cartridge using a QX100 droplet generator (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The droplets were carefully transferred to a 96-well ddPCR plate and heat-sealed with plastic covers with thermal foil (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Then, cDNA was amplified in a T100 PCR thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) under the following cycling conditions: denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles with a three-step thermal profile of denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 58 °C for 30 sec, and extension at 72 °C for 45 sec. Subsequently, the products were kept at 72 °C for 2 min for the final extension. After amplification, the products were cooled to 4 °C for 5 min and then heated to 90 °C for 5 min and finally cooled again to 12 °C. The droplets were quantified in a QX100 droplet reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The data acquisition and analysis were conducted using QuantaSoft version 1.7 software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Positive droplets containing amplification products were distinguished from negative droplets by setting the fluorescence amplitude threshold to the lowest value of the positive droplet cluster. Yeast tRNA-Thr (TGT) molecules with the encoded sequence were added to each RT reaction as an internal control.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate the null hypothesis that a set of normalized expression data for a particular gene and cultivar comes from a normal distribution. To assess the homogeneity of variances, Bartlett's test was used. Two-way analyses of variance (ANOVA) were carried out to determine the main effects of cultivar and time point as well as cultivar \times time point interaction on the variability of the individual expression profiles of the analyzed genes of candidate genes for *Lr46/Yr29*. For comparison of means of expression in each examined time point after inoculation to expression before inoculation, the elementary contrasts were performed, conducted for each cultivar independently. The expression of the analyzed candidate genes is shown as heatmaps. Tukey's Honestly Significant Difference tests (post-hoc factorial one- or two-way ANOVA, depending on ANOVA's results) were performed in R v.4.4.0 [52] using package agricolae v.1.3-7 [53] at $\alpha = 0.05$. We referred to the expression values of the candidate genes miRNAs analyzed as 'relative expression' for the expression level, as our results represent differences in expression compared to the values before inoculation. For visualization of gene expression results, cluster analysis (UPGMA method) with Euclidean distances was performed. All these analyses were conducted using the GenStat statistical software package [54].

Results

Sanger sequencing results

The *Lr46/Yr29* region described in Cobo et al. [29] contains as many as four copies of the *RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE (RLK)* gene and three copies of *GLUCAN ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASES (Glu)* genes, and one copy each of the *SORTING NEXIN (Snx)* and the *WRKY TRANSCRIPTION FACTOR (WRKY)*. The *RLK* and *Glu* genes occur in up to hundreds of copies throughout the wheat genome (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_018294505.1/, https://plants.ensembl.org/Triticum_ aestivum/Info/Index). In addition, very similar gene arrangements are found on the two homoeologous chromosomes 1A and 1D in the same region as on 1B (Fig 1). Sequence similarity analysis of the *Lr46-Glu3* amplicon after Sanger sequencing also revealed the presence of copies on chromosomes 2A, 2B, and 2D. Therefore, a comparison was made of only those few copies of genes found in the region described, on chromosome 1B. These genes are highly differentiated, and it was not possible to design universal primers for them. Therefore, specific primers were designed, for each copy of the gene.

Analytical sequencing succeeded in obtaining the sequences for the majority of the target amplicons (Table 3). The full sequences of the obtained amplicons, location, and characterization of candidate genes for the *Lr46/Yr29* gene can be found in S1 File. For the first candidate, *Lr46-Glu1*, the TraesCS1B02G453900.1 sequence was amplified, but with a single nucleotide polymorphism (G) at position 40 compared with the TraesCS1A02G422500.1 sequence (G). For the 'Glenlea' cultivar, we observed a C+G at position 40, yielding a comparable level of amplification of TraesCS1B02G453900.1 and TraesCS1A02G422500.1. The *Lr46-Glu2* gene in the Artigas[®] cultivar amplified the TraesCS1A02G422900.1 sequence (with polymorphic A at position 38) and TraesCS1B02G454200.1 (with polymorphic G at position 38) (Fig 1). In the Glenlea cultivar, the exact TraesCS1A02G422900.1 homolog sequence was amplified (Fig 1). We failed to obtain a sequence that could be read correctly for *Lr46-RLK1* despite exhaustive attempts. For the *Lr46-RLK3*, the sequence of TraesCS1B02G454400.1 gene was amplified, with a small level of homolog TraesCS1D02G431000.1 (position 52) (Fig 1). The last candidate gene analyzed using the Sanger method was *Lr46-WRKY*, for which we obtained an amplicon

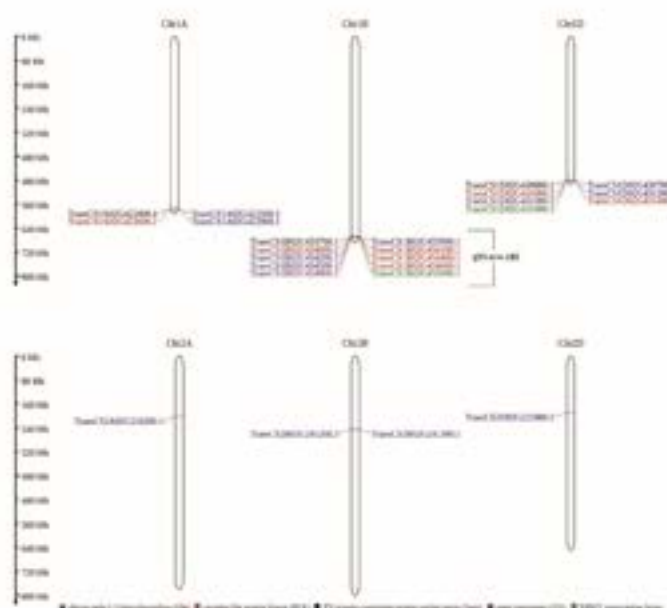


Fig 1. Localization of 10 candidate genes for *Lr46/Yr29* on chromosome 1B and homologues on wheat chromosomes 1A, 1D, 2A, 2B and 2D. Candidate genes for *Lr46/Yr29*, including the *QTr.ncw-1BL* region, have been highlighted by colors as per their biological functions/family identified in the legend (bottom). The selected candidate gene homologues were selected based on comparative analysis following Sanger sequencing of the obtained amplicons. The position of marker *csLV46G22* has also been indicated [29, 55]. 'Ch1A' and similar stand for the name of the chromosome and the abbreviation 'Mb' next to the scale stands for the Megabase unit referring to the physical length of the chromosomes. The genetic map was constructed using the MG2C_v2.1 tool [56].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.g001>

(118 bp) of the *TraesCS1D02G431600.1* gene, thus a homologue of the candidate gene *TraesCS1B02G455000.1* (Fig 1, Table 3, S1 File).

Expression of candidate genes in analyzed varieties at different time-points (hpi)

The qRT-PCR analyses of candidate genes in all studied wheat cultivars and at different time points are summarized as heatmap graphs (Fig 2). The raw data obtained from candidate gene

Table 3. Description of the resulting amplicons and candidate genes for *Lr46/Yr29* by Sanger sequencing.

Candidate gene abbreviation	Gene ID	Fragment length (bp)	Gene length (bp)	Amplified region (bp)	Gene symbol	UniProt accession
<i>Lr46-Glu1</i>	<i>TraesCS1B02G453900.1</i>	102	1722	308–410	LOC123100246	A0A3B5Z521
<i>Lr46-Glu2</i>	<i>TraesCS1B02G454200.1</i>	103	2529	677–779	LOC123148549	A0A3B5Z537
<i>Lr46-Glu3</i>	<i>TraesCS1B02G454300.1</i>	99	1968	635–733	LOC123100285	A0A3B5Z6G2
<i>Lr46-RLK1</i>	<i>TraesCS1B02G454000.2</i>	105	-	-	-	-
<i>Lr46-RLK2</i>	<i>TraesCS1B02G454100.1</i>	114	2526	1935–2047	LOC123148523	A0A3B5Z656
<i>Lr46-RLK3</i>	<i>TraesCS1B02G454400.1</i>	109	2217	1419–1527	LOC123100274	A0A3B5Z530
<i>Lr46-RLK4</i>	<i>TraesCS1B02G454600.1</i>	101	2514	1959–2041	LOC123148523	A0A3B5Z5H2
<i>Lr46-Snec</i>	<i>TraesCS1B02G453700.1</i>	103	3742	278–380	LOC123148452	A0A3B5Z651
<i>Lr46-WRKY</i>	<i>TraesCS1D02G431600.1</i>	118	1226	906–1024	LOC123100317	A0A3B6A1T2

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.t003>

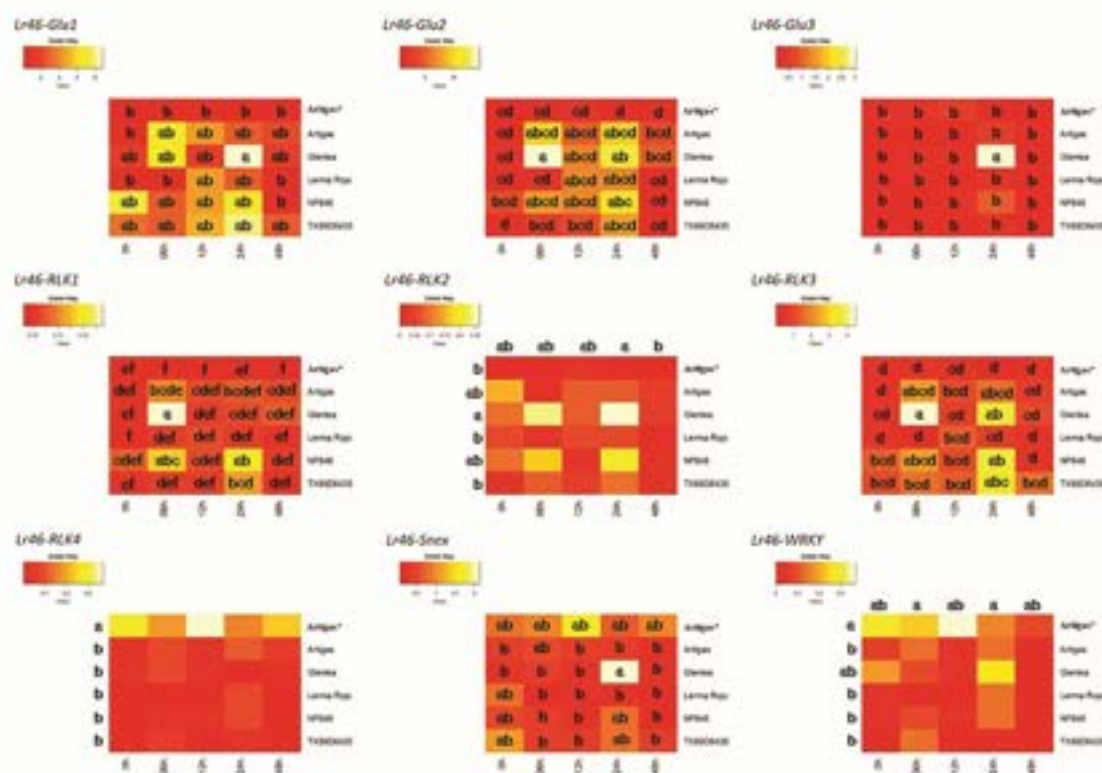


Fig 2. Expression heatmap of the nine *Lr46/Yr29* candidate genes in leaf tissues under *Puccinia triticina* infection. The graphs were generated based on the elemental contrasts carried out for each cultivar independently, and separately for each candidate gene. Tukey's HSD test post ANOVA was carried out and the groups are shown on the heatmap as various letters, for statistically different groups at $\alpha = 0.05$. Groups indicated on the heatmap denote significant interaction of cultivar \times time point (hpi), whereas groups along horizontal axis (time points [hpi]) and/or vertical axis (cultivars) denote significance for single factors but not their interaction. The evaluation included reference cultivars of common wheat (Artigas⁺, Artigas, Glenlea, Lerma Rojo, TX89D6435, and NP846) indicated at the vertical axes at various time points (0, 6, 12, 24, and 48 hpi) identified at horizontal axes. Red indicates lower normalized expression and yellow—higher expression.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.g002>

expression analyses for *Lr46/Yr29* are presented in S1 Table. The elemental contrast values of the candidate genes tested are shown in S2 Table. Regarding the gene *Lr46-Glu1*, its expression varied greatly among the analyzed wheat cultivars as well as among the time points, therefore we did not observe any major common expression pattern (Fig 2). A decrease in the expression level of *Lr46-Glu2* gene was observed immediately after inoculation (6 hpi) for all cultivars except Glenlea. At 12 hpi, a further decrease in *Lr46-Glu2* expression levels was observed for all resistant cultivars (Fig 2). The inflection point occurred at 24 hpi when the defense response was activated for all cultivars. The expression level of *Lr46-Glu2* far exceeded the baseline level (0 hpi). At 48 hpi, the expression level of *Lr46-Glu2* decreased in all cultivars but still exceeded the baseline in Artigas, Glenlea, Lerma Rojo, and TX89D6435 cultivars. For the *Lr46-Glu3* gene, expression before as well as after inoculation was at very low levels (Fig 2). The only exception was the Glenlea cultivar at 24 hpi, where gene expression increased significantly. In the genes *Lr46-RLK1* and *Lr46-RLK2*, the observed expression increased at 6 hpi, shortly after inoculation, then decreased at 12 hpi, and we observed a renewed increase at 24 hpi. The

highest expression levels at 6 hpi and 24 hpi, were observed in the NP846 cultivar and at 6 hpi in the 'Glenlea' (Fig 2). For *Lr46-RLK3*, the highest increases in expression after inoculation were observed in the cultivars TX89D6435 and NP946 at 24 hpi; whereas, in 'Glenlea' at 6 hpi and 24 hpi. However, this gene was expressed at relatively low levels (Fig 2). A special case is the expression of the *Lr46-RLK4* gene, whose highest expression values were observed in the Artigas[®] cultivar, in which, according to our team's study, no molecular markers associated with the resistance conferred by *Lr34*, *Lr46*, or *Lr67* were identified [20, 40]. Expression of the *Lr46-RLK4* gene in the Artigas[®] cultivar was very high already before inoculation at 0 hpi (Fig 2). The *Lr46-Snex* gene showed low expression with two exceptions: at 12 hpi in the Artigas[®] cultivar and at 24 hpi in 'Glenlea' (Fig 2). In the *Lr46-WRKY* gene, we observed the highest values in 'Artigas[®]' at all time points except 48 hpi and in the Glenlea cultivar at 24 hpi (Fig 2). The qRT-PCR analyses of the *Lr46-STR* gene obtained many non-specific PCR products, which was particularly evident in the melt curve; as such, we decided to discard this gene's data from further analyses (Table 2).

A two-way analysis of variance (ANOVA) was performed and identified the differences in the individual expression profiles of the analyzed genes for the cultivars at specific time points (Table 4). An additional source of variation was the cultivar × time point interaction. As each gene has a specific expression level, the analysis of variance was performed for each gene separately (Table 4). Cultivars exhibited unique patterns of gene expression in response to *Pt* infection. For example, 'Glenlea' showed particularly high expression levels for several genes at 24 hpi, whereas 'Lerma Rojo' exhibited relatively low expression levels across the majority of analyzed time points (S1 Table; Fig 2). For the majority of the *Lr46/Yr29* candidate genes, their expression significantly varied in time across the analyzed cultivars. Each gene responded differently to pathogen infection and varied in its expression levels across cultivars and time points. Notably, *Lr46-Glu2* consistently showed high expression levels across all cultivars and time points, indicating its potential importance in the defense response against *Pt*. For the *Lr46-Glu2* gene, we obtained comparably the highest values of mean squares compared to the other candidate genes (Table 4). The results obtained may thus suggest that the *Lr46-Glu2* gene harbors a special role in the *Pt* resistance response. In contrast, *Lr46-Snex* showed relatively low expression levels compared to other genes and exhibited variation across the analyzed time points but not among the cultivars. The analysis across the candidate genes for *Lr46/Yr29* revealed significant effects of both cultivar and time on gene expression in wheat.

Table 4. Mean squares from two-way analysis of variance (ANOVA) for the individual expression profiles of the analyzed genes of candidate genes for *Lr46/Yr29*.

Source of variation	Cultivar	Time point	Cultivar × time point interaction	Residual DF (variable)	Residual
Degrees of freedom (DF)	5	4	20		50
<i>Lr46-Glu1</i>	38.87***	34.65***	13.98*	59	6.35
<i>Lr46-Glu2</i>	93.29***	126.35***	17.02*	60	9.3
<i>Lr46-Glu3</i>	0.8425**	1.791***	0.712***	60	0.24
<i>Lr46-RLK1</i>	0.031***	0.028***	0.009***	59	0.002
<i>Lr46-RLK2</i>	0.034***	0.025***	0.006**	52	0.004
<i>Lr46-RLK3</i>	6.629***	8.579***	2.164***	59	0.746
<i>Lr46-RLK4</i>	0.106***	0.002**	0.006**	57	0.009
<i>Lr46-Snex</i>	0.913**	0.682*	0.478*	60	0.26
<i>Lr46-WRKY</i>	0.082***	0.035*	0.011**	48	0.01

*, **, ***—significant at 0.05, 0.01, 0.001 levels, respectively;

ns—not significant

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.t004>

Notably, the susceptible cultivar Artigas[®] consistently exhibited lower expression levels compared to the resistant cultivars for various analyzed genes, which indicated its distinct gene expression profile under the *Pt* stress. For several analyzed genes, including *Lr46-Glu1* and *Lr46-Glu2*, significant interactions between cultivar and time underscored the dynamic nature of gene expression in response to temporal factors and genetic variation. Post-hoc analysis further elucidated these findings and revealed distinct expression patterns among wheat cultivars across different time points (Fig 2). Resistant cultivars often exhibited comparatively higher expression levels compared to the susceptible control cultivar, thus emphasizing their potential role in mediating wheat's defense response against *Pt*.

A comparison of expression profiles between genes was also attempted by correlation analysis (Fig 3). Among the candidate genes tested, the highest positive correlation was observed for the expression profile between candidate genes: *Lr46-Glu2* and *Lr46-RLK2* (0.794; $p < 0.001$) (Fig 3). There was also a positive correlation for the *Lr46-Glu1* gene between the genes: *Lr46-Glu2*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2* and *Lr46-RLK3*, where there were high correlations between the *Lr46-Glu1* gene and the genes: *Lr46-Glu2* and *Lr46-RLK3* (0.726 and 0.730, respectively; $p < 0.001$) (Fig 3). The *Lr46-Glu2* gene showed positive correlations ($p < 0.001$) with the other candidate genes tested except for genes: *Lr46-RLK4*, *Lr46-Snax*, and *Lr46-WRKY*, where the correlation was close to 0 with $p > 0.05$ (Fig 3). The *Lr46-Glu3* gene showed a positive and statistically significant correlations with the majority of candidate genes except *Lr46-RLK1* and *Lr46-RLK2* (0.108 and 0.093, respectively, not statistically significant). Interestingly, for the genes: *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, and *Lr46-RLK3*, we observed a general

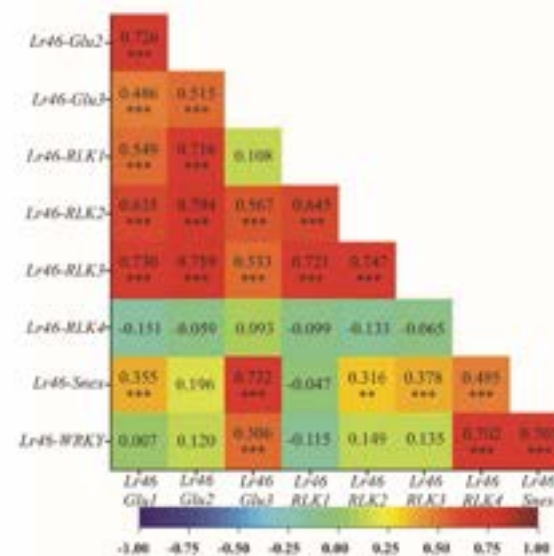


Fig 3. Heat maps of Pearson's linear pairwise correlation coefficients between the observed candidate genes for *Lr46/Yr29* based on the values of their individual expression profiles. Significance of pairwise correlations is marked: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Heatmap color scheme (labeled at the bottom) informs of more positive (red hue) or negative (blue hue) correlations.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.g003>

presence of correlation with *Glu* or *RLK* candidate genes, but general absence of correlation with other candidate genes (Fig 3). However, a distinct trend was observed for *Lr46-RLK4*, where we observed correlations with only two genes: *Lr46-Snex* and *Lr46-WRKY* (0.495 and 0.702, respectively; $p < 0.001$). Interestingly, there was a tendency between the *Lr46-RLK4*, *Lr46-Snex*, and *Lr46-WRKY* genes to correlate with each other (Fig 3). The exception is *Lr46-Snex*, where there is a high correlation also between the *Lr46-Glu3* gene (0.735, $p < 0.001$).

Expression of miRNAs complementary to target candidate genes

Using stem-loop RT-PCR and ddPCR, we performed expression analysis of miRNAs selected from databases as complementary to several candidate genes for *Lr46/Yr29*. Contrast analysis was performed for the expression data of miRNAs, and the resulting elemental contrast values for the expression of miRNAs complementary to the candidate genes can be found in S3 Table. We compared the expression results of the candidate genes with the respective values for the miRNAs complementary to them. According to the databases, *tae-miR9780* is complementary to two candidate genes, *Lr46-Glu2* (TraesCS1B02G454200.1) and *Lr46-RLK2* (TraesCS1B02G454100.1). Towards the *Lr46-Glu2* gene, *tae-miR9775* is also complementary. Unfortunately, the expression of *tae-miR9775* was at a low level and did not allow for confident inferences. In the *Lr46-Glu2* gene, we analyzed the expression of two miRNAs: *tae-miR9780* and *tae-miR5384-3p*. The expression of *tae-miR9780* in the majority of the tested wheat cultivars was at a constant level, both before and after inoculation. The exceptions were the TX89D6435 and Lerma Rojo cultivars where values higher than at 0 hpi were observed (Fig 4). Especially for the TX89D6435 cultivar, the results suggested an up-regulation. The *tae-miR5384-3p* expression showed fairly constant expression levels at all time points. Here, again in the Lerma Rojo cultivar, the miRNA was expressed with values higher than at 0 hpi. At 6 hpi, expression increased with the *Lr46-Glu2* gene, whereas it decreased slightly at 12 hpi with a large increase in its complementary candidate gene expression. On the other hand, at 24 hpi, *tae-miR5384-3p* expression increased again together with an increase in its complementary candidate gene, whereas at 48 hpi we observed a large decrease in *Lr46-Glu2* expression together with an increase in *tae-miR5384-3p* (Fig 4). In the case *Lr46-RLK2*, to which *tae-miR9780* is also complementary, relationships similar to those of *Lr46-Glu2* were observed. The expression of both *Lr46-RLK2* and *tae-miR9780* showed very low values (Fig 5). In contrast, *tae-miR164*, which is complementary to the candidate gene *Lr46-RLK3* (TraesCS1B02G454400.1), showed differential expression at pre- and post-inoculation. The expression of the *Lr46-RLK3* gene and its complementary *tae-miR164* is shown in Fig 6 and suggests that *tae-miR164* is a molecule that may be down-regulating its target gene's expression. In the majority of the tested wheat cultivars, when candidate gene expression increased, then *tae-miR164* was down-regulated, and vice versa: when miRNA expression increased then candidate gene expression was down-regulated (Fig 6).

Discussion

In this study, we attempted to analyze the expression of candidate genes for the *Lr46/Yr29* locus—selected region of *QYr.ucw-1BL* [29]—after inoculation with the fungus *P. tritici* under controlled conditions. Our research hypothesis recognizes that a single causal gene is responsible for the desirable APR-type *Pt* resistance; however, we cannot exclude the alternative hypothesis of a cluster of closely linked resistance genes, each effective against different pathogen(s). Although cloning of these genes would be necessary to provide a conclusive test for this hypothesis, determining the ability of the *QYr.ucw-1BL* region to confer APR against

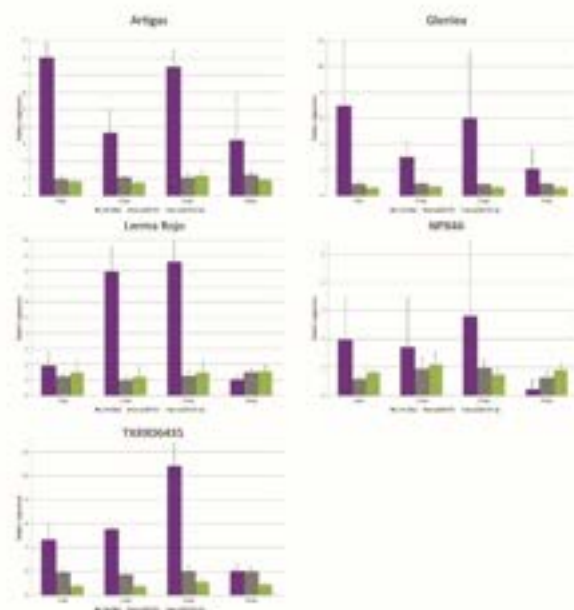


Fig 4. Analysis of complementary miRNAs expression compared to *Lr46-Glu2* expression patterns during *Puccinia triticola* infection. The numbers 6, 12, 24, and 48 stand for hours post inoculation (hpi). The graphs show relative expression values compared to the 0 hpi time point. The error bars indicate the standard error (SE). Data were obtained from the average of three biological replicates, and each biological replicate had three technical replicates, according to the MIQUE protocol.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.g004>

leaf rust, stem rust, and powdery mildew pathogens could provide valuable information to experimentally validate this hypothesis. We functionally examined the candidate genes and most of them were potentially related to plant defense, making it difficult to identify the actual causal gene for *Lr46/Yr29/Sr58*. We were able to analyze the expression profiles for nine out of ten candidate genes encompassed by that locus at five time points (0, 6, 12, 24, and 48 hpi): TraesCS1B02G453900.1, TraesCS1B02G454200.1, TraesCS1B02G454500.1, TraesCS1B02G454000.2, TraesCS1B02G454100.1, TraesCS1B02G454400.1, TraesCS1B02G454600.1, TraesCS1B02G453700.1, and TraesCS1B02G455000.1. Consistent with our research assumption, the highest expression of *Lr46/Yr29* candidate genes occurred at 12 and 24 hpi, as confirmed by literature data for the *Lr* genes [57, 58]. Such an expression profile was obtained for only one candidate gene among the nine studied candidate genes (TraesCS1B02G454200.1; gene abbreviation *Lr46-Glu2*), which may suggest its involvement in the immune response mechanisms to *Pt* infection. Future studies will address this gene's functional validation by gene knockout or overexpression studies, to confirm its role in *Pt* resistance. Similarly, future integration of transcriptomic, proteomic, and metabolomic data could provide a more comprehensive understanding of the molecular mechanisms underlying resistance to *Pt*. Multi-omics approaches enable the identification of key pathways and regulatory networks involved in the defense response, offering novel targets for genetic improvement [59]. Our study explored the expression patterns across various wheat cultivars, whereas their genetic background and specific resistance mechanisms are not thoroughly known. Investigating the genetic diversity and evolutionary history of these cultivars

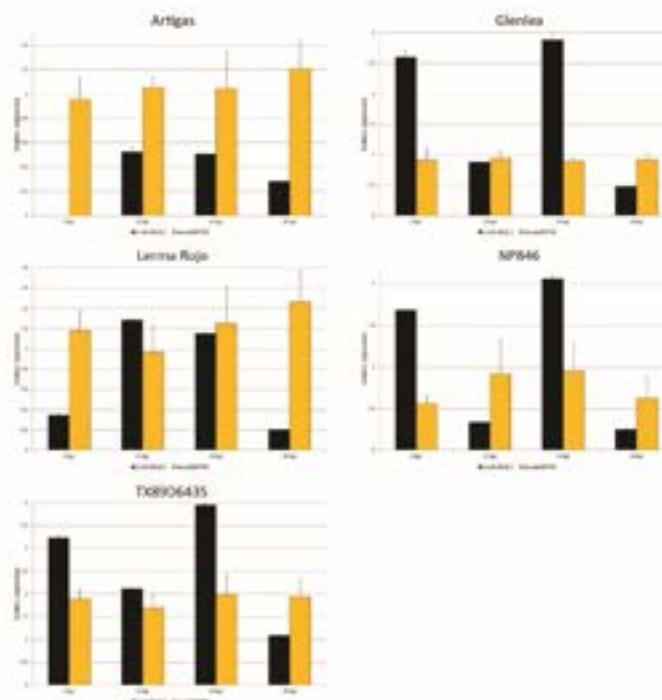


Fig 5. Analysis of complementary miRNA expression compared to *Lr46-RLK2* expression patterns during *Puccinia triticina* infection. The numbers 6, 12, 24 and 48 stand for hours post inoculation (hpi). The graphs show relative expression values compared to the 0 hpi time point. The error bars indicate the standard error (SE). Data were obtained from the average of three biological replicates, and each biological replicate had three technical replicates, according to the MIQE protocol.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.g005>

could provide context for interpreting the observed gene expression patterns. For example, future investigations of the genomic context and copy number variation of candidate genes could elucidate their evolutionary history and functional significance in relation to resistance or other desirable phenotypes.

The study by Prasad et al. [5] meta-analyzed 298 major scientific reports on mechanisms of plant resistance to fungal pathogens, including *Pt*. The authors indicated that the continued search for diverse and durable resistance to *Pt* must be pursued using advanced tools and techniques, including molecular methods. Understanding the molecular basis of plant-pathogen interactions will enable the development of new strategies for *Pt* resistance in common wheat. To date, information on the cloning of the following *Lr* genes has been reported in the literature: *Lr1*, *Lr10*, *Lr21*, *Lr22a*, *Lr34/Yr18/Pm38/Sr57*, and *Lr67/Yr46/Pm46/Sr55* [5, 21, 60–63]. Despite tangible progress in comprehending the molecular basis of *Pt* resistance, the role of miRNAs in modulating gene expression has only been studied for a few major R genes, which included *Lr24*, *Lr28*, and *Sr24* [35, 39, 64, 65]. miRNAs have been shown to perform important roles as negative regulators through repression of translation or degradation of host and/or pathogen target mRNAs [32, 66]. In common wheat, although the role of miRNAs in pathogen resistance has been analyzed, including resistance to *Pt* involving the *Lr46/Yr29* gene [50], very few similar studies have been conducted for genes that confer the APR-type of resistance.

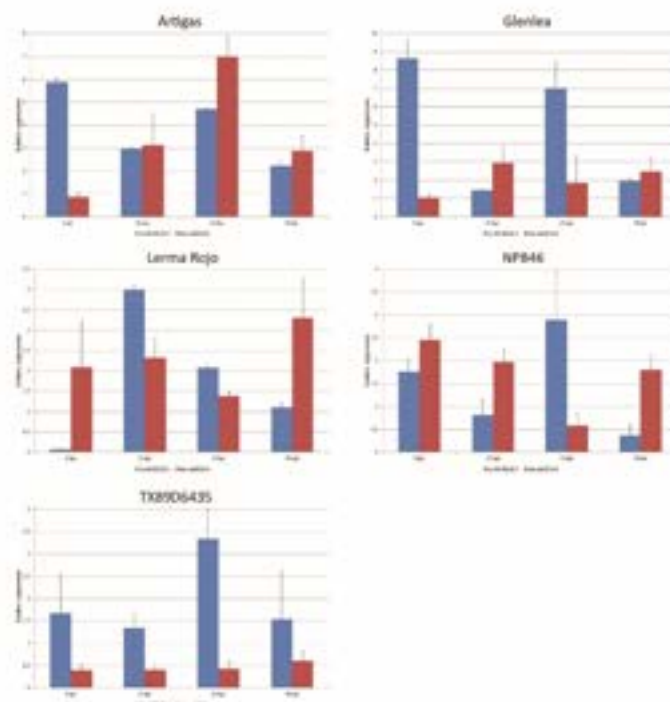


Fig 6. Analysis of complementary miRNA expression compared to *Lr46-RLK3* expression patterns during *Puccinia triticina* infection. The numbers 6, 12, 24 and 48 stand for hours post inoculation (hpi). The graphs show relative expression values compared to the 0 hpi time point. The error bars indicate the standard error (SE). Data were obtained from the average of three biological replicates, and each biological replicate had three technical replicates, according to the MIQE protocol.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944.g006>

The qRT-PCR method is an irreplaceable tool for the amplification, identification, and quantification of nucleic acids. The technique is distinguished by its ability to detect genes and measure gene expression quantitatively and specifically. qRT-PCR is a valued method for both research and diagnostic applications. Cobo et al. [29] highlighted the need to examine the expression in different host plant genotypes with and without pathogen inoculation to determine whether there are differences in candidate gene expression associated with differences in immunity. In the presented study, we report the results of candidate gene expression analyses for *Lr46/Yr29*. Except for the *Lr46-RLK2*, *Lr46-RLK4*, and *Lr46-WRKY* genes, ANOVA indicated interactions in the expression profiles for the remaining six genes between the analyzed wheat cultivars and the time points. In the candidate gene region, three genes have been identified as *GLUCAN ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASES* (TraesCS1B02G453900.1, TraesCS1B02G454200.1, TraesCS1B02G454500.1) [29]. These genes are found in many seed plant species and are involved in plant defense against pathogens, and their expression is often dramatically induced when plants are infected by fungal, bacterial, or viral pathogens [29, 67]. Glucan endo-1,3- β -glucosidases (β -1,3-glucanases) are one of the important hydrolytic enzymes among the pathogenesis-related proteins (PR proteins) that are abundant in many plant species after infection with different types of pathogens [68, 69]. A single plant species may have various homologues of the glucano-1,3- β -glucosidase genes, important for retarding

the growth of pathogenic fungi by the decomposition of their cell walls which contain β -glucans. Glucan endo-1,3- β -glucosidase appears to be overexpressed together with chitinases after fungal infection. The induction of these two hydrolytic enzymes has been described in a number of plant species, including pea, bean, tomato, tobacco, maize, soybean, potato, and wheat [67–72]. Notably, an increase in levels of glucan endo-1,3- β -glucosidase was observed during drought stress [73].

Many *RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE* (*RLK*) gene families can be found in plants. RLKs are membrane proteins located in the extracellular domain of the plant reception networks and are involved in both biotic and abiotic stress responses. The extracellular ligand-binding domain, the transmembrane domain, and the intracellular protein kinase domain are typical components of RLKs. The extracellular domain, which is specific to individual RLKs, binds a particular ligand and allows RLKs to respond to different types of signals. Among the RLKs, variants such as leucine-rich repeats, lectin, lysine motif, or wall-associated kinases are distinguished [74, 75]. RLKs make up the largest known family of protein kinases that are important in the plant response to pathogen infection. Gu et al. [74] discovered a new cysteine-rich RLK gene, *TaCRK2*, which positively regulated resistance to infection caused by *Pt* in wheat. In our study, four of the candidate genes are RLKs (*Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, *Lr46-RLK3*, and *Lr46-RLK4*) and encode proteins important for the recognition of extracellular signals and the initiation of intracellular signaling cascades in reaction to those stimuli [76]. The RLKs in the *Lr46/Yr29* locus encode proteins with two extracellular domains that are characteristic of the subgroup of *CYSTEINE-RICH RECEPTOR KINASES*. [29]. It has been proposed that members of this sub-group may be involved in redox signaling [77]. In a recent study [78], researchers investigated differential gene expression under *Pt* stress, which was analyzed in a close isogenic line carrying the leaf rust resistance gene *Lr57*. The highest number of transcripts undergoing expression was detected at 12 hpi. Interestingly, among these transcripts, a cysteine-rich RLKs expressed only in the resistant genotypes at 12 hpi.

The WRKY family represents another group of transcription factors important in regulating plant responses to stress factors. In *Arabidopsis*, overexpression of *WRKY63/ABO3* [79] and *WRKY57* [80] resulted in increased drought stress tolerance in an ABA-dependent manner. Numerous data indicate that overexpression of genes encoding proteins belonging to the WRKY family also increases dehydration tolerance in crop species [81–83]. Many research papers have described WRKY gene family in crops, including rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum bicolor*), and cabbage (*Brassica rapa*) [76, 84, 85].

Another method that allows expression analysis is ddPCR (droplet digital PCR), referred to as the third-generation PCR method. This technique is characterized by high sensitivity and precision in amplicon detection. The system exclusively reads the target molecules as positive and all others as negative, based on which the number of target molecules in the sample is calculated, without the need to refer to standard curves or a reference gene (in contrast to the qRT-PCR method) [86]. In our work, ddPCR was used to analyze the expression of miRNA molecules: *tae-miR5384-3p*, *tae-miR9780*, *tae-miR9775*, and *tae-miR164*. Previous sequence analysis revealed the involvement of *tae-miR5384-3p* (as well as *tae-miR164* and *tae-miR9679-5p*) in targeting the *TaAFB6* gene (*TraesCS5A02G281100*), which encodes the AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB) protein [87]. This suggested the possibility of post-transcriptional regulation of *TaAFB*-type gene expression. In that study, researchers analyzed the expression of genes of selected AFBs for this purpose by carrying out inoculation with spores of *Pt* taking wheat leaf fragments at five time points (0, 12, 48, 120, and 168 hpi) [87]. The fraction of AFB genes analyzed showed the highest expression at 12 and 48 hpi in both susceptible and resistant isogenic wheat lines. All known *TaAFB*-type genes are involved in the auxin-activated signaling pathway that results in the ubiquitination process [87].

The *tae-miR5384-3p* can inhibit a number of genes in the TaFAB2 subfamily, which are associated with the formation of unsaturated fatty acids that play an important role in plant development and in response to biotic and abiotic stresses [88]. In contrast, *tae-miR5384-3p* showed a very high increase in expression after treating wheat seedlings with a chitosan suspension [89]. The type of fluctuating relative expression profiles is commonly observed for small RNA sequencing or qPCR-based miRNA expression analysis under different biotic and abiotic stress conditions [90]. Such a phenomenon may relate to changing defense mechanisms in the early and late stages of the plant response. A recent study [91] used computational methods to investigate the interaction between the wheat miRNA transcriptome and mosaic viruses in wheat. In wheat streak mosaic virus (WSMV) and wheat mosaic virus (TriMV) infections, three miRNAs (including *tae-miR5384-3p*) were among the most up-regulated miRNAs. This may suggest the involvement of this miRNA in the overall immune response in wheat.

The miR164 family is one of the most conserved groups of miRNAs in plants [92]. One miRNA molecule can control multiple target genes, similar to plant transcription factors. Previous studies have shown that miR164 targets plant-specific NAC transcription factors [93]. The majority of NACs play an essential role in the regulation of plant development and the response to abiotic and biotic stresses. The functions of miR164 have been associated with plant responses to biotic stresses. The main function attributed to miR164 is to regulate transcript levels of relevant genes [92, 94, 95]. This miRNA also targets *Lr46-RLK3* candidate gene. In our study, in the majority of tested wheat cultivars, when candidate gene expression increased, *tae-miR164* was down-regulated, and vice versa: when miRNA expression increased, the candidate gene expression values were down-regulated. The decrease in *tae-miR164* may be related to the activation of *Lr46-RLK3* gene-dependent immune mechanisms, observed as a rapid gene response to the pathogen. Moreover, we observed similar relationships in our previous work on *tae-miR164* [50]. Exploring the regulatory networks involving miRNAs and their target genes in the future could uncover additional layers of complexity in the defense responses of wheat to *Pt*.

Conclusions

In this study, we tracked down the desirable APR-type *Pt* resistance in wheat conferred by a single gene(s). Our qRT-PCR experiment successfully studied the expression of nine analyzed candidate genes encompassed by the *Lr46/Yr29* locus, except the candidate gene *Lr46-STr*. Among these genes, the least differential expression profile was observed for the candidate gene *Lr46-Glu2*, with an increase in its expression after 24 hours, which may suggest activation of the defense response in all resistant cultivars. The expression level of *Lr46-Glu2* far exceeded the pre-inoculation baseline. After 48 hpi, the expression level of *Lr46-Glu2* declined in all cultivars but in cultivars Artigas, Glenlea, Lerma Rojo, and TX89D6435 it still exceeded the pre-inoculation baseline. The possibility that the expression of the candidate gene *Lr46-Glu2* was controlled by *tae-miR5384-3p* was observed: For the cultivars Glenlea and NP846 at all time points at which the expression of this gene increases, the expression of its complementary *tae-miR5384-3p* decreases. Conversely, when the expression of *Lr46-Glu2* decreased, the expression of *tae-miR5384-3p* increased. For other cultivars, similar patterns were observed only at specific time points: Artigas (6 hpi), Lerma Rojo (12 hpi), and TX89D6435 (6 hpi and 12 hpi). Our research highlights the need to understand the molecular basis of plant-pathogen interactions, and this will enable the development of new strategies for *Pt* resistance. Cloning and functional analyses of the *Lr46/Yr29* locus are essential to determine the allelic variation of the gene(s) and to establish their function(s). Obtaining more information and knowing the gene

sequence that confers *Pt* resistance would enable the development of more specific molecular markers for *Lr46/Yr29*, which would facilitate line selection in wheat resistance breeding.

Supporting information

S1 File. Characterization of the obtained amplicons (candidate genes for *Lr46/Yr29*) by Sanger sequencing.

(PDF)

S1 Table. Expression of the nine *Lr46/Yr29* candidate genes in leaf tissues under *Puccinia triticina* infection.

(PDF)

S2 Table. Elemental contrast values for candidate genes expression. The table shows the elemental contrasts for each cultivar independently in order to compare mean expression at each time point tested after inoculation to expression before inoculation.

(PDF)

S3 Table. Elemental contrast values for expression of miRNA molecules complementary to candidate genes. The table shows the elemental contrasts for each cultivar independently to compare the average expression at each time point tested after inoculation with the expression before inoculation.

(PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Agnieszka Tomkowiak, Michał Tomasz Kwiatek.

Data curation: Julia Spychała, Agnieszka Tomkowiak, Sandra Rychel-Bielska, Jan Bocianowski.

Formal analysis: Julia Spychała, Agnieszka Tomkowiak, Marcin Nowicki.

Funding acquisition: Michał Tomasz Kwiatek.

Investigation: Julia Spychała, Aleksandra Noweiska, Roksana Bobrowska, Łukasz Wolko.

Methodology: Julia Spychała, Sandra Rychel-Bielska, Łukasz Wolko.

Project administration: Roksana Bobrowska.

Software: Jan Bocianowski.

Supervision: Agnieszka Tomkowiak.

Validation: Michał Tomasz Kwiatek.

Writing – original draft: Julia Spychała, Marcin Nowicki.

Writing – review & editing: Julia Spychała, Agnieszka Tomkowiak, Aleksandra Noweiska, Sandra Rychel-Bielska, Jan Bocianowski, Przemysław Łukasz Kowalczewski, Marcin Nowicki, Michał Tomasz Kwiatek.

References

1. Ahmar S, Gill RA, Jung K-H, Faheem A, Qasim MJ, Mubeen M, et al. Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: Recent advances and future outlook. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(7):2590. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590> PMID: 32276445

2. Bokore FE, Cuthbert RD, Knox RE, Hebert CW, Pozniak CJ, Berrales S, et al. Genetic mapping of leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks) resistance genes in six Canadian spring wheat cultivars. *Frontiers in Plant Science*. 2023; 14:1130768. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1130768> PMID: 37021307
3. Walkowiak S, Gao L, Monat C, Habener G, Kassa MT, Brinton J, et al. Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. *Nature*. 2020; 586(7837):277–83. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2961-x> PMID: 33239791
4. Ellis JG, Lagudah ES, Spielmeier W, Dodds PN. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in plant science*. 2014; 5:641. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00641> PMID: 25505474
5. Prasad P, Savadi S, Bhardwaj S, Gupta P. The progress of leaf rust research in wheat. *Fungal Biology*. 2020; 124(6):537–50. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.013> PMID: 32448445
6. Kolmer J, Lagudah E, Lillemo M, Lin M, Bai G. The Lr46 gene conditions partial adult-plant resistance to stripe rust, stem rust, and powdery mildew in Thatcher wheat. *Crop Science*. 2015; 55(6):2557–65. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.02.0082>
7. Raza A, Razaq A, Mehmood SS, Zou X, Zhang X, Lv Y, et al. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. *Plants*. 2018; 8(2):34. <https://doi.org/10.3390/plants8020034> PMID: 30704089
8. Petersen G, Seberg O, Yde M, Barthelsen K. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2006; 39(1):70–82. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.01.023> PMID: 16504543
9. Alonge M, Shumate A, Puiu D, Zimin AV, Salzberg SL. Chromosome-scale assembly of the bread wheat genome reveals thousands of additional gene copies. *Genetics*. 2020; 216(2):599–608. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303501> PMID: 32796007
10. Juery C, Conda L, De Oliveira R, Papon N, Ramirez-González R, Benhamed M, et al. New insights into homeologous copy number variations in the hexaploid wheat genome. *The Plant Genome*. 2021; 14(1):e20069. <https://doi.org/10.1002/pg2.20069> PMID: 33155760
11. Kumar S, Bhardwaj SC, Gangwar OP, Sharma A, Qureshi N, Kumaran VV, et al. Lr82: A new and widely effective source of leaf rust resistance of wheat for enhancing diversity of resistance among modern cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 2021; 134:849–58. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03735-5> PMID: 33388887
12. Qureshi N, Bariana H, Kumran VV, Muruga S, Forrest KL, Hayden MJ, et al. A new leaf rust resistance gene Lr79 mapped in chromosome 3BL from the durum wheat landrace Aus26582. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018; 131:1091–8. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3060-3> PMID: 29396589
13. Li H, Hua L, Zhao S, Hao M, Song R, Pang S, et al. Cloning of the wheat leaf rust resistance gene Lr47 introgressed from *Aegilops speltoides*. *Nature Communications*. 2023; 14(1):6072. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41833-2> PMID: 37770474
14. Krattinger SG, Kang J, Bräunlich S, Boni R, Chauhan H, Selter LL, et al. Abscisic acid is a substrate of the ABC transporter encoded by the durable wheat disease resistance gene Lr34. *New Phytologist*. 2019; 223(2):653–66. <https://doi.org/10.1111/nph.15815> PMID: 30913300
15. Cloutier S, Reimer E, Khadka B, McCallum BD. Variations in exons 11 and 12 of the multi-pest resistance wheat gene Lr34 are independently additive for leaf rust resistance. *Frontiers in Plant Science*. 2023; 13:1061490. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1061490> PMID: 36910459
16. Herrera-Foessel SA, Singh RP, Huerta-Espino J, Rosewarne GM, Periyannan SK, Viccari L, et al. Lr68: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012; 124:1475–86. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1802-1> PMID: 22297565
17. Reynolds MP, Braun H-J. *Wheat improvement: food security in a changing climate*. Braun MPRaH-J, editor. Cham: Springer International Publishing; 2022.
18. Vikas V, Pradhan AK, Budhlakoti N, Mishra DC, Chandra T, Bhardwaj S, et al. Multi-locus genome-wide association studies (ML-GWAS) reveal novel genomic regions associated with seedling and adult plant stage leaf rust resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Heredity*. 2022; 128(6):434–49. <https://doi.org/10.1038/s41437-022-00525-1> PMID: 35418669
19. Ye B, Singh RP, Yuan C, Liu D, Randhawa MS, Huerta-Espino J, et al. Three co-located resistance genes confer resistance to leaf rust and stripe rust in wheat variety Borlaug 100. *The Crop Journal*. 2022; 10(2):490–7. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.07.004>
20. Bobrowska R, Noweiska A, Spychala J, Tomkowiak A, Nawracala J, Kwiatek MT. Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the Lr46/Yr29 “slow rusting” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biomolecular Concepts*. 2022; 13(1):1–9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002> PMID: 35212495

21. Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, et al. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*. 2009; 323(5919):1360–3. <https://doi.org/10.1126/science.1166453> PMID: 19229000
22. Kumar S, Singh RP, Joshi AK, Röder MS, Chhuneja P, Mavi GS, et al. Association of Lr34 gene complex with spot blotch disease resistance at molecular level in wheat (*Triticum aestivum* L.). *INDIAN JOURNAL OF GENETICS AND PLANT BREEDING*. 2018; 78(03):302–8. <https://doi.org/10.31742/IJGPB.78.3.11>
23. Lagudah ES, Krattinger SG, Herrera-Foessel S, Singh RP, Huerta-Espino J, Spielmeier W, et al. Gene-specific markers for the wheat gene Lr34/Yr18/Pm38 which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics*. 2009; 119:889–98. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1097-z> PMID: 19578829
24. Lillemo M, Asaf B, Singh R, Huerta-Espino J, Chen X, He Z, et al. The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 and Lr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006; 116:1155–66. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0743-1> PMID: 18347772
25. Aktar-Uz-Zaman M, Tuhina-Khatun M, Hanafi MM, Sahebi M. Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: An overview. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2017; 31(3):431–45. <https://doi.org/10.1080/13102816.2017.1304180>
26. Bokore FE, Knox RE, Hiebert CW, Culbert RD, DePauw RM, Meyer B, et al. A combination of leaf rust resistance genes, including Lr34 and Lr46, is the key to the durable resistance of the Canadian wheat cultivar, Carberry. *Frontiers in plant science*. 2022; 12:775383. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.775383> PMID: 35069630
27. Lillemo M, Joshi AK, Prasad R, Chand R, Singh RP. QTL for spot blotch resistance in bread wheat line Saar co-locate to the biotrophic disease resistance loci Lr34 and Lr46. *Theoretical and applied genetics*. 2013; 126:711–9. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-2012-6> PMID: 23139144
28. William M, Singh R, Huerta-Espino J, Islas SO, Hoisington D. Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene Lr46 and its association with stripe rust resistance gene Yr29 in wheat. *Phytopathology*. 2003; 93(2):153–9. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.2.153> PMID: 18943129
29. Cobo N, Wanjugi H, Lagudah E, Dubcovsky J. A high-resolution map of wheat QYr.ucw-1BL, an adult plant stripe rust resistance locus in the same chromosomal region as Yr29. *The plant genome*. 2019; 12(1):180055. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.08.0055> PMID: 30951084
30. Tong J, Zhao C, Liu D, Jambuthenne DT, Sun M, Dinglasan E, et al. Genome-wide atlas of rust resistance loci in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2024; 137(8):179. <https://doi.org/10.1007/s00122-024-04689-8> PMID: 38980436
31. Budak H, Khan Z, Kantar M. History and current status of wheat miRNAs using next-generation sequencing and their roles in development and stress. *Briefings in functional genomics*. 2015; 14(3):189–98. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elu021> PMID: 24962995
32. Feng H, Wang B, Zhang Q, Fu Y, Huang L, Wang X, et al. Exploration of microRNAs and their targets engaging in the resistance interaction between wheat and stripe rust. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 6:469. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00469> PMID: 26175740
33. Inal B, Türktas M, Eren H, Ihan E, Okay S, Atik M, et al. Genome-wide fungal stress responsive miRNA expression in wheat. *Planta*. 2014; 240:1287–98. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2153-8> PMID: 25156489
34. Li Y-F, Wei K, Wang M, Wang L, Cui J, Zhang D, et al. Identification and temporal expression analysis of conserved and novel microRNAs in the leaves of winter wheat grown in the field. *Frontiers in Genetics*. 2019; 10:779. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00779> PMID: 31552091
35. Gupta OP, Parmar V, Koundal V, Singh UD, Praveen S. MicroRNA regulated defense responses in *Triticum aestivum* L. during *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* infection. *Molecular Biology Reports*. 2012; 39:817–24. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0803-5> PMID: 21633895
36. Budak H, Akpinar BA. Plant miRNAs: Biogenesis, organization and origins. *Functional & integrative genomics*. 2015; 15:523–31. <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0451-2> PMID: 26113396
37. Budak H, Kantar M, Bulut R, Akpinar BA. Stress responsive miRNAs and lscRNAs in cereals. *Plant science*. 2015; 235:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.008> PMID: 25900961
38. Sunkar R, Li Y-F, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in plant science*. 2012; 17(4):196–203. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.010> PMID: 22365260
39. Kumar D, Dutta S, Singh D, Prabhu KV, Kumar M, Mukhopadhyay K. Uncovering leaf rust responsive miRNAs in wheat (*Triticum aestivum* L.) using high-throughput sequencing and prediction of their targets through degradome analysis. *Planta*. 2017; 245:161–82. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2600-9> PMID: 27699487

40. Spychala J, Tomkowiak A, Nowelska A, Bobrowska R, Bocianowski J, Książkiewicz M, et al. Expression profiling of the slow rusting resistance genes *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and associated miRNAs patterns. *Genes*. 2023; 14(7):1376. <https://doi.org/10.3390/genes14071376> PMID: 37510281
41. Kwiatek MT, Ulaszewski W, Beiter J, Phillips D, Skowrońska R, Nowelska A, et al. Development and cytomechanical identification of monosomic alien addition and substitution lines of *Triticale* (** Triticosecale* Wittmack) with 2Sk chromosome conferring leaf rust resistance derived from *Aegilops kotschyi* Boiss. *Frontiers in Plant Science*. 2020; 11:509481. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481> PMID: 33381128
42. Consortium IWGS, Appels R, Eversole K, Stein N, Feuillet C, Keller B, et al. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*. 2018; 361(6403):eaar7191. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191> PMID: 30115783
43. Rychel-Bielska S, Plewiński P, Kozak B, Galek R, Książkiewicz M. Photoperiod and vernalization control of flowering-related genes: a case study of the narrow-leaved Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2020; 11:572135. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572135> PMID: 33193508
44. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum information for Publication of quantitative Real-Time PCR experiments. Oxford University Press; 2009.
45. Scholtz JJ, Visser B. Reference gene selection for qPCR gene expression analysis of rust-infected wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2013; 81:22–5. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2012.10.006>
46. Xie L-h, Qian X, Zhang J, Yang Y-y, Sun R-h, Xia M-c, et al. Selection of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in the process of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* infecting wheat. *The plant pathology journal*. 2019; 35(1):11. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2018.0038> PMID: 30828275
47. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012; 28(12):1647–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199> PMID: 22543367
48. Forero DA, González-Giraldo Y, Castro-Vega LJ, Barreto GE. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *Biotechniques*. 2019; 67(4):192–9. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0065> PMID: 31560239
49. Kramer MF. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current protocols in molecular biology*. 2011; 95(1):15.0.1–0. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1510s05> PMID: 21732315
50. Tomkowiak A, Jędrzejewski T, Spychala J, Kuczyński J, Kwiatek MT, Tyczewska A, et al. Analysis of miRNA expression associated with the *Lr46* gene responsible for APR resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics*. 2020; 61(4):503–11. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00573-5> PMID: 32812165
51. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*. 2007; 3:1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12> PMID: 17931426
52. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020.
53. de Mendiburu MF. Package 'agricolae'. R Package, version 2019, p. 1143–49.
54. International V. GenStat for Windows. Hemel Hempstead, UK: VSN International; 2023.
55. Ren Y, Singh RP, Basnet B, Lan C, Huerta-Espino J, Lagudah E, et al. Identification and mapping of adult plant resistance loci to leaf rust and stripe rust in common wheat cultivar Kunden. *Plant Disease*. 2017; 101(3):456–63. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0890-RE> PMID: 30677352
56. Chao J, Li Z, Sun Y, Aluko OO, Wu X, Wang Q, et al. MG2C: A user-friendly online tool for drawing genetic maps. *Molecular horticulture*. 2021; 1:1–4.
57. Casassola A, Brammer SP, Chaves MS, Martinelli JA, Stefanato F, Boyd LA. 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*. 2015; 89:49–54. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2014.12.004> PMID: 25892845
58. Milne RJ, Dibley KE, Schnippenkoetter W, Mascher M, Lui AC, Wang L, et al. The wheat *Lr67* gene from the sugar transport protein 13 family confers multipathogen resistance in barley. *Plant Physiology*. 2019; 179(4):1285–97. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00945> PMID: 30305371
59. Shah T, Xu J, Zou X, Cheng Y, Nasir M, Zhang X. Omics approaches for engineering wheat production under abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(8):2390. <https://doi.org/10.3390/ijms19082390> PMID: 30110906

60. Cloutier S, McCallum BD, Loutre C, Banks TW, Wicker T, Feuillet C, et al. Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. *Plant molecular biology*. 2007; 65:93–106. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9201-6> PMID: 17611798
61. Huang L, Brooks SA, Li W, Fellers JP, Trick HN, Gill BS. Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics*. 2003; 164(2):655–64. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.2.655> PMID: 12907786
62. Moore JW, Herrera-Foessel S, Lan C, Schnippenkoetter W, Ayliffe M, Huerta-Espino J, et al. A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature genetics*. 2015; 47(12):1494–8. <https://doi.org/10.1038/ng.3439> PMID: 26551671
63. Thind AK, Wicker T, Šimková H, Fossati D, Moullet O, Brabant C, et al. Rapid cloning of genes in hexaploid wheat using cultivar-specific long-range chromosome assembly. *Nature Biotechnology*. 2017; 35(8):793–6. <https://doi.org/10.1038/nbt.3877> PMID: 28504667
64. Jain N, Sinha N, Krishna H, Singh PK, Gautam T, Prasad P, et al. A study of miRNAs and lncRNAs during *Lr28*-mediated resistance against leaf rust in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2020; 112:101552. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2020.101552>
65. Kumar D, Singh D, Kanodia P, Prabhu KV, Kumar M, Mukhopadhyay K. Discovery of novel leaf rust responsive microRNAs in wheat and prediction of their target genes. *Journal of Nucleic Acids*. 2014; 2014(1):570176. <https://doi.org/10.1155/2014/570176> PMID: 25180085
66. Dutta S, Jha SK, Prabhu KV, Kumar M, Mukhopadhyay K. Leaf rust (*Puccinia triticina*) mediated RNAi in wheat (*Triticum aestivum* L.) prompting host susceptibility. *Functional & Integrative Genomics*. 2019; 19:437–52. <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00655-6> PMID: 30671704
67. Kebede A, Kebede M. *In silico* analysis of promoter region and regulatory elements of glucan endo-1,3-beta-glucosidase encoding genes in *Solanum tuberosum*: cultivar DM 1-3 516 R44. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021; 19(1):145. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00240-0> PMID: 34591228
68. Cheong YH, Kim CY, Chun HU, Moon BC, Park HC, Kim JK, et al. Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. *Plant Science*. 2000; 154(1):71–81. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00187-4) PMID: 10723560
69. Doxey AC, Yaish MW, Moffatt BA, Griffith M, McConkey BJ. Functional divergence in the Arabidopsis β -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24(4):1045–55. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm024> PMID: 17272678
70. Bettini P, Così E, Pellegrini MG, Turbanti L, Vendramin G, Buiatti M. Modification of competence for *in vitro* response to *Fusarium oxysporum* in tomato cells. III. PR-protein gene expression and ethylene evolution in tomato cell lines transgenic for phytohormone-related bacterial genes. *Theoretical and applied genetics*. 1998; 97:575–83. <https://doi.org/10.1007/s001220050933>
71. Confortin TC, Spannemberg SS, Todero I, Luft L, Brun T, Alves EA, et al. Microbial enzymes as control agents of diseases and pests in organic agriculture. In: Pandey VKGaA, editor. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdam: Elsevier; 2019. p. 321–32.
72. Li W, Faris J, Muthukrishnan S, Liu D, Chen P, Gill B. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001; 102:353–62. <https://doi.org/10.1007/s001220051653>
73. Bernardo L, Morcia C, Carletti P, Ghizzoni R, Badeck FW, Rizza F, et al. Proteomic insight into the mitigation of wheat root drought stress by arbuscular mycorrhizae. *Journal of Proteomics*. 2017; 189:21–32. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.024> PMID: 28366879
74. Gu J, Sun J, Liu N, Sun X, Liu C, Wu L, et al. A novel cysteine-rich receptor-like kinase gene, TaCRK2, contributes to leaf rust resistance in wheat. *Molecular Plant Pathology*. 2020; 21(5):732–46. <https://doi.org/10.1111/mpp.12929> PMID: 32196909
75. Yan J, Su P, Meng X, Liu P. Phylogeny of the plant receptor-like kinase (RLK) gene family and expression analysis of wheat RLK genes in response to biotic and abiotic stresses. *BMC Genomics*. 2023; 24(1):224. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09303-7> PMID: 37127571
76. Chen F, Hu Y, Vannozzi A, Wu K, Cai H, Qin Y, et al. The WRKY transcription factor family in model plants and crops. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2017; 36(5–6):311–35. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1441103>
77. Chen Z. A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats. *Plant physiology*. 2001; 126(2):473–6. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.473> PMID: 11402176
78. Yadav IS, Sharma A, Kaur S, Nahar N, Bhardwaj SC, Sharma TR, et al. Comparative temporal transcriptome profiling of wheat near isogenic line carrying Lr 57 under compatible and incompatible interactions. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7:1943. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01943> PMID: 28066494

79. Ren X, Chen Z, Liu Y, Zhang H, Zhang M, Liu Q, et al. ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2010; 63(3):417–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2010.04248.x> PMID: 20487379
80. Jiang Y, Liang G, Yu D. Activated expression of WRKY57 confers drought tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular plant*. 2012; 5(6):1375–88. <https://doi.org/10.1093/mp/sss080> PMID: 22930734
81. Khoso MA, Hussain A, Ritonga FN, Ali Q, Channa MM, Aishegahi RM, et al. WRKY transcription factors (TFs): Molecular switches to regulate drought, temperature, and salinity stresses in plants. *Frontiers in plant science*. 2022; 13:1039329. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1039329> PMID: 36426143
82. Song H, Wang P, Hou L, Zhao S, Zhao C, Xia H, et al. Global analysis of WRKY genes and their response to dehydration and salt stress in soybean. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7:8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00009> PMID: 26870047
83. Wang C-T, Fu J-N, Liu Y-W, Li M, Zhao D, Yang J-F, et al. Maize WRKY transcription factor ZmWRKY106 confers drought and heat tolerance in transgenic plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(10):3046. <https://doi.org/10.3390/ijms19103046> PMID: 30301220
84. Jiang J, Ma S, Ye N, Jiang M, Cao J, Zhang J. WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *Journal of integrative plant biology*. 2017; 59(2):86–101. <https://doi.org/10.1111/jipb.12513> PMID: 27995748
85. Tripathi P, Rabara RC, Rushton PJ. A systems biology perspective on the role of WRKY transcription factors in drought responses in plants. *Planta*. 2014; 239:255–88. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1985-y> PMID: 24148023
86. Jouarin A, Tenorio-Berrio R, Schaart JG, Leigh F, Visser RG, Smulders MJ. Optimisation of droplet digital PCR for determining copy number variation of α -gladin genes in mutant and gene-edited polyploid bread wheat. *Journal of Cereal Science*. 2020; 92:102903. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102903>
87. Gidhi A, Mohapatra A, Fatima M, Jha SK, Kumar M, Mukhopadhyay K. Insights of auxin signaling 1-box genes in wheat (*Triticum aestivum*L.) and their dynamic expression during the leaf rust infection. *Protoplasma*. 2023; 260(3):723–39. <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01808-4> PMID: 36100728
88. Hajahmadi Z, Abedi A, Wei H, Sun W, Ruan H, Zhuge Q, et al. Identification, evolution, expression, and docking studies of fatty acid desaturase genes in wheat (*Triticum aestivum*L.). *BMC Genomics*. 2020; 21:1–20. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07199-1> PMID: 33167859
89. Zhang L, Wang K, Han Y, Yan L, Zheng Y, Bi Z, et al. Genome-wide analysis of the VQ motif-containing gene family and expression profiles during phytohormones and abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum*L.). *BMC Genomics*. 2022; 23(1):292. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08519-3> PMID: 35410124
90. Pandey R, Joshi G, Bhardwaj AR, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S. A comprehensive genome-wide study on tissue-specific and abiotic stress-specific miRNAs in *Triticum aestivum*. *PLoS one*. 2014; 9(4):e95800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095800> PMID: 24759739
91. Soylu I, Lakshman DK, Tatineri S, Galvez LC, Mitra A. Differential regulation of miRNAs involved in the susceptible and resistance responses of wheat cultivars to wheat streak mosaic virus and *Triticum mosaic virus*. *BMC genomics*. 2024; 25(1):221. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10128-1> PMID: 39418960
92. Feng H, Duan X, Zhang Q, Li X, Wang B, Huang L, et al. The target gene of *tae-miR164*, a novel NAC transcription factor from the NAM subfamily, negatively regulates resistance of wheat to stripe rust. *Molecular plant pathology*. 2014; 15(3):284–96. <https://doi.org/10.1111/mpp.12089> PMID: 24128392
93. Chi Q, Du L-y, Ma W, Niu R-y, Wu B-w, Guo L-j, et al. The miR164-TaNAC14 module regulates root development and abiotic-stress tolerance in wheat seedlings. *Journal of Integrative Agriculture*. 2023; 22(4):981–98. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.08.016>
94. Bazzini A, Hopp H, Beachy R, Asurmendi S. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(29):12157–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705114104> PMID: 17615233
95. Jia X, Ren L, Chen Q-J, Li R, Tang G. UV-B-responsive microRNAs in *Populus tremula*. *Journal of plant physiology*. 2009; 166(18):2046–57. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.06.011> PMID: 19628301

Supplementary Materials S1. Description of the obtained amplicons (candidate genes for *Lr46/Tr29*) by Sanger sequencing.

1. TraesCS1B02G453900.1 (*Lr46-Glu1*) - partial CDS

SEQUENCE ID: XM_044522204.1
GENE SYMBOL: LOC123100246
SOURCE: Triticum aestivum (bread wheat)
ORGANISM: Triticum aestivum
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;
Magnoliopsida; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooidae; Triticoideae; Triticeae;
Triticinae; Triticum.
CHROMOSOME: 1B
GENE LENGTH: 1722 bp
PROTEIN: glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase
BIOLOGICAL PROCESS: carbohydrate metabolism process
UniProt ACCESSION: A0A3B5Z521
CULTIVAR: Artigas (PI 73046); Glenlea (Citr 17272)
TEMPLATE: mRNA (cDNA)
FRAGMENT LENGTH: 102 bp
GENE REGION: 308 – 410 bp
REFERENCE GENOME: Triticum aestivum (taxid: 4565)
CDS sequence:
GGTGCAGAGCAATGTGAAGGCCTACTACCCGGCCACGCTGATCAATGGCGTGACGGTC
GGGAACGAGGTGTTCAAAGAGGCTAGCCAACATAAAGTCTCAGCT

2. TraesCS1B02G454200.1 (*Lr46-Glu2*) - partial CDS

SEQUENCE ID: XM_044567989.1
GENE SYMBOL: LOC123148549
SOURCE: Triticum aestivum (bread wheat)
ORGANISM: Triticum aestivum
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;
Magnoliopsida; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooidae; Triticoideae; Triticeae;
Triticinae; Triticum.
CHROMOSOME: 1B
GENE LENGTH: 2529 bp
PROTEIN: glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase
BIOLOGICAL PROCESS: carbohydrate metabolism process
UniProt ACCESSION: A0A3B5Z537
CULTIVAR: Artigas (PI 73046)
TEMPLATE: mRNA (cDNA)
FRAGMENT LENGTH: 103 bp
GENE REGION: 677 – 779 bp
REFERENCE GENOME: Triticum aestivum (taxid: 4565)
CDS sequence:
TATCTCTTGTCCGCCCCAACGCTGGCATTCTTGACAGGAATAGCAGGCCAAACGTACTT
CAGCCTCTCGACGCGCAGCTTGACCTGTGTACTATGCGATGG

3. TraesCS1B02G454500.1 (*Lr46-Glu3*) - partial CDS

SEQUENCE ID: XM_044522234.1

GENE SYMBOL: LOC123100285

SOURCE: Triticum aestivum (bread wheat)

ORGANISM: Triticum aestivum

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooideae; Triticoideae; Triticeae; Triticeae; Triticum.

CHROMOSOME: 1B

GENE LENGTH: 1968 bp

PROTEIN: glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase

BIOLOGICAL PROCESS: carbohydrate metabolism process

UniProt ACCESSION: A0A3B5Z6G2

CULTIVAR: Artigas (PI 73046)

TEMPLATE: mRNA (cDNA)

FRAGMENT LENGTH: 99 bp

GENE REGION: 635 – 733 bp

REFERENCE GENOME: Triticum aestivum (taxid: 4565)

CDS sequence:

ACTCCAGACGTCATTCCCGCCATCCGCCGGCGCCTTCAAGGACGACATCGCGCTGTCA
GTGATGAGTCCCATGCTCGACT**TTTTCCGACAGACCGGTTT**

4. TraesCS1B02G454100.1 (*Lr46-RLK2*) - partial CDS with intron

SEQUENCE ID: XM_044567961.1

GENE SYMBOL: LOC123148523

SOURCE: Triticum aestivum (bread wheat)

ORGANISM: Triticum aestivum

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooideae; Triticoideae; Triticeae; Triticeae; Triticum.

CHROMOSOME: 1B

GENE LENGTH: 2526 bp

PROTEIN: Cysteine-rich receptor-like protein kinase

BIOLOGICAL PROCESS: ATP binding, protein kinase activity

UniProt ACCESSION: A0A3B5Z656

CULTIVAR: Glenlea (Cltr 17272)

TEMPLATE: gDNA

FRAGMENT LENGTH: 113 bp (190 bp with intron)

GENE REGION: 1935 – 2047 bp

REFERENCE GENOME: Triticum aestivum (taxid: 4565)

Sequence:

TGAGATCGTGACGGGAAGGAAGAACAACACTGACAGCTACAACCTCCCAACAATCTCAGGA
TCTCCTGACGACC**GTATGTGCTTGTATCTGAATGTCTGACTAACTAACCTGCAGTGCA**
GCTTGGCTCATCGATCCTACAAATCGTGCAGGTATGGGAGCATTGGACGGCCCGGA**ACA**
CTACTGGAGATGCTAG

5. TraesCS1B02G454400.1 (*Lr46-RLK3*) - partial CDS

SEQUENCE ID: XM_044522224.1

GENE SYMBOL: LOC123100274

SOURCE: Triticum aestivum (bread wheat)

ORGANISM: Triticum aestivum

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooideae; Triticoideae; Triticeae; Triticeae; Triticum.

CHROMOSOME: 1B

GENE LENGTH: 2217 bp

PROTEIN: Cysteine-rich receptor-like protein kinase

BIOLOGICAL PROCESS: ATP binding, protein kinase activity

UniProt ACCESSION: A0A3B5Z530

CULTIVAR: Artigas (PI 73046); Glenlea (Ctr 17272)

TEMPLATE: mRNA (cDNA)

FRAGMENT LENGTH: 109 bp

GENE REGION: 1419 – 1527 bp

REFERENCE GENOME: Triticum aestivum (taxid: 4565)

CDS sequence:

CAGGGACCTTAAAGCTAATAATATTCTTCTTGACGAGGAGATGGATCCTAAAATCGCAGACTTTGGATTGGCAAGGCTGCTACAAGAAGGTCACTCATACTCAAACC

6. TraesCS1B02G454600.1 (*Lr46-RLK4*) - partial CDS with intron

SEQUENCE ID: XM_044567973.1

GENE SYMBOL: LOC123148523

SOURCE: Triticum aestivum (bread wheat)

ORGANISM: Triticum aestivum

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooideae; Triticoideae; Triticeae; Triticeae; Triticum.

CHROMOSOME: 1B

GENE LENGTH: 2514 bp

PROTEIN: Cysteine-rich receptor-like protein kinase

BIOLOGICAL PROCESS: ATP binding, protein kinase activity

UniProt ACCESSION: A0A3B5Z5H2

CULTIVAR: Artigas (PI 73046); Glenlea (Ctr 17272)

TEMPLATE: gDNA

FRAGMENT LENGTH: 101 bp (185 bp with intron)

GENE REGION: 1959 – 2041 bp

REFERENCE GENOME: Triticum aestivum (taxid: 4565)

Sequence:

TTACAGCTTTGGCGTATTGCAACTCCCAACAATCTCAGGATCTCCTGACGACCGTACCGTGTCTTATCTGAATGCTGACTAATAACCTGCAGGCTGCAGTGCAGTTTGGCTCATCGATCCTACAAATCGTGCAGGATGTTGGGAGCATTGGACGGCTGGAACAGTACTGGAGATGTAGACCCGT

7. TraesCS1B02G453700.1 (*Lr46-Snex*) - partial CDS

SEQUENCE ID: XM_044567888.1
GENE SYMBOL: LOC123148452
SOURCE: Triticum aestivum (bread wheat)
ORGANISM: Triticum aestivum
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;
Magnoliopsida; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooideae; Triticoideae; Triticeae;
Triticinae; Triticum.
CHROMOSOME: 1B
GENE LENGTH: 3742 bp
PROTEIN: PX domain-containing protein
BIOLOGICAL PROCESS: phosphatidylinositol binding
UniProt ACCESSION: A0A3B5Z651
CULTIVAR: Artigas (PI 73046); Glenlea (Ctr 17272)
TEMPLATE: mRNA (cDNA)
FRAGMENT LENGTH: 103 bp
GENE REGION: 278 – 380 bp
REFERENCE GENOME: Triticum aestivum (taxid: 4565)
CDS sequence:
**CTTTGATAGTTCIGTTTCGGTACCTATCACTTGACTACGACTTCCGTAGAAAAGAGCACA
ACTACCACAGATCGTGATGCCAGTCGCCACTTGCCAAAAACAAA**

8. TraesCS1D02G431600.1 (*Lr46-WKRY*) - partial CDS

SEQUENCE ID: XM_044522263.1
GENE SYMBOL: LOC123100317
SOURCE: Triticum aestivum (bread wheat)
ORGANISM: Triticum aestivum
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;
Magnoliopsida; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooideae; Triticoideae; Triticeae;
Triticinae; Triticum.
CHROMOSOME: 1D
GENE LENGTH: 1226 bp
PROTEIN: WRKY domain-containing protein
BIOLOGICAL PROCESS: WRKY transcription factor
UniProt ACCESSION: A0A3B6A1Y2
CULTIVAR: Artigas (PI 73046); Glenlea (Ctr 17272)
TEMPLATE: mRNA (cDNA)
FRAGMENT LENGTH: 119 bp
GENE REGION: 906 – 1024 bp
REFERENCE GENOME: Triticum aestivum (taxid: 4565)
CDS sequence:
**TTTCTTCGGCTCTTTTGAAGACGATTTTGATCATTCTTCGAGGACGACGCCATTGGGC
GACGGGTCTCGCTGTAGCTAGCTCTATAATATAGCTAKGCAGTACGAGAATTGGTTCCA
C**

Table S1. Expression of the nine *Lr46/Yr29* candidate genes in leaf tissues under *Puccinia triticina* infection.

Cultivar	Time	Gene										
		<i>Lr46-Glu1</i>	<i>Lr46-Glu2</i>	<i>Lr46-Glu3</i>	<i>Lr46-RLK1</i>	<i>Lr46-RLK2</i>	<i>Lr46-RLK3</i>	<i>Lr46-RLK4</i>	<i>Lr46-Shex</i>	<i>Lr46-WTKY</i>		
Artigas	0 hpi	0.397	1.23	0.0561	0.05014	0.15285	0.367	0.03401	0.3761	0.05351		
	6 hpi	6.703	9.859	0.2236	0.1431	N/A	2.159	0.08163	0.5118	0.13082		
	12 hpi	3.825	5.759	0.2569	0.09254	0.08024	1.27	0.04744	0.4117	0.06574		
	24 hpi	2.782	8.893	0.4875	0.11442	0.07759	1.69	0.10608	0.4457	0.13204		
	48 hpi	2.014	3.959	0.2057	0.09472	0.04319	0.817	0.05619	0.3181	0		
Artigas*	0 hpi	0.348	1.126	0.3117	0.0321	0.01264	0.495	0.27904	0.8669	0.28564		
	6 hpi	0.34	0.807	0.2408	0.012	0.01135	0.337	0.18774	0.9122	0.23394		
	12 hpi	0.604	1.665	0.5425	0.01364	0.02826	0.567	0.36805	1.589	0.36823		
	24 hpi	0.237	0.513	0.1401	0.01917	0.00478	0.299	0.15312	0.7222	0.16446		
	48 hpi	0.308	0.674	0.1849	0.01479	0.00156	0.346	0.23592	0.8982	0.08547		
Glenka	0 hpi	1.649	2.103	0.1436	0.036	0.09158	0.515	0.03196	0.3084	0.1859		
	6 hpi	6.297	14.598	0.2304	0.32871	0.23868	4.465	0.09341	0.3978	0.08263		
	12 hpi	1.514	6.302	0.3355	0.06937	0.08022	0.738	0.04009	0.2942	0.03148		
	24 hpi	8.847	12.624	3.0216	0.08099	0.26447	3.621	0.00342	2.1263	0.25595		
	48 hpi	1.526	4.313	0.1278	0.09752	0.04397	1.011	0.03725	0.3189	0		
Lerma Rojo	0 hpi	0.602	0.775	0.0737	0.01565	0.05361	0.351	0.01356	0.8386	0.0456		
	6 hpi	0.06	1.476	0.0247	0.06191	0.01854	0.023	0.02539	0.0691	N/A		
	12 hpi	4.502	6.172	0.128	0.07642	0.06878	1.4	0.01899	0.2428	0.02315		
	24 hpi	2.585	6.685	0.2885	0.07097	0.06187	0.729	0.07735	0.3118	0.14372		
	48 hpi	0.134	0.784	0.0462	0.04093	0.01094	0.39	0.00572	0.1067	0		
NP846	0 hpi	7.563	3.756	0.0731	0.10916	0.094	1.262	0.02476	0.5508	0.02456		
	6 hpi	2.451	7.387	0.0715	0.20374	0.15891	2.225	0.02902	0.4502	0.0927		
	12 hpi	4.245	6.381	0.3089	0.08094	0.03185	1.04	0.03876	0.2995	0.04291		
	24 hpi	6.747	10.559	0.9552	0.25224	0.19432	3.66	0.09683	0.7786	0.12331		
	48 hpi	0.359	0.813	0.1312	0.06229	0.02384	0.471	0.00945	0.1773	0		
TX89D6435	0 hpi	3.382	0.687	0.0784	0.03747	0.02477	0.982	0.01192	1.1283	0.01942		
	6 hpi	2.48	3.169	0.1747	0.06845	0.08006	1.637	0.05816	0.4145	0.13035		
	12 hpi	5.271	3.798	0.1127	0.06134	0.05225	1.317	0.01324	0.3736	0.0177		
	24 hpi	7.926	7.398	0.3013	0.17129	0.09791	3.282	0.04613	0.7777	0.02225		
	48 hpi	2.673	1.363	0.15	0.05429	0.02704	1.509	0.01863	0.4177	0		

Supplementary Table S2. Elemental contrast values for candidate genes expression. The table shows the elemental contrasts for each cultivar independently in order to compare mean expression at each time point tested after inoculation to expression before inoculation.

Contrast	<i>Lr46-Glu1</i>	<i>Lr46-Glu2</i>	<i>Lr46-Glu3</i>	<i>Lr46-RLK1</i>	<i>Lr46-RLK2</i>	<i>Lr46-RLK3</i>	<i>Lr46-RLK4</i>	<i>Lr46-Smex</i>	<i>Lr46-WRKY</i>
Artigas 6h vs. 0h	6.31**	8.63***	0.168	0.093**	-0.0794	1.793*	0.0476	0.136	0.0773
Artigas 12h vs. 0h	3.77	3.22	0.122	0.0426	-0.0726	0.727	-0.004	0.08	-0.0287
Artigas 24h vs. 0h	2.39	7.93**	0.433	0.0568	-0.0753	1.359	0.07	0.013	0.0837
Artigas 48h vs. 0h	1.62	2.73	0.15	0.0446	-0.109*	0.451	0.0222	-0.058	-0.0535
Glenlea 6h vs. 0h	4.65*	12.49***	0.087	0.2927***	0.1471**	3.95***	0.0615	0.089	-0.1031
Glenlea 12h vs. 0h	-0.14	4.2	0.192	0.0334	-0.0114	0.224	0.0081	-0.014	-0.1538
Glenlea 24h vs. 0h	7.2***	10.52***	2.878***	0.045	0.1729**	3.107***	-0.0285	1.818***	0.07
Glenlea 48h vs. 0h	-0.12	2.21	-0.016	0.0615	-0.0476	0.496	0.0053	0.011	-0.1859*
Lerma Rojo 6h vs. 0h	-0.54	0.7	-0.049	0.0463	-0.0351	-0.328	0.0118	-0.77	0.0484
Lerma Rojo 12h vs. 0h	3.9	5.4*	0.054	0.0608	0.0152	1.049	0.0054	-0.596	-0.0224
Lerma Rojo 24h vs. 0h	1.98	5.91*	0.215	0.0553	0.0083	0.378	0.0638	-0.527	0.0981
Lerma Rojo 48h vs. 0h	-0.47	0.01	-0.028	0.0253	-0.0427	0.039	-0.0078	-0.732	-0.0456
NP846 6h vs. 0h	-5.11*	3.63	-0.002	0.0946**	0.0649	0.963	0.0043	-0.101	0.0681
NP846 12h vs. 0h	-3.32	2.62	0.236	-0.0282	-0.0621	-0.222	0.014	-0.251	0.0184
NP846 24h vs. 0h	-0.82	6.8**	0.882*	0.1431***	0.1003	2.398***	0.0721	0.228	0.0988
NP846 48h vs. 0h	-7.2***	-2.94	0.058	-0.0469	-0.0702	-0.791	-0.0153	-0.374	-0.0246
TX89D6435 6h vs. 0h	-0.9	2.48	0.096	0.031	0.0553	0.655	0.0462	-0.714	0.1109
TX89D6435 12h vs. 0h	1.89	3.11	0.034	0.0239	0.0275	0.336	0.0013	-0.755	-0.0017
TX89D6435 24h vs. 0h	4.54*	6.71**	0.223	0.1338***	0.0731	2.3**	0.0342	-0.351	0.0028
TX89D6435 48h vs. 0h	-0.71	0.68	0.072	0.0168	0.0023	0.528	0.0067	-0.711	-0.0194
Artigas* 6h vs. 0h	-0.01	-0.32	-0.071	-0.0201	-0.0013	-0.158	-0.0913	0.045	-0.0517
Artigas* 12h vs. 0h	0.26	0.54	0.231	-0.0185	0.0156	0.071	0.089	0.722	0.0826
Artigas* 24h vs. 0h	-0.11	-0.61	-0.172	-0.0129	-0.0079	-0.196	-0.1259	-0.145	-0.1212
Artigas* 48h vs. 0h	-0.04	-0.45	-0.127	-0.0173	-0.0111	-0.149	-0.0431	0.031	-0.2002*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Supplementary Table S3. Elemental contrast values for expression of miRNA molecules complementary to candidate genes.
The table shows the elemental contrasts for each cultivar independently to compare the average expression at each time point tested after inoculation with the expression before inoculation.

Targeted candidate genes	<i>Lr46-Glut2</i> and <i>Lr46-RLK2</i>		<i>Lr46-Glut2</i>		<i>Lr46-Glut2</i>		<i>Lr46-RLK3</i>	
	tae-miR9780	tae-miR9775	tae-miR5384-3p	tae-miR164				
Artigas 6h vs. 0h	-1	2	-23	-20				
Artigas 12h vs. 0h	1	3	-32	187				
Artigas 24h vs. 0h	1	4*	18	674***				
Artigas 48h vs. 0h	6	4*	-10	217				
Glenlea 6h vs. 0h	-4	1	-67	-19				
Glenlea 12h vs. 0h	-3	1	-50	224				
Glenlea 24h vs. 0h	-3	2	-70	6				
Glenlea 48h vs. 0h	-3	3	-66	189				
Lerma Rojo 6h vs. 0h	4	0	13	84				
Lerma Rojo 12h vs. 0h	-3	-1	-13	176				
Lerma Rojo 24h vs. 0h	6	0	9	49				
Lerma Rojo 48h vs. 0h	11	0	39	283*				
NP846 6h vs. 0h	-18*	6***	-36	284*				
NP846 12h vs. 0h	-7	0	-12	218				
NP846 24h vs. 0h	-5	-2	-45	-77				
NP846 48h vs. 0h	-18*	2	-27	156				
TX89D6435 6h vs. 0h	17*	-4*	-43	-381**				
TX89D6435 12h vs. 0h	13	-4*	-45	-363**				
TX89D6435 24h vs. 0h	18*	-1	7	-321*				
TX89D6435 48h vs. 0h	17*	0	-22	-293*				

* P<0.05; ** P<0.001; *** P<0.001

P4. Diversity of Expression Patterns of *Lr34*, *Lr67*, and Candidate Genes towards *Lr46* with Analysis of Associated miRNAs in Common Wheat Hybrids in Response to *Puccinia triticina* Fungus

Julia Sychała, Agnieszka Tomkowiak, Aleksandra Noweiska, Roksana Bobrowska, Jan Bocianowski, Aleksandra Sobiech i Michał Tomasz Kwiatek

Current Issues in Molecular Biology 46, no. 6: 5511-5529.; (2024)

<https://doi.org/10.3390/cimb46060329>



Article

Diversity of Expression Patterns of *Lr34*, *Lr67*, and Candidate Genes towards *Lr46* with Analysis of Associated miRNAs in Common Wheat Hybrids in Response to *Puccinia triticina* Fungus

Julia Spychala ¹, Agnieszka Tomkowiak ^{1,*}, Aleksandra Noweiska ¹, Roksana Bobrowska ¹, Jan Bocianowski ^{2,*}, Aleksandra Sobiech ¹ and Michał Tomasz Kwiatek ^{1,3}

¹ Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy, Horticulture and Biotechnology, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland; julia.spychala@up.poznan.pl (J.S.); aleksandra.noweiska@up.poznan.pl (A.N.); roksana.bobrowska@up.poznan.pl (R.B.); aleksandra.sobiech@up.poznan.pl (A.S.); m.kwiatek@bar.edu.pl (M.T.K.)

² Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, 60-637 Poznań, Poland

³ Plant Breeding and Acclimatization Institute—National Research Institute in Radzików, 05-870 Błonie, Poland

* Correspondence: agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl (A.T.); jan.bocianowski@up.poznan.pl (J.B.); Tel.: +48-61-848-7143 (J.B.)



Citation: Spychala, J.; Tomkowiak, A.; Noweiska, A.; Bobrowska, R.; Bocianowski, J.; Sobiech, A.; Kwiatek, M.T. Diversity of Expression Patterns of *Lr34*, *Lr67*, and Candidate Genes towards *Lr46* with Analysis of Associated miRNAs in Common Wheat Hybrids in Response to *Puccinia triticina* Fungus. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2024**, *46*, 3511–3529. <https://doi.org/10.3390/cimb46060329>

Academic Editor: Vijai Bhadrani

Received: 29 March 2024

Revised: 21 May 2024

Accepted: 29 May 2024

Published: 31 May 2024



Copyright: © 2024 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/>).

Abstract: Leaf rust caused by *Puccinia triticina* (Pt) is one of the most dangerous diseases causing significant losses in common wheat crops. In adult plants resistant to rust, a horizontal adult plant resistance (APR) type is observed, which protects the plant against multiple pathogen races and is distinguished by greater persistence under production conditions. Crucial pleiotropic slow-rust genes such as *Lr34*, *Lr46*, *Lr67*, and *Lr68*, in combination with other genes of lesser influence, continue to increase durable resistance to rust diseases. Based on our previous results, we selected four candidate genes for *Lr46* out of ten candidates and analysed them for expression before and after inoculation by *P. triticina*. As part of our study, we also investigated the expression patterns of miRNA molecules complementary to *Lr34* and the candidate genes. The aim of the study was to analyse the expression profiles of candidate genes for the *Lr46* gene and the *Lr34* and *Lr67* genes responsible for the differential leaf-rust resistance of hybrid forms of the F1 generation resulting from crosses between the Glenlea cultivar and cultivars from Polish breeding companies. In addition, the expression of five miRNAs (tae-miR9653b, tae-miR5384-3p, tae-miR9780, tae-miR9775 and tae-miR164), complementary to *Lr34*, and selected candidate genes were analysed using stem-loop RT-PCR and ddPCR. Biotic stress was induced in adult plants by inoculation with Pt fungal spores, under controlled conditions. Plant material was collected before and 6, 12, 24, and 48 h after inoculation (hpi). Differences in expression patterns of *Lr34*, *Lr67*, and candidate genes (for *Lr46*) were analysed by qRT-PCR and showed that gene expression changed at the analysed time points. Identification of molecular markers coupled to the *Lr* genes studied was also carried out to confirm the presence of these genes in wheat hybrids. qRT-PCR was used to examine the expression levels of the resistance genes. The highest expression of *Lr46/Yr29* genes (*Lr46-Glu2*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, and *Lr46-RLK3*) occurred at 12 and 24 hpi, and such expression profiles were obtained for only one candidate gene among the four genes analysed (*Lr46-Glu2*), indicating that it may be involved in resistance mechanisms of response to Pt infection.

Keywords: leaf rust; hybrid breeding; APR resistance; slow rusting; candidate genes

1. Introduction

Common wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the paramount crop species of enormous importance. Worldwide, wheat cultivation is extremely relevant which is connected

with its large share in human and animal nutrition and high yield potential. Currently, the primary directions of wheat breeding focus mainly on high yield, high commercial quality, and resistance to biotic and abiotic stresses [1]. Leaf rust outbreaks can occur with high frequency causing yield losses of up to 70% [2,3]. In addition, leaf rust causes a reduction in grain quality and the risk of mycotoxin contamination. The increase in rust infections is linked to the continuous diversification of naturally occurring rust populations, leading to the emergence of increasingly resistant pathotypes [2,4]. The most effective and environmentally friendly method of controlling fungal diseases found in wheat crops is to grow resistant varieties. However, producing a variety with the right combinations of resistance genes requires an understanding of genetic variation and *Pt* composition [5].

Plant crops are susceptible to diseases caused by fungal and bacterial pathogens, nematodes, and viruses. The economic value of the species drives investment in research into these diseases. Crop improvement programmes have always focused on disease resistance. Plant breeders focus on implementing diverse sources of resistance to achieve sustainable disease control which is hampered by ever-evolving pathogen populations creating new virulent races. Therefore, knowledge of genetic variation in resistance, the evolutionary capacity of pathogens, and the selection of modern breeding methods are essential for successful resistance breeding. Currently, wheat breeders are focusing on using resistance genes that are non-race-specific to the fungus. Breed-unspecific resistance to leaf rust is characterized by a partial resistance phenotype activated in plants at the adult stage. To ensure sustainable rust control, new sources of resistance must be found and identified [4,6]. Genetically determined resistance to *Puccinia triticina* (*Pt*) Eriks has been characterised in both young plants (seedling resistance; SR) and plants at the mature stage (adult plant resistance; APR). At the seedling stage, SR is controlled by the R genes. In wider use, most of the R genes that provide race-specific *Pt* resistance are only effective for a few years [3,7]. Adult plant resistance (APR) sources provide low to moderate levels of resistance at stages after sowing. This is referred to as the slow-rusting effect. Achieving resistance that is commercially acceptable requires a combination of more than two APR genes [7].

Among the most threatening diseases leading to significant losses in the world's wheat crops is leaf rust caused by the fungus *Puccinia triticina* (*Pt*) Eriks. It occurs more frequently than other rust diseases and is more prevalent worldwide [8]. All known genes for resistance to leaf rust and stripe rust, also known as yellow rust, are classified according to a specific nomenclature that assigns the symbol *Lr* (Leaf rust) and *Yr* (Yellow rust) to such genes. Over the past few decades, numerous research work has led to the mapping of *Lr* genes and many important quantitative trait loci (QTLs) on different chromosomes, which have been identified using DNA markers [9,10]. Leaf-rust resistance genes, designated *Lr1* to *Lr81*, have been described, as well as several QTLs associated with resistance [11]. However, most of the identified *Lr* genes are no longer used in breeding because they are not effective against recent *Pt* races [11,12]. Strategic breeding of cultivars with resistance genes through pyramiding can be an effective aid in reducing the chances of virulent breeds evolving.

Nowadays, important slow-rust pleiotropic genes such as *Lr34*, *Lr46*, *Lr67*, and *Lr68* continue to improve partial, long-term resistance [13]. Partial resistance is due to the slow-rust phenotype, which has a longer latent period, resulting in the pathogen developing more slowly [14]. The *Lr34*, *Lr42*, *Lr46*, *Lr67*, and *Lr68* genes have been identified as non-racial APR genes in hexaploid wheat. The *Lr34* encodes an ABC (ATP binding cassette) transporter from the ABCG subfamily, while the *Lr67* gene encodes a hexose transporter with a similar affinity to glucose. The susceptible and resistant *Lr67* allele differ by two amino acid residues [15,16]. In addition, these genes are not only structurally different from known R genes, but encode proteins of different classes [17]. The *Lr34res* gene is one of the most durable sources of quantitative fungal resistance in wheat. It has been shown to be effective against powdery mildew and spot blotch as well as leaf rust, stem rust, and stripe rust [18]. The leaf-rust resistance genes *Lr34* and *Lr46* act on all known races of *P. triticina*

and are present in many of the wheat cultivars currently grown. Both genes regulate an intermediate level of leaf-rust resistance, which is most pronounced at the adult plant stage and is associated with persistent leaf-rust resistance. The *Lr67* gene, like the *Lr68*, *Lr74*, *Lr75*, and *Lr77* genes, has the potential to provide resistance over a long period of time. However, a single *Lr67* gene does not provide high resistance, but wheat cultivars with a combination of adult plant resistance genes or seedling resistance genes with adult plant genes can be highly resistant [19].

The *Lr46* gene was first described in the cultivar 'Pavon 76' [20]. The *Lr46* confers broad-spectrum resistance to four biotrophic fungal pathogens: *P. triticina* (*Lr46*), *P. striiformis* (*Yr29*), *P. graminis* f. sp. *tritici* (*Sr58*), and *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Pm39*) [12,21]. A locus *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39* on chromosome 1BL is associated with resistance to multiple pathogens, but the specific gene has still not been identified. A number of candidate genes for *Lr46/Yr29* were selected and analysed [22]. However, it is still unclear whether this locus of resistance to multiple pathogens is the result of the pleiotropic action of a single gene or multiple related genes. Moreover, this gene belongs to a group of genes that show an effect known as "slow rusting", i.e., partial resistance during pathogen infection.

We analyse the expression profiles for nine of the ten candidate genes included in the *Lr46/Yr29* locus at five time points (0, 6, 12, 24, and 48 h post-inoculation (hpi)): TraesCS1B02G453900.1, TraesCS1B02G454200.1, TraesCS1B02G454500.1, TraesCS1B02G454000.2, TraesCS1B02G454100.1, TraesCS1B02G454400.1, TraesCS1B02G454600.1, TraesCS1B02G453700.1 and TraesCS1B02G455000.1 [22]. In a study by Cobo et al. [22], they mapped the *QYr.uctw-1BL* region on chromosome 1BL, which coincided with the current resistance maps of the *Pt Yr29* resistance gene (also known as *Lr46*). Their analysis of the results suggested that the *QYr.uctw-1BL* region and *Lr46/Yr29* represent the same gene. The researchers highlighted the need to examine the expression of the trait in different genotypes with and without pathogen inoculation to determine whether there are differences in expression levels between candidate genes for *Lr46/Yr29*. Thus, we selected four candidate genes for *Lr46*: TraesCS1B02G454200.1 (*Lr46-Glu2*), TraesCS1B02G454000.2 (*Lr46-RLK1*), TraesCS1B02G454100.1 (*Lr46-RLK2*), and TraesCS1B02G454400.1 (*Lr46-RLK3*).

Breeders aim to pyramidise resistance genes within the same cultivar to increase the effectiveness of resistance. Hybrid breeding is the most effective way to combine dominant resistance genes, but its potential to achieve this is strongly dependent on the frequency of genes showing complete dominance. Hybrid wheat breeding is expected to increase yield and stability and is, therefore, used in wheat-breeding programmes. However, basic information on the genetic architecture of wheat and the degree of dominance of rust-disease resistance is still lacking [2]. In order to develop a sustainable and cost-effective leaf-rust control strategy, a collaborative and multidisciplinary research approach involving multiple stakeholders, such as breeders, farmers, geneticists, pathologists, biotechnologists, and policymakers, needs to be implemented [5].

An important factor essential to knowing and understanding the molecular mechanisms of resistance is the regulation of gene expression. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding endogenous RNAs of 21 to 24 nucleotides (nt) in length that play a key role in the regulation of eukaryotic organisms by inhibiting gene translation or degrading target mRNAs at the post-transcriptional level. Since 2002, when the first plant miRNAs were discovered in *Arabidopsis*, miRNAs have been shown to be involved in many plant processes such as regulation of biogenesis, signal transduction, phase change, and organ development [1,17,23]. Plant miRNAs are also crucial regulators and a key part of plant defence responses [24].

The aim of this study was to analyse the expression patterns of candidate genes for the *Lr46* gene and the *Lr34* and *Lr67* genes responsible for the differentiated resistance to leaf rust of hybrid forms of the F1 generation resulting from crosses between the Glenlea cultivar and cultivars from Polish breeding companies. Moreover, we analysed the expression patterns of five complementary miRNAs (tae-miR9653b, tae-miR5384-3p, tae-miR9780, tae-miR9775, and tae-miR164) complementary to *Lr34* and candidate genes for *Lr46*.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

The plant material used in the study consisted of five hybrid forms of the F1 generation obtained by crossing the reference cultivar Glenlea with selected cultivars from Polish breeding companies. Seeds of the Glenlea ("Citr 17272") cultivar were obtained from the National Small Grains Collection (Agricultural Research Station in Aberdeen, WA, USA). The hybrid forms of common wheat were obtained from four Polish breeding companies: Glenlea × Itaka (Plant breeding Danko, Poland), Glenlea × Merkaŭa (Plant Breeding Smolice—IHAR Group, Poland), Glenlea × Aura (Plant Breeding Strzelce—IHAR Group, Poland), Glenlea × Jutrzenka, and Glenlea × Harenda (Plant Breeding Malopolska, Poland).

2.2. Plant Growth, Pathogen Inoculation, and Leaf Sample Collection

The experiment was conducted in a growth chamber under specified conditions. The temperature was initially set at 18 °C during the day and 16 °C at night. In addition, the emission spectrum of the light source was fixed with a photon flux of 572 μE. One month after setting up the experiment, the temperature was raised to 20 °C and 17 °C during the day and night, respectively. Plants were inoculated at the adult plant stage by spraying a suspension of uredospores, a mixture of *P. tritici* (water with 0.75% Tween 20 reagent) at a concentration of approximately 5×10^5 spores mL⁻¹. The mixture was prepared immediately before inoculation. The plant inoculation material was a mixture of four *P. tritici* isolates. Fungus spores were collected from infected field experiments located in various parts of Poland.

2.3. Molecular Markers and PCR Reactions

The molecular markers *csLV34* [25], *csLV46G22*, *cfid23* [26], and *cfid71* [26] were used to confirm the presence of alleles associated with the *Lr34/Yr18*, *Lr46/Yr29*, and *Lr67/Yr46* genes, respectively (Figure 1). Genomic DNA was isolated from the leaves of 10-day-old seedlings using the GeneMATRIX Plant and Fungi DNA Purification Kit (EURx Ltd., Gdańsk, Poland), according to the procedure provided by the manufacturer. The concentration of isolated DNA was measured using a NanoDrop spectrophotometer and A_{260}/A_{280} ratio. Samples were diluted with Elution buffer (EURx Ltd., Gdańsk, Poland) to a uniform concentration of 50 ng μL⁻¹.

PCR was performed with FastGene Optima HotStart ReadyMix reagents (NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren, Germany), using a Labcycler thermal cycler (SensoQuest GmbH, Göttingen, Germany). The composition of the reaction mixture is given in our previous work [27]. The PCR consisted of initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles (denaturation, 94 °C for 30 s; primer annealing, 60 °C for 30 s; elongation, 72 °C for 90 s), followed by the final extension for 10 min at 72 °C and storage at 4 °C. The primer annealing temperatures of the marker primers were 55 °C for *csLV34* and 60 °C for *cfid23* and *cfid71* markers. In addition, PCR products of the *csLV46G22* marker were digested with the *BspEI* enzyme (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) at 37 °C for 1 h. PCR products were separated on a 2% High Resolution Plus agarose gel (Bioshop, Canada Inc., Burlington, ON, Canada) in 1 × TBE buffer (Bioshop, Canada Inc., Burlington, ON, Canada), using Midori Green Direct DNA Stain (Nippon Genetics Europe, Germany). Electrophoresis results were visualised in a Molecular Imager Gel Doc™ XR UV system with Bio Image™ software version 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

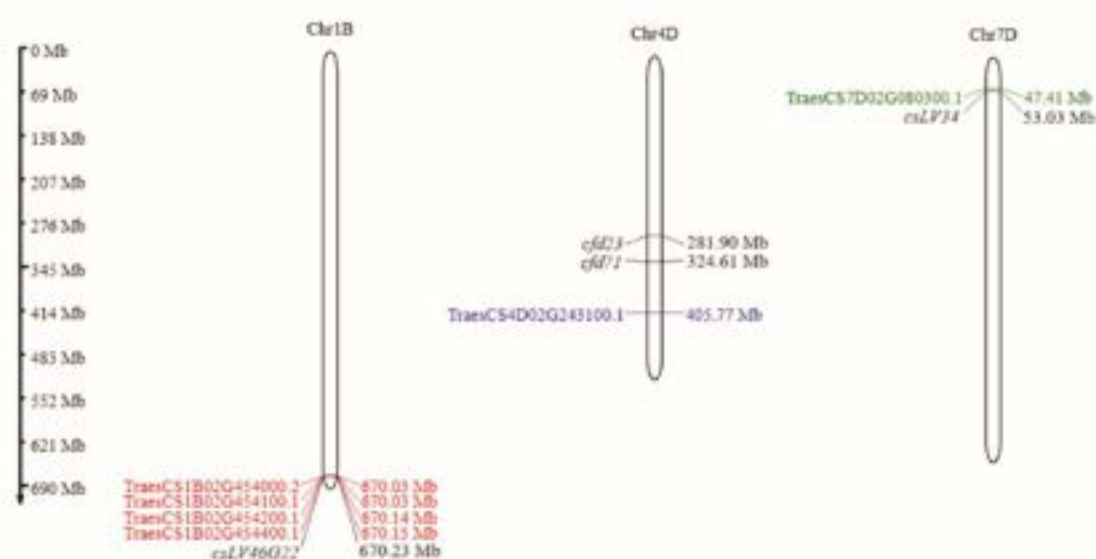


Figure 1. Location of *Lr34/Yr18* (TraesCS7D02G080300.1), *Lr67/Yr46* (TraesCS4D02G243100.1), and four candidate genes for *Lr46/Yr29* (TraesCS1B02G454200.1, TraesCS1B02G454000.2, TraesCS1B02G454100.1, TraesCS1B02G454400.1), on chromosomes 7D, 4D, and 1B, respectively. Candidate genes, including the *QYr.ucw-1BL* region, are highlighted in red. “Ch1B” similarly denotes the chromosome name, and the abbreviation “Mb” next to the scale denotes the megabase unit referring to the length of the chromosome.

2.4. Gene Expression Analysis with qRT-PCR

Following recent research [22], ten candidate genes for the *Lr46/Yr29* gene whose sequences were found in the Ensembl Plants database for common wheat (https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index, accessed on 16 April 2023) were selected and downloaded in FASTA format. These sequences were used to design primers for qPCR reactions, using the Primer3Plus tool (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, accessed on 16 April 2023). Based on the *T. aestivum* DNA sequence, primers were designed. The designed primers used to analyse the expression of the *Lr34* and *Lr67* genes were described in our previous work [28] and for four candidate genes for *Lr46*. The names and functions of *Lr34*, *Lr67*, and selected candidate genes can be found in Table 1. Isolation of total RNA from leaf tissue samples collected at biological replicates and selected time points (0, 6, 12, 24, and 48 h post-inoculation (hpi)) was performed using the Maxwell RSC Plant RNA Kit isolation (Promega, Madison, WI, USA). The concentration of isolated total RNA was measured using a NanoDrop spectrophotometer and A_{260}/A_{280} ratio. First-strand cDNA synthesis was performed using the iScript™ Reverse Transcription Supermix kit for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), according to the protocol provided by the manufacturer. A temperature gradient PCR was performed for each gene (each primer pair) to determine the annealing temperature. The gradient was set in the temperature range from 50 °C to 58 °C. PCR products were separated on a 2% High Resolution Plus agarose gel (Bioshop, Canada Inc., Burlington, ON, Canada) in 1 × TBE buffer (Bioshop, Canada Inc., Burlington, ON, Canada), using Midori Green Direct DNA Stain (Nippon Genetics Europe, Germany). Electrophoresis results were visualized in a Molecular Imager Gel Doc™ XR UV system with Bio Image™ software version 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). After the specific amplification product was obtained in a 2% agarose gel, the annealing temperature for qRT-PCR was set to 53.5 °C. Two housekeeping genes, *TUBβ* and *ARF*, were selected and qRT-PCR analyses were performed [28].

Table 1. Presentation of *Lr34/Yr18*, *Lr67/Yr46*, and four selected genes located in the candidate region for *Lr46/Yr29* gene, their localization, and predicted function, involving the *QYr.acu-1BL* region.

Gene ID	Gene Name	Gene Predicted Function	Physical Region (Mb)
TraesCS7D02G080300.1	<i>Lr34</i>	ABC transporter	7D: 47,412,062–47,424,490
TraesCS4D02G243100.1	<i>Lr67</i>	hexose transporter	4D: 405,770,757–405,775,531
TraesCS1B02G454200.1	<i>Lr46-Glu2</i>	gucan endo-1,3- β -glucosidase	1B: 670,142,374–670,144,629
TraesCS1B02G454000.2	<i>Lr46-RLK1</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,025,362–670,028,705
TraesCS1B02G454100.1	<i>Lr46-RLK2</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,034,245–670,037,207
TraesCS1B02G454400.1	<i>Lr46-RLK3</i>	RLK (receptor-like kinase)	1B: 670,152,915–670,155,867

The qRT-PCR analysis was performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix, and CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Each of the qRT-PCR experiments performed consisted of three biological and three technical repeats, the results of which were calculated and averaged. Negative control NTC (No Template Control) was performed during each single expression analysis, applied to a 96-well plate in three technical replicates. The following temperature profile was used for qPCR reactions: initial denaturation for 3 min at 95 °C; then 40 cycles: denaturation for 10 s at 95 °C, annealing of primers for 30 s at 53.5 °C (fluorescence measurement). Melt stage (Melt curve): melting temperature range 65 °C–90 °C; every 5 s the temperature was increased by 0.5 °C and a measurement was taken. The reference genes were tested according to a previously reported protocol [28]. The results of the standard qRT-PCR yield curves (%E) and coefficient of determination (R^2 values) were included in the calculation of the expression results [28]. The normalised expression was calculated using CFX Maestro software version 4.0 and the Gene Study tool (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), which allowed comparison of the expression of all genes for biological repeats of each hybrid form, at selected time points.

2.5. Expression Analysis of miRNAs Associated with *Lr34* and Candidate Genes for *Lr46* Using ddPCR

In this study, the expression of miRNAs was analysed: *tae-miR9653b* complementary to *Lr34*, three related to the candidate gene *Lr46-Glu2* (*tae-miR5384-3p*, *tae-miR9780*, and *tae-miR9775*), *tae-miR9780* complementary to *Lr46-RLK2*, and *tae-miR164* complementary to *Lr46-RLK3*. The coding sequences of these candidate target genes, downloaded from the Ensembl Plants database (https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index, accessed on 16 April 2023), were analysed in the psRNATarget database (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>, accessed on 16 April 2023). The sequences of the four miRNAs analysed were found in the miRBase database (<https://www.mirbase.org/>, accessed on 16 April 2023) and downloaded in FASTA format, and using the IDT—Integrated DNA Technologies website (<https://eu.idtdna.com/pages>, accessed on 16 April 2023) stem-loop primers were designed for miRNA reverse transcription and ddPCR reactions according to the protocol [29–31].

Leaf-tissue samples were collected from each of the five hybrids in three biological replicates. Leaves were placed in tubes and immediately frozen in liquid nitrogen. The collected leaf tissue was stored in a freezer at -80 °C until miRNA isolation was initiated. The mirVana™ miRNA Isolation Kit from ThermoFisher Scientific was used for microRNA isolation, according to the protocol provided by the manufacturer. The primers for the stem-loop RT-PCR were designed based on sequences of complementary miRNA molecules to four genes: the *Lr34* gene and candidate genes for *Lr46* (*Lr46-Glu2*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, and *Lr46-RLK3*), according to the protocol [28,29].

2.6. Statistical Analysis

Two-way analyses of variance (ANOVA) were carried out to determine the main effects of the hybrid form and time point as well as the hybrid form and time point interactions on the variability of the expression profiles between the genes. In order to compare mean

expression at each time point tested after inoculation to expression before inoculation, elemental contrasts were performed, carried out for each hybrid form independently. We referred to the expression values of the miRNAs analysed as 'relative expression' for the expression level, as our results represent differences in expression compared to the values before inoculation. The expression of the analysed genes is shown as heatmaps. For visualization of gene expression results, cluster analysis (UPGMA method) with the Euclidean distances was performed. All these analyses were conducted using the GenStat v. 23.1 statistical software package [32].

3. Results

3.1. Identification of Molecular Markers Associated with the *Lr34/Yr18*, *Lr46/Yr29*, and *Lr67/Yr46* Locus

The molecular markers used successfully identified selected *Lr* resistance genes in the hybrid forms tested (Table 2). It has been reported in the literature that STS marker *csLV34* is highly reliable for *Lr34* [25,33,34], and *csLV46G22* is a highly reliable and close diagnostic marker for the *Lr46* gene [22,27,35]. In the case of the presence of *Lr34*, we obtained a product of 150 bp. In most of the hybrids analysed, we obtained heterozygotes, only in the case of Harenda × Glenlea was a homozygote (+) obtained (Table 2). In the absence of *Lr34* in the hybrid form, a PCR product of 229 bp (–) would be obtained. Also, the *csLV46G22* marker was identified in all hybrid forms tested. Two flanking SSR molecular markers, *cfid23* and *cfid71*, were used to confirm the presence of the *Lr67* gene (Table 2). In the case of *cfid23*, a PCR product of 211 bp was obtained, while in the case of *cfid71*, it was 214 bp.

Table 2. Summary of the presence of the molecular markers *csLV34*, *csLV46G22*, *cfid23*, and *cfid71* in tested common wheat hybrids.

No.	Wheat Hybrid	<i>Lr34</i> (<i>csLV34</i>)	<i>Lr46</i> (<i>csLV46G22</i>)	<i>Lr67</i> (<i>cfid23</i>)	<i>Lr67</i> (<i>cfid71</i>)
1	Harenda × Glenlea	+	+	+	+
2	Jutrzenka × Glenlea	H	+	+	+
3	Aura × Glenlea	H	+	+	+
4	Itaka × Glenlea	H	+	+	+
5	Merkawa × Glenlea	H	+	+	+

+, presence; H, heterozygous.

3.2. Results of the Statistical Analysis

The analysis of variance indicated that the main effects of the hybrid form and time point as well as the hybrid form and time point interaction were significant for the expression profile of all genes. As each gene has a specific expression level, the analysis of variance was performed for each gene separately. An attempt was also made to compare the expression profiles between the genes through Pearson's linear correlation (Figure 2). As a result of the correlation analysis, it was possible to observe that between *Lr46-RLK1* and *Lr46-RLK3* there is the highest positive correlation (0.791). In contrast, there is almost no correlation between *Lr34* and *Lr67* (0.018) (Figure 2).

The two-way analysis of variance (ANOVA) indicates that the main effect of hybrids was significant for *Lr34*, *Lr46-Glu2*, *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK3*, and *Lr67*. The main effect of time was significant for the expression of all genes except *Lr34*. The main effect of the hybrid × time interaction was significant for the expression of three genes: *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, and *Lr46-RLK3* (Table 3).

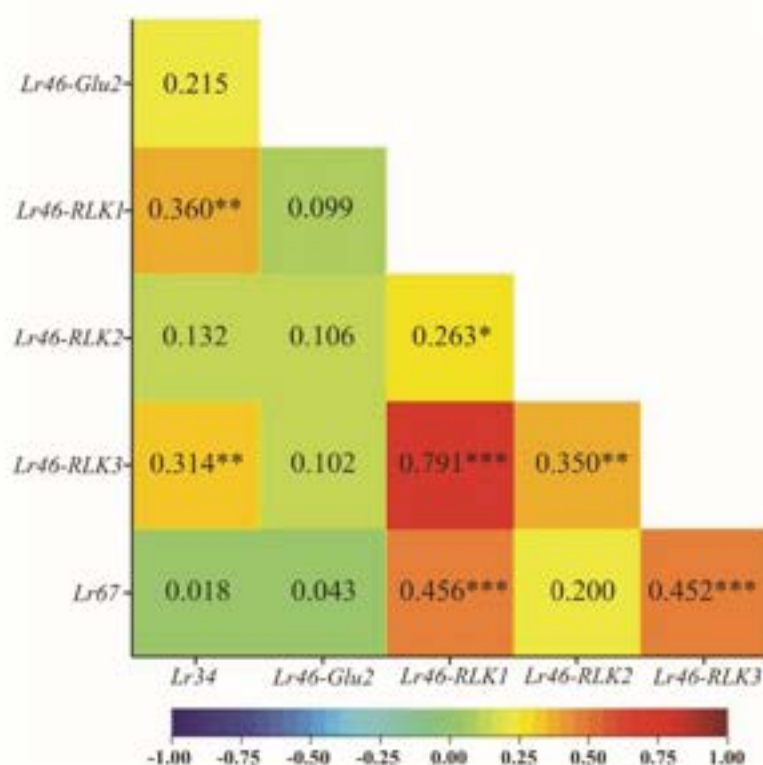


Figure 2. Heatmaps of Pearson's linear pairwise correlation coefficients between the observed genes *Lr34*, *Lr67*, and the selected candidate genes for *Lr46/Yr29* based on the values of their individual expression profiles. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table 3. Mean squares from two-way analysis of variance for expression profiles of studied genes in hybrid forms of wheat.

Source of Variation	Hybrid	Time	Hybrid × Time Interaction	Residual
Degrees of freedom	4	4	16	50
<i>Lr34</i>	0.055 *	0.036	0.025	0.015
<i>Lr46-Glu2</i>	5.671	52.391 ***	5.630	4.194
<i>Lr46-RLK1</i>	0.00046 ***	0.00066 ***	0.00025 ***	0.00003
<i>Lr46-RLK2</i>	0.0023	0.0107 *	0.0057 *	0.0029
<i>Lr46-RLK3</i>	3.625 ***	1.945 ***	1.016 ***	0.122
<i>Lr67</i>	0.207 *	0.439 ***	0.083	0.066

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

3.3. Gene Expression Analysis

The qRT-PCR analyses of *Lr34*, *Lr67*, and candidate genes for *Lr46* in all studied wheat hybrids and at different time points are presented as heatmap graphs (Figure 3). Similarly to the previous study [28], the resistance genes *Lr34* and *Lr67* showed a differentiated expression at time points. The *Lr34* gene showed relatively low expression after inoculation of plants by *Pt* fungus. However, compared to our previous work [28], a similarity in the expression profile of *Lr34* in the donor form of Glenlea can be observed in the hybrid forms studied, where the highest expression was observed at 24 and 48 hpi (Figure 3). The exception was the hybrid Harendia × Glenlea, which showed low expression of the *Lr34*

gene at all time points (Figure 3). In the Aura × Glenlea hybrid, *Lr34* expression increases intensely immediately after inoculation (6 hpi) and increases again at 24 hpi.

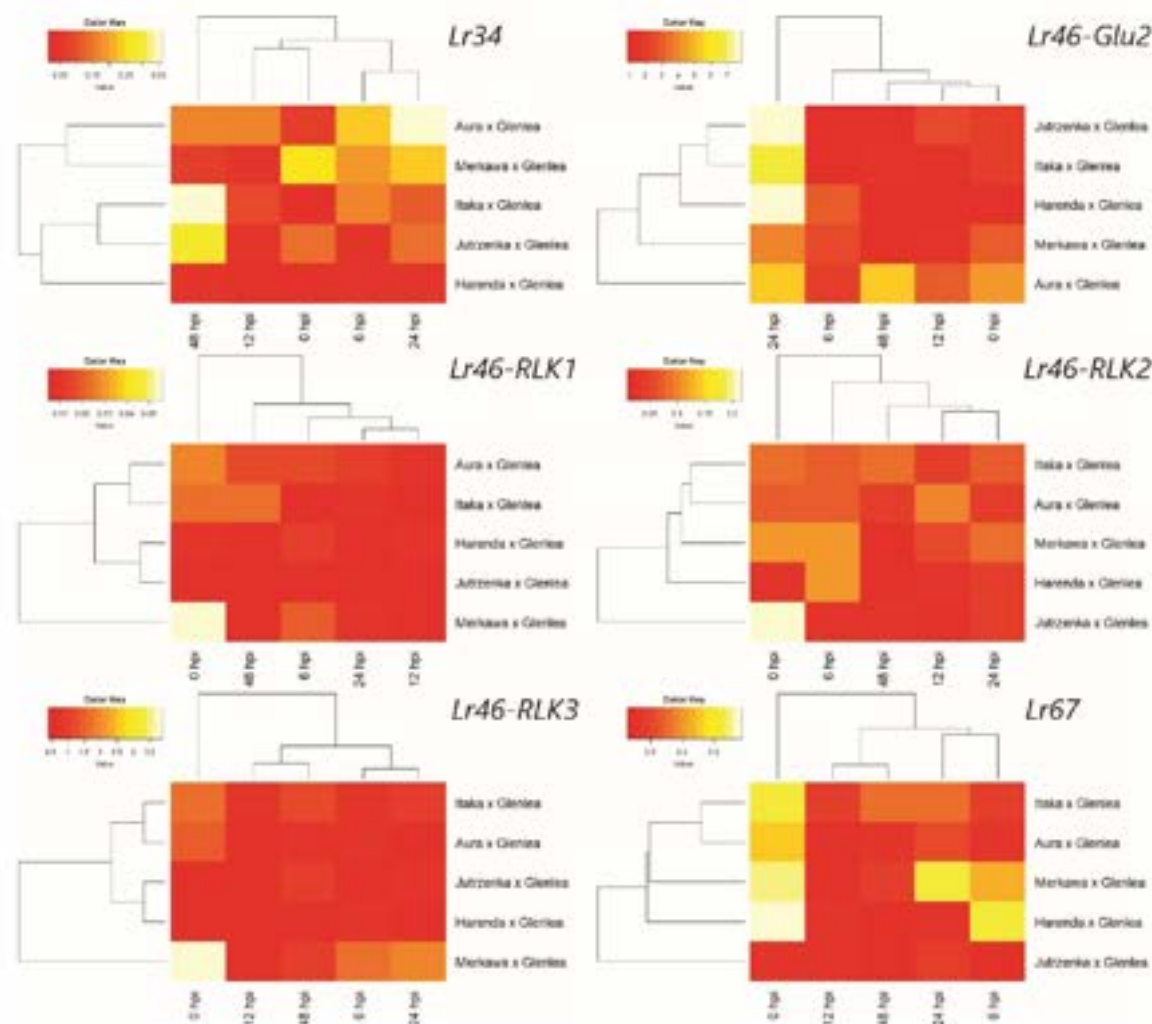


Figure 3. Expression heatmap of the *Lr34*, *Lr67*, and four *Lr46/Yr29* candidate genes in leaf tissues under *P. triticina* infection. The evaluation included hybrid forms of common wheat (Harenda × Glenlea, Jutrzenka × Glenlea, Aura × Glenlea, Itaka × Glenlea, and Merkawa × Glenlea) indicated on the vertical axes at different time points (0, 6, 12, 24, and 48 hpi) identified on the horizontal axes. Red indicates lower normalised expression and yellow indicates higher normalised expression.

In comparison to *Lr34*, the *Lr67* gene showed a partially different expression pattern, also demonstrated by the analysis of variance (Figures 2 and 3). In the case of the *Lr67* gene, its expression before inoculation is at a remarkably high level (0 hpi); the exception to this trend is the Jutrzenka × Glenlea hybrid, which showed low, constant expression of the *Lr67* gene at all time points (Figure 3). In two wheat hybrids (Harenda × Glenlea and Merkawa × Glenlea), the expression level of this gene decreases slightly after inoculation (6 hpi) and increases again at 24 hpi only for the Merkawa × Glenlea hybrid form. Unfortunately, on normalized expression analysis, *Lr67* gene expression after inoculation did not

reach higher values than before inoculation (0 hpi) (Figure 3). This may suggest a weak resistance response to *Pt*.

Among the candidate genes, the least diverse expression profile was observed for the candidate gene *Lr46-Glu2*. In the wheat hybrids, Jutrzenka × Glenlea, Itaka × Glenlea, Harenda × Glenlea, and Merkawa × Glenlea, we observe a strong increase in *Lr46-Glu2* expression at 24 hpi, reaching significantly higher values than before inoculation (Figure 3). The expression level of *Lr46-Glu2* significantly exceeded the pre-inoculation baseline. Interestingly, the expression level of *Lr46-Glu2* at 48 hpi decreased in all tested hybrid forms, but in the hybrid form Aura × Glenlea, it still exceeded the pre-inoculation baseline (Figure 3).

Compared to the candidate gene *Lr46-Glu2*, the genes *Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK2*, and *Lr46-RLK3* demonstrate low expression over time, at similar levels in all hybrid forms tested (Figure 3). This may suggest their lower involvement in the defence response after *Pt* inoculation. In the case of the *Lr46-RLK2* gene, expression levels fluctuate over time in all hybrids, eventually reaching lower values than before inoculation (Figure 3). Interestingly, these genes presented very high initial expression (0 hpi) in Merkawa × Glenlea (*Lr46-RLK1*, *Lr46-RLK3*) and Jutrzenka × Glenlea (*Lr46-RLK1*) hybrids.

3.4. Expression of miRNAs Complementary to *Lr34* and Target Candidate Genes for *Lr46*

Using stem-loop RT-PCR and ddPCR, we performed expression analysis of miRNA molecules selected from databases as complementary to *Lr34* and four candidate genes for *Lr46/Yr29*. We compared the expression results of selected genes with the respective values for the miRNA molecules complementary to them. Contrast analysis was performed for the expression data of miRNAs, and the resulting elemental contrast values for the expression of miRNAs complementary to *Lr34* and candidate genes.

Analysis of miRNA using ddPCR revealed a potential role for *tae-miR9653b* in down-regulation (miRNAs complementary to the *Lr34* gene). The level of sequence-complementary *tae-miR9653b* fluctuates at observable time points. Eventually, between 24 and 48 hpi, when an increase in *Lr34* gene expression is observed, the level of *tae-miR9653b* decreases. Such a situation is observed in hybrids Harenda × Glenlea, Jutrzenka × Glenlea, and Merkawa × Glenlea, where the expression levels of *Lr34* and *tae-miR9653b* genes fluctuate after inoculation. In the case of Jutrzenka × Glenlea and Merkawa × Glenlea, we observed a significant increase in *tae-miR9653b* expression at 24 hpi, well above the baseline (Figure 4). In the case of Aura × Glenlea and Itaka × Glenlea, we do not observe significant *tae-miR9653b* expression, which is obtained at consistently low levels at all selected time points (Figure 4).

According to the database, *tae-miR9780* is complementary to two candidate genes, *Lr46-Glu2* (TraesCS1B02G454200.1) and *Lr46-RLK2* (TraesCS1B02G454100.1). Relative to the *Lr46-Glu2* gene, *tae-miR9775* is also complementary. Unfortunately, the expression of *tae-miR9775* was at a low level and did not allow for confident inference. In the *Lr46-Glu2* gene, we analysed the expression of two miRNAs: *tae-miR9780* and *tae-miR5384-3p*. The expression of *tae-miR9780* in the majority of the tested wheat hybrids was at a constant level, both before and after inoculation. Analysing the complementary to this gene *tae-miR5384-3p*, it was found that its expression level after inoculation in four hybrids fluctuated eventually taking values lower or equal to the initial values before inoculation. Therefore, this can suggest that *tae-miR5384-3p* did not specifically repress the *Lr46-Glu2* gene, as gene expression increased after inoculation. Of all the hybrids analysed, only Aura × Glenlea showed a significant increase in *tae-miR5384-3p* expression at 48 hpi, compared to pre-inoculation levels. For the other wheat hybrids, a lower copy number of this miRNA was recorded at 48 hpi than before inoculation by *Pt* (Figure 5).

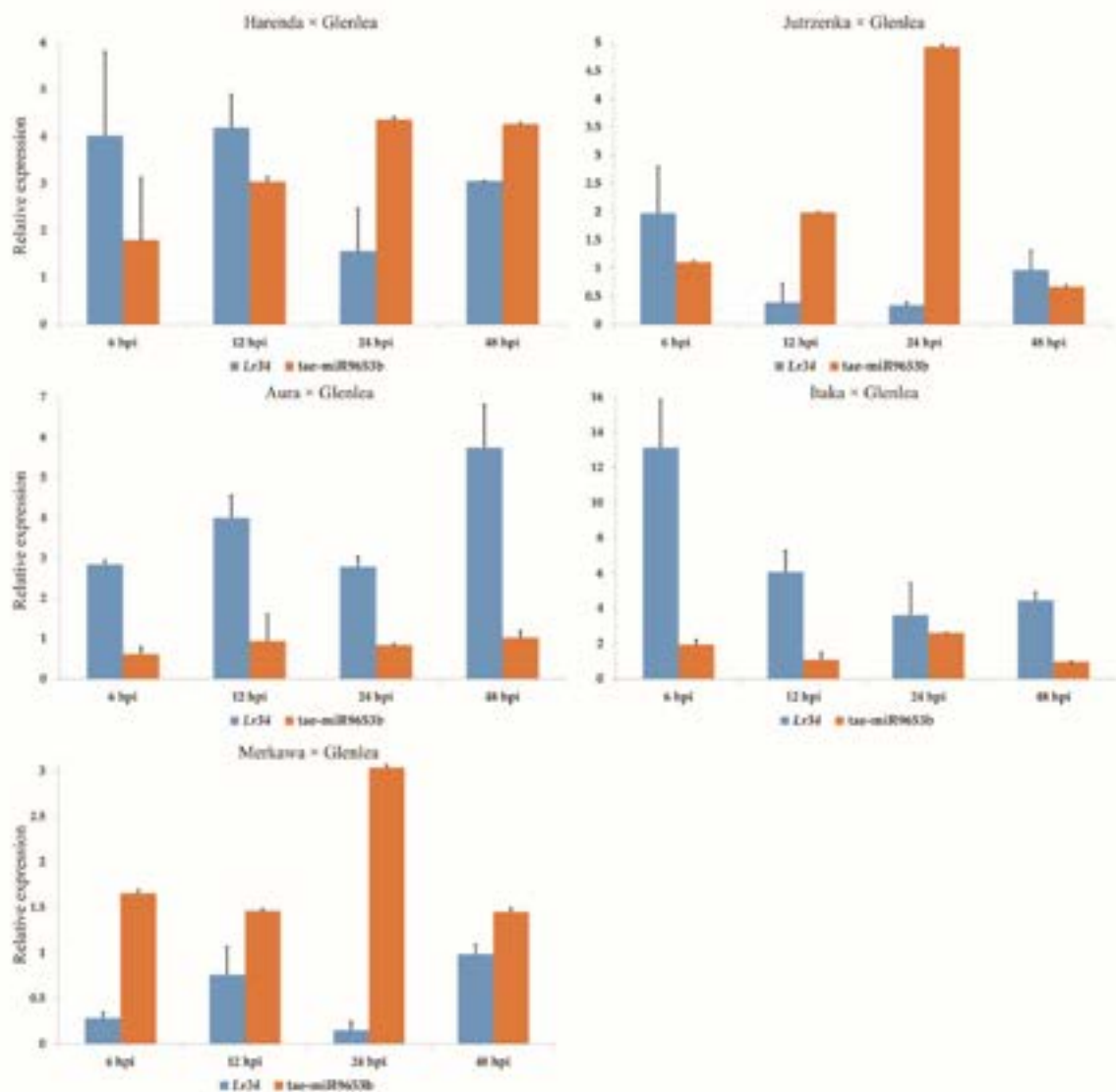


Figure 4. Analysis of complementary taemilR9653b expression compared to Lr34 expression patterns during *P. tritici* infection. Numbers 6, 12, 24, and 48 indicate hours post inoculation (hpi). The graphs show the relative expression values compared to the 0 hpi time point. Error bars shown indicate standard error (SE). The expression data shown were obtained from the average of three biological replicates, and each biological replicate had three technical replicates.

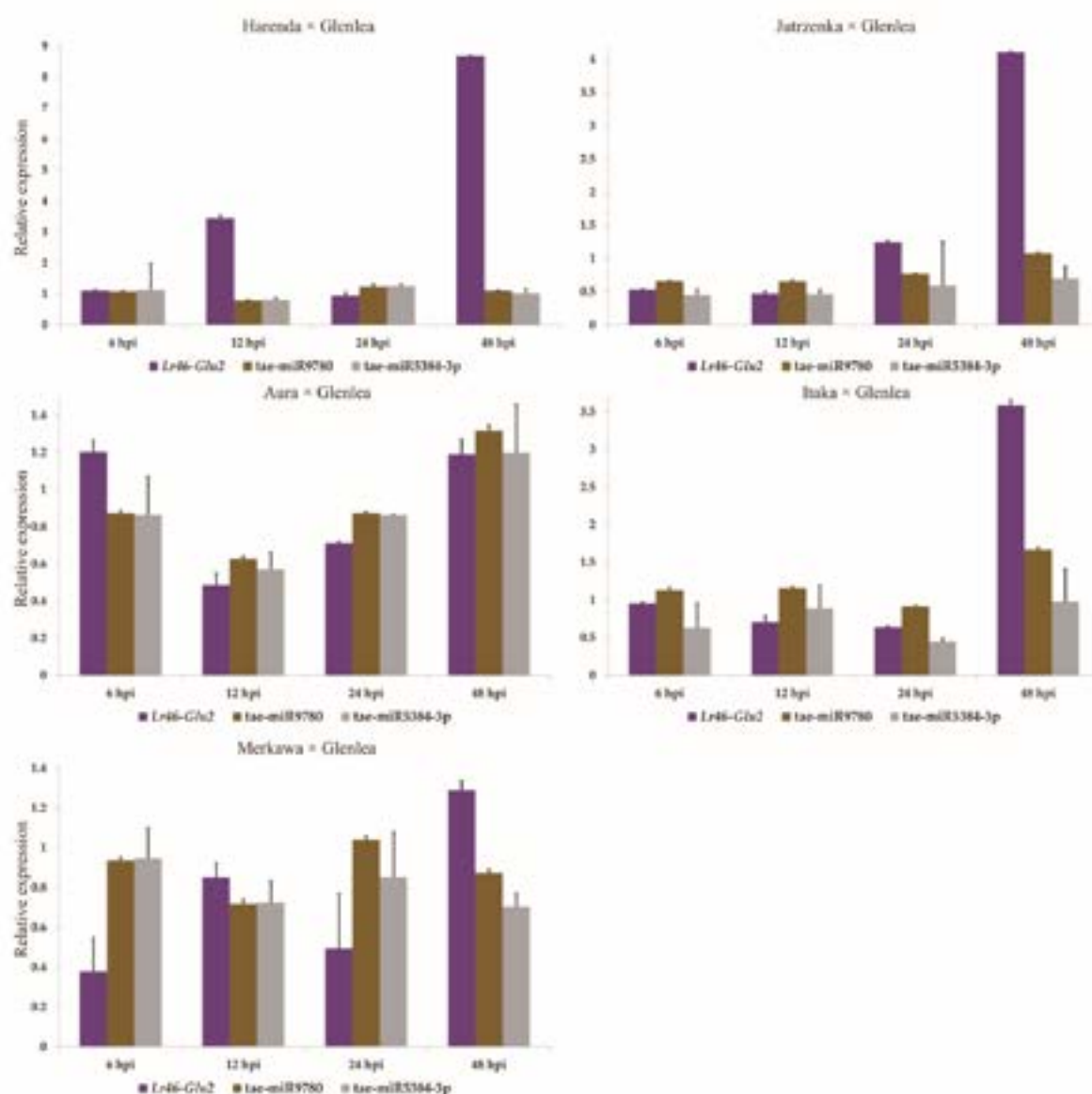


Figure 5. Analysis of complementary *tae-miR9780* and *tae-miR5384-3p* expression compared to *Lr46-Glu2* expression patterns during *P. tritici* infection. Numbers 6, 12, 24, and 48 indicate hours post inoculation (hpi). The graphs show the relative expression values compared to the 0 hpi time point. Error bars shown indicate standard error (SE). The expression data shown were obtained from the average of three biological replicates, and each biological replicate had three technical replicates.

Comparing the expression of *tae-miR9780* molecules with the expression profile of *Lr46-RLK2*, we observed variability among the hybrids tested (Figure 6). In each hybrid form (except Harenda x Glenlea), we observed the highest expression of *tae-miR9780* at 48 hpi. The fluctuation in *tae-miR9780* expression may suggest its possible role in resistance response to biotic stresses.

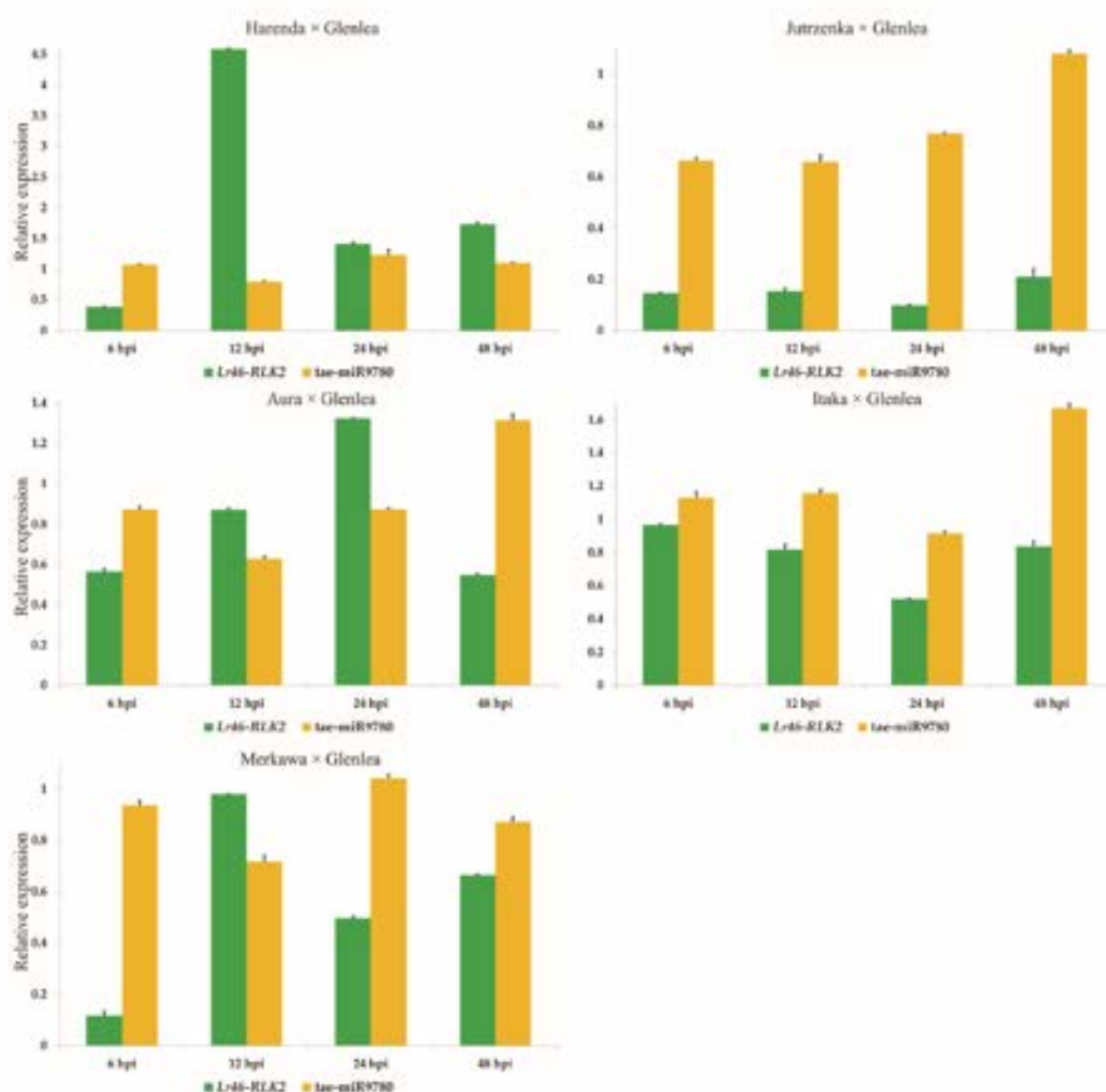


Figure 6. Analysis of complementary taе-miR9780 expression compared to *Lr46-RLK2* expression patterns during *P. tritici* infection. Numbers 6, 12, 24, and 48 indicate hours post inoculation (hpi). The graphs show the relative expression values compared to the 0 hpi time point. Error bars shown indicate standard error (SE). The expression data shown were obtained from the average of three biological replicates, and each biological replicate had three technical replicates.

In contrast, taе-miR164, which is complementary to the candidate gene *RLK3* (TraesCS1B02G454400.1), showed differential expression at pre- and post-inoculation. In the case of the two hybrid forms, Jutrzenka × Glenlea and Aura × Glenlea, we observed a significant increase in the taе-miR164 expression, relative to the pre-inoculation value. For the other hybrids, taе-miR164 expression fluctuated between 6 hpi and 48 hpi after inoculation eventually reaching a lower value than before inoculation (Figure 7). In the case of this candidate gene, there were also no significant correlations between its expression and that of taе-miR164, which is complementary to its sequence.

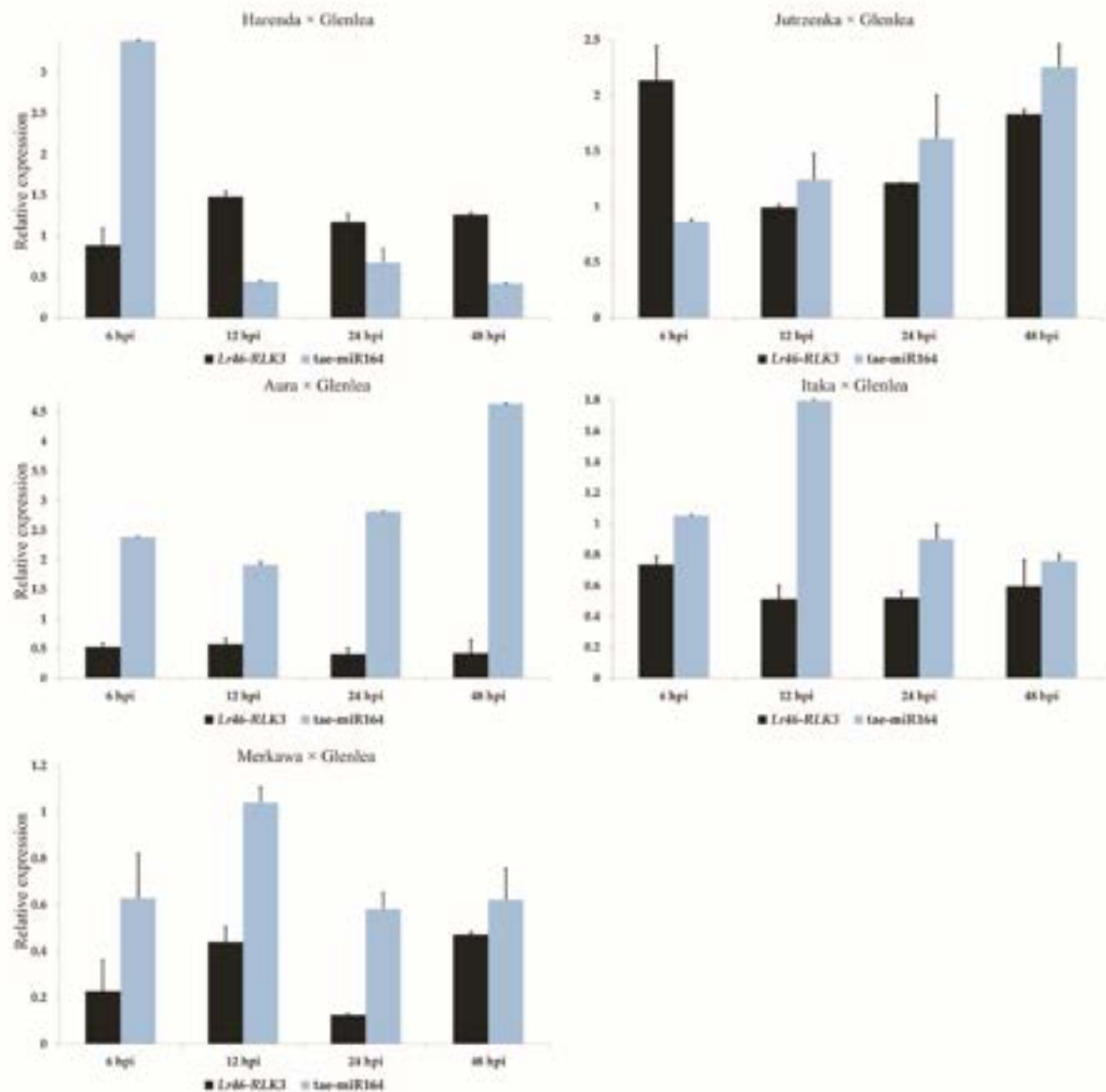


Figure 7. Analysis of complementary *tae-miR164* expression compared to *Lr46-RLK3* expression patterns during *P. triticina* infection. Numbers 6, 12, 24, and 48 indicate hours after inoculation (hpi). The graphs show the relative expression values compared to the 0 hpi time point. Error bars shown indicate standard error (SE). The expression data shown were obtained from the average of three biological replicates, and each biological replicate had three technical replicates.

4. Discussion

According to our research hypothesis, only one gene is responsible for the desired *Pt* type APR resistance. Nevertheless, it is possible that there is a cluster of closely related resistance genes, each of which is effective against different pathogens. Although cloning of these genes would be necessary to provide a definitive test of this hypothesis, examining the ability of the *QYr.acw-1BL* region to produce APR resistance against leaf rust, stem rust, and powdery mildew pathogens may provide valuable information to confirm the

above hypothesis. In our previous study, we were able to analyse the expression profiles for nine of the ten candidate genes included in the *Lr46/Yr29* locus at five time points (0, 6, 12, 24, and 48 hpi): TraesCS1B02G453900.1, TraesCS1B02G454200.1, TraesCS1B02G454500.1, TraesCS1B02G454000.2, TraesCS1B02G454100.1, TraesCS1B02G454400.1, TraesCS1B02G454600.1, TraesCS1B02G453700.1, and TraesCS1B02G455000.1. In this study, we showed that of all the genes analysed, the candidate gene *Lr46-Glu2* showed the highest expression level after inoculation by *P. triticina*. This may indicate its important role in resistance processes. Another gene with lower but significant expression was another *Lr46* candidate gene, *Lr46-RLK3*. The results indicate that the candidate gene *Lr46-Glu2* may be involved in the resistance response of the plants. After inoculation by *Pt* fungus, for all hybrid combinations 24 hpi after inoculation, its expression level increases intensely reaching higher values than before inoculation. In our previous study, we observed the same trend in the *Lr46-Glu2* expression profile at the selected time points after inoculation by *Pt*. The *Lr46-Glu2* analysis included five reference-resistant wheat cultivars, where its highest expression was observed at 24 and 48 hpi. The expression of this gene was also not potentially down-regulated by the complementary to its sequence *tae-miR5384-3p*.

Compared to the *Lr46-Glu2* candidate gene, the *Lr46-RLK3* gene appears to be less involved in the defence response after *P. triticina* infection, since in up to three hybrids (Itaka × Glenlea, Aura × Glenlea, and Merkawa × Glenlea), its expression levels fluctuated over time, eventually taking on lower values than before inoculation. Among the selected candidate genes in the work of Cobo et al. [22], three candidate genes (TraesCS1B02G453900.1, TraesCS1B02G454200.1, and TraesCS1B02G454500.1) are ENDO-1,3-BETA-GLUCAN GLUCOSIDASE, enzymes belonging to the PR2 class, involved in the response of wheat to biotic stresses. According to the literature, these are proteins involved in plant defence mechanisms through hydrolysis of the fungal cell wall. In a recent study, an increase in endo-1,3-beta-glucosidase glucan was observed during drought stress [36]. β-1,3-glucanases belong to the PR-2 family of plant pathogenesis-related proteins (PRs). They are enzymes that are abundant in plants and have numerous functions related to cell division, are involved in transport through plasmodesmata and in the resistance response to stresses [37].

Many receptor-like kinase (RLK) gene families can be found in plants. In the work of Cobo et al. [22], four of the candidate genes are RLK genes (TraesCS1B02G454000.2, TraesCS1B02G454100.1, TraesCS1B02G454400.1, and TraesCS1B02G454600.1), which encode proteins important for recognising extracellular signals and initiating intracellular signalling cascades in response to these stimuli. RLKs in this region encode proteins with two extracellular domains that are characteristic of a subgroup of cysteine-rich receptor kinases [22,38,39]. It has been proposed that members of this sub-group may be involved in redox signalling [38]. RLKs are membrane proteins located in the extracellular domain of the receptor and are involved in both biotic and abiotic stress responses. The extracellular ligand-binding domain, the transmembrane domain, and the intracellular protein kinase domain are typical components of RLKs. The extracellular domain, which is specific to individual RLKs, binds a particular ligand and allows RLKs to respond to different types of signals. Among the receptor-like kinases (RLKs), variants such as leucine-rich repeats (LRR), lectin (Lec), lysine motif (LysM), or wall-associated kinases (WAK) are distinguished [39,40]. Receptor-like protein kinases (rlk) make the largest known family of protein kinases that are important in plant response to pathogen infection. Gu et al. [39] discovered a new cysteine-rich RLK gene, *TaCRK2*, which positively regulates resistance to infection caused by *Pt* in wheat. In a recent study by Hajiahmadi et al. [41], researchers investigated the expression of differentially expressed genes induced by biotic stress induced by *P. triticina*, which was characterised in an isogenic line carrying the *Lr57* gene. The highest number of transcripts undergoing expression was detected in 12 hpi. Interestingly, among these transcripts, a cysteine-rich receptor-like protein kinase was expressed only in the resistance genotype at 12 hpi.

In this study, we also analysed expression patterns of *tae-miR5384-3p*. We observed that the *tae-miR5384-3p* expression level after inoculation fluctuated, eventually taking

values lower or equal to the initial values before inoculation. Therefore, this can suggest that *tae-miR5384-3p* did not specifically repress the *Lr46-Glu2* gene, as gene expression increased after inoculation. However, one of the target functions of *tae-miR5384-3p* may be to inhibit a number of genes in the TaFAB2 subfamily that are associated with the formation of unsaturated fatty acids, which play an important role in plant development and in response to biotic and abiotic stresses [42]. In contrast, *tae-miR5384-3p* showed a very high increase in expression level after treating wheat seedlings with a chitosan suspension [43]. The type of fluctuating relative expression profiles is commonly observed for small RNA sequencing or qRT-PCR-based miRNA expression analysis under different biotic and abiotic stress conditions [44]. Such a phenomenon may relate to changing defence mechanisms in the early and late stages of the plant response [44].

In comparison to model plants such as rice and *Arabidopsis*, research into the role and function of miRNAs in wheat has been significantly delayed. The challenging aspect is the common wheat genome, which is huge (approximately 16 Gbp) and complex containing repetitive sequences, including retrotransposons, that account for as much as about 85% of the genome [24,45]. Plant tolerance to abiotic and biotic stresses are only a few of the biological or agronomic traits that can be improved with new biotechnology tools based on miRNA-encoding *MIR* genes. A more profound understanding of the regulation and expression profile of *MIR* genes related to intrinsic traits of RNA interference (RNAi) mechanisms, tolerance to abiotic or biotic stresses, and exploiting the advantages offered by new biotechnology tools can lead to practical biotechnology applications to improve agronomic traits in many crops worldwide. Furthermore, with this knowledge, new biotechnological products can be created with greater practicality, reduced generation time, and lower costs [46].

The miR164 family is one of the most conserved groups of miRNAs in plants [24]. One miRNA molecule can control multiple target genes, similar to plant transcription factors. Previous studies have shown that miR164 targets plant-specific NAC transcription factors [1]. The majority of NACs play an essential role in the regulation of plant development and in the response to abiotic and biotic stresses. The functions of miR164 have been identified in plant responses to biotic stresses. The main function attributed to miR164 is to regulate transcript levels of relevant genes [47–49]. This miRNA also targets the selected candidate gene *Lr46-RLK3*. In our study, in the majority of tested wheat cultivars, when candidate gene expression increased, *tae-miR164* was down-regulated, and vice versa: when miRNA expression increased, the candidate gene expression values were down-regulated. The decrease in *tae-miR164* may be related to the activation of *Lr46-RLK3* gene-dependent immune mechanisms, observed as a rapid gene response to the pathogen. Moreover, we observed similar interactions in our previous work on *tae-miR164* [34]. Recent studies on miRNAs associated with the endoplasmic reticulum (ER) stress response have shown that *tae-miR164* plays a negative regulatory role in wheat in response to drought, salt, and heat stress. The *tae-miR164* molecule, together with *tae-miR2916* and *tae-miR396e-5p*, has been identified as an ER stress-responsive miRNA [17].

5. Conclusions

In this study, we analyse the expression profiles of *Lr34*, *Lr67*, four candidate genes located at the *Lr46* locus, and five complementary miRNAs (*tae-miR9653b*, *tae-miR5384-3p*, *tae-miR9780*, *tae-miR9775*, and *tae-miR164*), in response to *Pt* infection. Sustained host-plant resistance to leaf rust is one of the most important traits that breeding programmes should invest in, allowing for reduced fungicide use and promoting greater stability and sustainability of yield levels. The effect of gene combinations, the presence of unidentified genes, and different expression levels of resistance genes as well as other biotic and abiotic factors can cause different responses of cultivars carrying the same resistance genes to *P. triticina*. Sources of race-specific and non-race-specific genes can be used to be pyramided with other effective *Lr* genes. The use of highly advanced and high-throughput tools such as field pathogenomics, transgenetics, and genome editing to study both host and pathogen

organisms will be helpful in achieving broad-spectrum and durable resistance to leaf rust in common wheat.

In our study, we analysed the genes and miRNAs expression pathways in hybrid forms: Harenda × Glenlea, Jutrzenka × Glenlea, Aura × Glenlea, Itaka × Glenlea, and Merkawa × Glenlea. The *Lr34* gene, as in our previous study, showed relatively low expression at the time points studied. However, it is possible to observe that *Lr34* expression at 24 and 48 hpi increases, and *tae-miR9653b* expression decreases. Therefore, it can be concluded that *tae-miR9653b* may be involved in the control of the defence response. Among the candidate genes for *Lr46*, the least diverse expression profile was observed for the candidate gene *Lr46-Glu2*, with an increase in its expression at 24 hpi, which may suggest activation of the defence response in tested hybrid forms. The expression level of *Lr46-Glu2* significantly exceeded the pre-inoculation baseline in all tested wheat hybrids.

Our research highlights the need to understand the molecular basis of plant-pathogen interactions, and this will enable the development of new strategies for *Pt* resistance. To determine the allelic variation of the *Lr46* locus gene(s), cloning and functional analysis of the gene(s) is essential. This achievement would allow the development of more specific molecular markers for *Lr46*, which would facilitate line selection in wheat resistance breeding.

Author Contributions: Conceptualization, A.T. and M.T.K.; methodology, J.S., A.T. and J.B.; software, J.B.; validation, A.T., J.S., J.B., A.N., R.B. and A.S.; formal analysis, J.S., A.T. and J.B.; investigation, J.S. and A.T.; resources, J.S. and A.T.; data curation, J.S. and J.B.; writing—original draft preparation, J.S.; writing—review and editing, A.T., J.S., J.B., A.N., R.B. and A.S.; visualization, J.B.; supervision, A.T. and M.T.K.; project administration, J.S.; funding acquisition, J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research is financed by the framework of the 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.” (DHR.hm.802.11.2023); Project leader: M.T. Kwiatek.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Chi, Q.; Du, L.; Ma, W.; Niu, R.; Wu, B.; Guo, L.; Ma, M.; Liu, X.; Zhao, H. The miR164-TaNAC14 Module Regulates Root Development and Abiotic-Stress Tolerance in Wheat Seedlings. *J. Integr. Agric.* **2023**, *22*, 981–998. [\[CrossRef\]](#)
2. Beukert, U.; Liu, G.; Thorwarth, P.; Boeven, P.H.G.; Longin, C.F.H.; Zhao, Y.; Ganai, M.; Serfling, A.; Ordon, F.; Reif, J.C. The Potential of Hybrid Breeding to Enhance Leaf Rust and Stripe Rust Resistance in Wheat. *Theor. Appl. Genet.* **2020**, *133*, 2171–2181. [\[CrossRef\]](#)
3. Huerta-Espino, J.; Singh, R.P.; Germán, S.; McCallum, B.D.; Park, R.F.; Chen, W.Q.; Bhardwaj, S.C.; Goyeau, H. Global Status of Wheat Leaf Rust Caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica* **2011**, *179*, 143–160. [\[CrossRef\]](#)
4. Bolton, M.D.; Kolmer, J.A.; Xu, W.W.; Garvin, D.F. *Lr34*-Mediated Leaf Rust Resistance in Wheat: Transcript Profiling Reveals a High Energetic Demand Supported by Transient Recruitment of Multiple Metabolic Pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2008**, *21*, 1515–1527. [\[CrossRef\]](#)
5. Figlan, S.; Ntushelo, K.; Mwadzingeni, L.; Terefe, T.; Tsilo, T.; Shimelis, H. Breeding Wheat for Durable Leaf Rust Resistance in Southern Africa: Variability, Distribution, Current Control Strategies, Challenges and Future Prospects. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 549. [\[CrossRef\]](#)
6. Bariana, H.S.; Bansal, U.K.; Basandrai, D.; Chhetri, M. Disease Resistance. In *Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops*; Kole, C., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 291–314, ISBN 978-3-642-37047-2.
7. Bariana, H.S.; Babu, P.; Forrest, K.L.; Park, R.F.; Bansal, U.K. Discovery of the New Leaf Rust Resistance Gene *Lr82* in Wheat: Molecular Mapping and Marker Development. *Genes* **2022**, *13*, 964. [\[CrossRef\]](#)
8. Ellis, J.G.; Lagudah, E.S.; Spielmeier, W.; Dodds, P.N. The Past, Present and Future of Breeding Rust Resistant Wheat. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 641. [\[CrossRef\]](#)

9. Kumar, K.; Jan, I.; Saripalli, G.; Sharma, P.K.; Mir, R.R.; Balyan, H.S.; Gupta, P.K. An Update on Resistance Genes and Their Use in the Development of Leaf Rust Resistant Cultivars in Wheat. *Front. Genet.* **2022**, *13*, 816057. [CrossRef]
10. Qureshi, N.; Bariana, H.; Kumran, V.V.; Muruga, S.; Forrest, K.L.; Hayden, M.J.; Bansal, U. A New Leaf Rust Resistance Gene *Lr79* Mapped in Chromosome 3BL from the Durum Wheat Landrace Aus26582. *Theor. Appl. Genet.* **2018**, *131*, 1091–1098. [CrossRef]
11. Bokore, F.E.; Cuthbert, R.D.; Knox, R.E.; Hiebert, C.W.; Pozniak, C.J.; Berrales, S.; Ruan, Y.; Meyer, B.; Hucl, P.; McCallum, B.D. Genetic Mapping of Leaf Rust (*Puccinia Triticini* Eriks) Resistance Genes in Six Canadian Spring Wheat Cultivars. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, 1130768. [CrossRef]
12. Pinto da Silva, G.B.; Zanella, C.M.; Martinselli, J.A.; Chaves, M.S.; Hiebert, C.W.; McCallum, B.D.; Boyd, L.A. Quantitative Trait Loci Conferring Leaf Rust Resistance in Hexaploid Wheat. *Phytopathology* **2018**, *108*, 1344–1354. [CrossRef]
13. Reynolds, M.P.; Braun, H.-J. Wheat Improvement. In *Wheat Improvement*; Reynolds, M.P., Braun, H.-J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022; pp. 3–15, ISBN 978-3-030-90672-6.
14. Cloutier, S.; Reimer, E.; Khadka, B.; McCallum, B.D. Variations in Exons 11 and 12 of the Multi-Pest Resistance Wheat Gene *Lr34* Are Independently Additive for Leaf Rust Resistance. *Front. Plant Sci.* **2023**, *13*, 1061490. [CrossRef]
15. Krattinger, S.G.; Lagudah, E.S.; Spielmeier, W.; Singh, R.P.; Huerta-Espino, J.; McFadden, H.; Bossolini, E.; Selter, L.L.; Keller, B. A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat. *Science* **2009**, *323*, 1360–1363. [CrossRef]
16. Moore, J.W.; Herrera-Foessel, S.; Lan, C.; Schnippenkoetter, W.; Ayliffe, M.; Huerta-Espino, J.; Lillemo, M.; Viccars, L.; Milne, R.; Periyannan, S.; et al. A Recently Evolved Hexose Transporter Variant Confers Resistance to Multiple Pathogens in Wheat. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1494–1498. [CrossRef]
17. Chen, Y.; Yu, X. Endoplasmic Reticulum Stress-Responsive microRNAs Are Involved in the Regulation of Abiotic Stresses in Wheat. *Plant Cell Rep.* **2023**, *42*, 1433–1452. [CrossRef]
18. Rajagopalan, N.; Lu, Y.; Burton, I.W.; Monteil-Rivera, F.; Halasz, A.; Reimer, E.; Tweidt, R.; Brülé-Babel, A.; Kutcher, H.R.; You, F.M.; et al. A Phenylpropanoid Diglyceride Associates with the Leaf Rust Resistance *Lr34res* Gene in Wheat. *Phytochemistry* **2020**, *178*, 112456. [CrossRef]
19. Kolmer, J.A.; Su, Z.; Bernardo, A.; Bai, G.; Chao, S. A Backcross Line of Thatcher Wheat with Adult Plant Leaf Rust Resistance Derived from Duster Wheat Has *Lr46* and *Lr77*. *Phytopathology* **2019**, *109*, 127–132. [CrossRef]
20. William, M.; Singh, R.P.; Huerta-Espino, J.; Islas, S.O.; Hoisington, D. Molecular Marker Mapping of Leaf Rust Resistance Gene *Lr46* and Its Association with Stripe Rust Resistance Gene *Yr29* in Wheat. *Phytopathology* **2003**, *93*, 153–159. [CrossRef]
21. Lillemo, M.; Asaf, B.; Singh, R.P.; Huerta-Espino, J.; Chen, X.M.; He, Z.H.; Bjørnstad, Å. The Adult Plant Rust Resistance Loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* Are Important Determinants of Partial Resistance to Powdery Mildew in Bread Wheat Line Saar. *Theor. Appl. Genet.* **2008**, *116*, 1155–1166. [CrossRef]
22. Cobo, N.; Warjagi, H.; Lagudah, E.; Dubcovsky, J. A High-Resolution Map of Wheat QYr.ucw-1BL, an Adult Plant Stripe Rust Resistance Locus in the Same Chromosomal Region as *Yr29*. *Plant Genome* **2019**, *12*, 180055. [CrossRef]
23. Jain, N.; Sinha, N.; Krishna, H.; Singh, P.K.; Gautam, T.; Prasad, P.; Balyan, H.S.; Gupta, P.K. A Study of miRNAs and lncRNAs during *Lr28*-Mediated Resistance against Leaf Rust in Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2020**, *112*, 101552. [CrossRef]
24. Feng, H.; Wang, B.; Zhang, Q.; Fu, Y.; Huang, L.; Wang, X.; Kang, Z. Exploration of microRNAs and Their Targets Engaging in the Resistance Interaction between Wheat and Stripe Rust. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 469. [CrossRef]
25. Lagudah, E.S.; McFadden, H.; Singh, R.P.; Huerta-Espino, J.; Bariana, H.S.; Spielmeier, W. Molecular Genetic Characterization of the *Lr34/Yr18* Slow Rusting Resistance Gene Region in Wheat. *Theor. Appl. Genet.* **2006**, *114*, 21–30. [CrossRef]
26. Hiebert, C.W.; Thomas, J.B.; McCallum, B.D.; Humphreys, D.G.; DePauw, R.M.; Hayden, M.J.; Mago, R.; Schnippenkoetter, W.; Spielmeier, W. 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.* **2010**, *121*, 1083–1091. [CrossRef]
27. Bobrowska, R.; Noweiska, A.; Sychala, J.; Tomkowiak, A.; Nawracała, J.; Kwiatek, M.T. Diagnostic Accuracy of Genetic Markers for Identification of the *Lr46/Yr29* “Slow Rusting” Locus in Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Biomol. Concepts* **2022**, *13*, 1–9. [CrossRef]
28. Sychala, J.; Tomkowiak, A.; Noweiska, A.; Bobrowska, R.; Bocianowski, J.; Książkiewicz, M.; Sobiech, A.; Kwiatek, M.T. Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance Genes *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* in Common Wheat (*Triticum Aestivum* L.) and Associated miRNAs Patterns. *Genes* **2023**, *14*, 1376. [CrossRef]
29. Kramer, M.P. Stem-Loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2011**, *95*, 1–15. [CrossRef]
30. Forero, D.A.; González-Giraldo, Y.; Castro-Vega, L.J.; Barreto, G.E. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *Biotechniques* **2019**, *67*, 192–199. [CrossRef]
31. Noweiska, A.; Bobrowska, R.; Sychala, J.; Tomkowiak, A.; Kwiatek, M.T. Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Identification of Race Specific and Non-Specific Leaf Resistance Genes in Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *J. Appl. Genet.* **2023**, *64*, 55–64. [CrossRef]
32. VSN International. *VSN International Genstat for Windows*, 23rd ed.; VSN International: Hemel Hempstead, UK, 2023.
33. Tomkowiak, A.; Bobrowska, R.; Kwiatek, M.; Sychala, J.; Kuczyński, J.; Tyczewska, A.; Kowalczyński, P.; Weigt, D.; Kosiada, T. Analysis of miRNA Expression Associated with Gene *Lr34* Responsible for Resistance Mechanisms to Wheat Leaf Rust. *Pak. J. Bot.* **2023**, *55*, 379–385. [CrossRef]

34. Ren, Y.; Singh, R.P.; Basnet, B.R.; Lan, C.X.; Huerta-Espino, J.; Lagudah, E.S.; Ponce-Molina, L.J. Identification and Mapping of Adult Plant Resistance Loci to Leaf Rust and Stripe Rust in Common Wheat Cultivar Kundan. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 456–463. [CrossRef] [PubMed]
35. Bernardo, L.; Morcia, C.; Carletti, P.; Ghizzoni, R.; Badeck, F.W.; Rizza, F.; Lucini, L.; Terzi, V. Proteomic Insight into the Mitigation of Wheat Root Drought Stress by Arbuscular Mycorrhizae. *J. Proteom.* **2017**, *169*, 21–32. [CrossRef] [PubMed]
36. Zhang, S.-B.; Zhang, W.-J.; Zhai, H.-C.; Lv, Y.-Y.; Cai, J.-P.; Jia, F.; Wang, J.-S.; Hu, Y.-S. Expression of a Wheat β -1,3-Glucanase in *Pichia Pastoris* and Its Inhibitory Effect on Fungi Commonly Associated with Wheat Kernel. *Protein Expr. Purif.* **2019**, *154*, 134–139. [CrossRef] [PubMed]
37. Chen, Z. A Superfamily of Proteins with Novel Cysteine-Rich Repeats. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 473–476. [CrossRef] [PubMed]
38. Gu, J.; Sun, J.; Liu, N.; Sun, X.; Liu, C.; Wu, L.; Liu, G.; Zeng, F.; Hou, C.; Han, S.; et al. A Novel Cysteine-rich Receptor-like Kinase Gene, TrCRK2, Contributes to Leaf Rust Resistance in Wheat. *Mol. Plant Pathol.* **2020**, *21*, 732–746. [CrossRef] [PubMed]
39. Yan, J.; Su, P.; Meng, X.; Liu, P. Phylogeny of the Plant Receptor-like Kinase (RLK) Gene Family and Expression Analysis of Wheat RLK Genes in Response to Biotic and Abiotic Stresses. *BMC Genom.* **2023**, *24*, 224. [CrossRef] [PubMed]
40. Yadav, I.S.; Sharma, A.; Kaur, S.; Nahar, N.; Bhardwaj, S.C.; Sharma, T.R.; Chhuneja, P. Comparative Temporal Transcriptome Profiling of Wheat near Isogenic Line Carrying *Lr57* under Compatible and Incompatible Interactions. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1943. [CrossRef]
41. Hajjahmadi, Z.; Abedi, A.; Wei, H.; Sun, W.; Ruan, H.; Zhuge, Q.; Movahedi, A. Identification, Evolution, Expression, and Docking Studies of Fatty Acid Desaturase Genes in Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *BMC Genom.* **2020**, *21*, 778. [CrossRef]
42. Zhang, L.; Wang, K.; Han, Y.; Yan, L.; Zheng, Y.; Bi, Z.; Zhang, X.; Zhang, X.; Min, D. Genome-Wide Analysis of the VQ Motif-Containing Gene Family and Expression Profiles during Phytohormones and Abiotic Stresses in Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *BMC Genom.* **2022**, *23*, 292. [CrossRef]
43. Pandey, R.; Joshi, G.; Bhardwaj, A.R.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S. A Comprehensive Genome-Wide Study on Tissue-Specific and Abiotic Stress-Specific miRNAs in *Triticum Aestivum*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95800. [CrossRef]
44. Brenchley, R.; Spannagl, M.; Pfeifer, M.; Barker, G.L.A.; D'Amore, R.; Allen, A.M.; McKenzie, N.; Kramer, M.; Kerhornou, A.; Bolser, D.; et al. Analysis of the Bread Wheat Genome Using Whole-Genome Shotgun Sequencing. *Nature* **2012**, *491*, 705–710. [CrossRef]
45. Basso, M.F.; Ferreira, P.C.G.; Kobayashi, A.K.; Harmon, F.G.; Nepomuceno, A.L.; Molinari, H.B.C.; Grossi-de-Sa, M.F. MicroRNAs and New Biotechnological Tools for Its Modulation and Improving Stress Tolerance in Plants. *Plant Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 1482–1500. [CrossRef] [PubMed]
46. Bazzini, A.A.; Hopp, H.E.; Beachy, R.N.; Asurmendi, S. Infection and Coaccumulation of Tobacco Mosaic Virus Proteins Alter microRNA Levels, Correlating with Symptom and Plant Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12157–12162. [CrossRef] [PubMed]
47. Feng, H.; Daan, X.; Zhang, Q.; Li, X.; Wang, B.; Huang, L.; Wang, X.; Kang, Z. The Target Gene of *Tae-miR164*, a Novel NAC Transcription Factor from the NAM Subfamily, Negatively Regulates Resistance of Wheat to Stripe Rust. *Mol. Plant Pathol.* **2014**, *15*, 284–296. [CrossRef] [PubMed]
48. Jia, X.; Ren, L.; Chen, Q.-J.; Li, R.; Tang, G. UV-B-Responsive microRNAs in *Populus Tremula*. *J. Plant Physiol.* **2009**, *166*, 2046–2057. [CrossRef]
49. Tomkowiak, A.; Jedrzejewski, T.; Spychała, J.; Kuczyński, J.; Kwiatek, M.T.; Tyczewska, A.; Skowrońska, R.; Twardowski, T. Analysis of miRNA Expression Associated with the *Lr46* Gene Responsible for APR Resistance in Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *J. Appl. Genet.* **2020**, *61*, 503–511. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

12. Oświadczenia współautorów prac