



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

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

Okres realizacji zadania: **1 stycznia 2023 r. – 31 grudnia 2023 r.**

Planowane nakłady w zł: **399 859,00**

**Kierownik:**

prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek,  
michal.kwiatek@up.poznan.pl, m.kwiatek@ihar.edu.pl

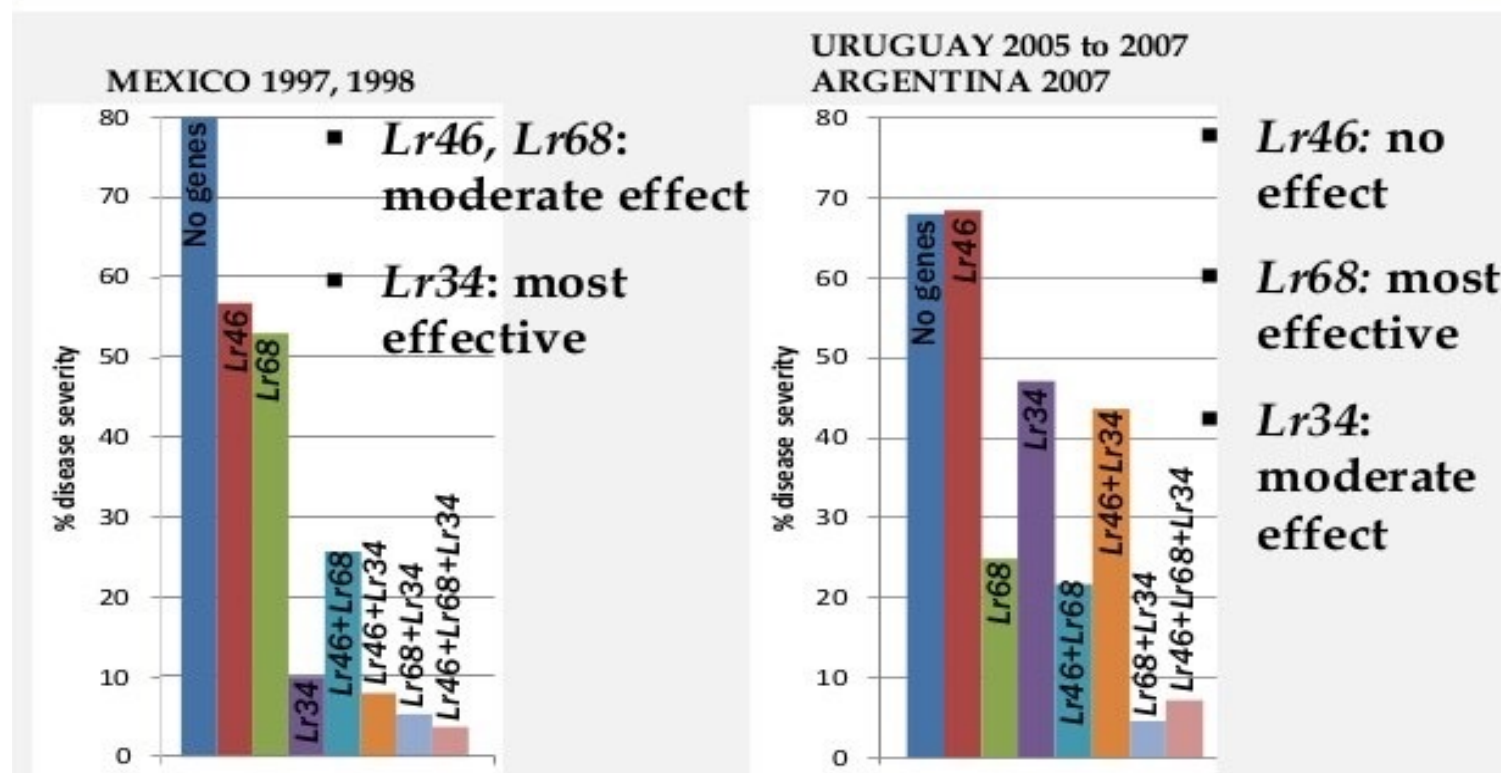
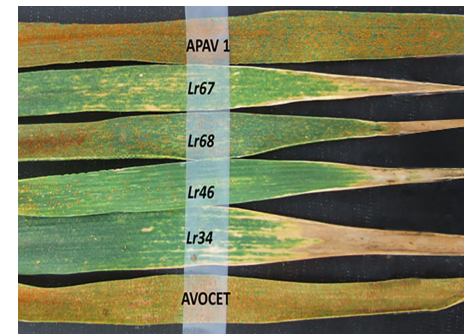
**Wykonawcy:**

Prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak  
Prof. UPP dr hab. Łukasz Wolko  
Dr inż. Roksana Skowrońska  
Dr inż. Sylwia Mikołajczyk  
Mgr inż. Aleksandra Noweiska  
Mgr inż. Julia Spychała  
Anna Jagieniak – pracownik techniczny  
Paweł Poślednik – pracownik techniczny

## Hipoteza badawcza projektu

Piramidyzacja genów warunkujących odporność horyzontalną i wertykalną może podwyższyć stopień odporności na rdzę brunatną

- *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* – 7DS
- *Lr46/Yr29/Pm39* – 1BL
- *Lr67/Yr49* – 4DL
- *Lr68* – 7BL



Huerta-Espino J, i in. (2020) Front. Plant Sci. 11:824. doi: 10.3389/fpls.2020.00824

## Plan zadania badawczego w latach 2021-2027

Rok	Czynności w chronologicznym ujęciu przyczynowo-skutkowym
2021	<ol style="list-style-type: none"><li>1. <u>Analiza molekularna</u> genotypów donorowych w celu doboru komponentów do krzyżowań.</li><li>2. Wysiew donorowych i akceptorowych genotypów <b>ozimych</b>.</li></ol>
2022	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Wysiew donorowych i akceptorowych genotypów <b>jarych</b>.</li><li>2. Krzyżowanie genotypów donorowych z akceptorowymi.</li><li>3. Wysiew <b>ozimych</b> genotypów pokolenia <b>F1</b> oraz <u>analiza molekularna</u>.</li></ol>
2023	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Wysiew <b>jarych</b> genotypów pokolenia <b>F1</b> oraz <u>analiza molekularna</u>.</li><li>2. Krzyżowanie genotypów <b>F1</b> z genotypami akceptorowymi.</li><li>3. Wysiew <b>ozimych</b> genotypów pokolenia <b>BC1F1</b> oraz <u>analiza molekularna</u>.</li></ol>
2024	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Wysiew <b>jarych</b> genotypów pokolenia <b>BC1F1</b> oraz <u>analiza molekularna</u>.</li><li>2. Krzyżowanie genotypów <b>BC1F1</b> z genotypami akceptorowymi.</li><li>3. Wysiew <b>ozimych</b> genotypów pokolenia <b>BC2F1</b> oraz <u>analiza molekularna</u>.</li></ol>
2025	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Wysiew <b>jarych</b> genotypów pokolenia <b>BC2F1</b> oraz <u>analiza molekularna</u>.</li></ol>
do 2027	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Analizy porażenia oraz <u>analizy molekularne</u> w trzyletnim doświadczeniu polowym.</li></ol>

Obramowano czynności w roku sprawozdawczym 2023

# Cele zadania w 2023

Temat badawczy	Cel	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Koszty realizacji tematu badawczego	Czy cel został zrealizowany (tak/nie/częściowo)
1.	Analiza molekularna 2000 prób pszenicy ozimej powstałej w wyniku krzyżowań, w celu identyfikacji markerów genów typu odporności poziomej („slow rusting”) oraz pionowej	1 – 12	151 929,50 zł	częściowo
2.	Analizy 150 prób pobranych z pięciu genotypów kombinacji krzyżowań (fitotron) w celu określenia ekspresji genów typu „slow rust”.	1 – 12	247 929,50 zł	częściowo

## Cele nr 1 i 2 nie zostały w pełni zrealizowane - stan na 24 listopada 2023 r. - powody oraz sposoby realizacji:

- Decyzja Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi o przyznaniu środków - 18 września 2023 r.
- Środki finansowe zostały przekazane Uczelni dnia 11 października 2023 roku.
- Braki zgody JM Rektora UPP na prefinansowanie realizacji zadania.
- Wydatkowanie środków rozpoczęto po uzyskaniu informacji o transferze środków tj. od 12 października br.
- 33 dni od transferu środków finansowych do daty przestania sprawozdania wstępnego.
- W ostatnim tygodniu listopada oraz w grudniu 2023 r. przeanalizowane zostaną pozostałe wyniki analiz molekularnych w ramach tematu badawczego nr 1 oraz ddPCR wraz z analizą statystyczną wszystkich danych uzyskanych w ramach tematu badawczego nr 2.

# Materiał badawczy i metody – temat badawczy nr 1

Formy ozime BC1F1				Formy jare F1			
Spółka	Kombinacja	Liczba otrzymanych genotypów w 2023 - wysiew w 2023	Liczba przeanalizowanych genotypów	Spółka	Kombinacja	Liczba otrzymanych genotypów w 2022 – wysiew w 2023	Liczba przeanalizowanych genotypów
DAN	Bataja x TX	32	32	DAN	Itaka x Glenlea	55	55
DAN	Bataja x Purdue	0	0	DAN	Itaka x NP846	0	0
DAN	Kariadyda x TX	75	75	DAN	Itaka x A99AR	0	0
DAN	Kariadyda x Purdue	0	0	MHR	Harenda x Glenlea	2	2
MHR	Medalistka x TX	10	10	MHR	Harenda x NP846	2	2
MHR	Medalistka x Purdue	29	29	MHR	Harenda x A99AR	2	2
PHR	AND x TX	20	20	MHR	Jutrzenka x Glenlea	1	1
PHR	AND x Purdue	20	20	MHR	Jutrzenka x NP846	1	1
PHR	NAD x TX	20	20	MHR	Jutrzenka x A99AR	1	1
PHR	NAD x Purdue	20	20	PHR	Carusum x Glenlea	3	3
SMH	Symetria x TX	0	0	PHR	Carusum x NP846	9	9
SMH	Symetria x Purdue	0	0	PHR	Carusum x A99AR	0	0
STH	Euforia x TX	180	120	SMH	Merkawa x Glenlea	0	0
STH	Euforia x Purdue	140	48	SMH	Merkawa x NP846	1	1
				SMH	Merkawa x A99AR	2	2
				STH	Aura x Glenlea	18	18
				STH	Aura x NP846	19	19
				STH	Aura x A99AR	13	13
	<b>Suma ozime:</b>	546	314		<b>Suma jare:</b>	129	129
						<b>Liczba otrzymanych genotypów ogółem:</b>	675
						<b>Liczba przeanalizowanych genotypów:</b>	443
						<b>Liczba przeanalizowanych prób:</b>	1329

# Materiał badawczy i metody – temat badawczy nr 1

## Etapy realizacji tematu badawczego nr 1:

1. Analiza pokolenia F1 (formy jare)
2. Analiza pokolenia BC1F1 (formy ozime)
3. Opracowanie i dostosowanie protokołów simpleks i multipleks PCR
4. Analiza markera fenotypowego – LTN



Lp	Gen	Marker	Typ markera	Sekwencje starterów (5' – 3')		T.a. [°C]	Źródło
				Forward	Reverse		
<b>Markery molekularne genów typu „slow rusting”</b>							
1.	Lr34	csLV34	SSR	GTT GGT TAA GAC TGG TGA TGG	TGC TTG CTA TTG CTG AAT AGT	55	MAS Wheat
2.	Lr46	csLV46G22	CAPS	Sekwencje oraz warunki reakcji otrzymane dzięki współpracy z Prof. E. Lagudah'em Poufne do momentu publikacji wyników			
3.		Xwmc44	SSR	GGT CTT CTG GGC TTT GAT CCT G	GTT GCT AGG GAC CCG TAG TGG	61	
4.	Lr67	Xcfd71	SSR	CAA TAA GTA GGC CGG GAC AA	TGT GCC AGT TGA GTT TGC TC	60	MAS Wheat
5.		Xcfd23	SSR	TAG CAG TAG CAG CAG CAG GA	GCA AGG AAG AGT GTT CAG CC	60	
6.	Lr68	csGS	SSR	AAG ATT GTT CAC AGA TCC ATG TCA	GAG TAT TCC GGC TCA AAA AGG	60	
<b>Markery molekularne genów głównych</b>							
7.	Lr10	Lrk10D	SSR	GAA GCC CTT CGT CTC ATC TG	TTG ATT CAT TGC AGA TGA GAT CAC G	60	MAS
8.	Lr13	Xgwm630	SSR	GTG CCT GTG CCA TCG TC	CGA AAG TAA CAG CGC AGT GA	60	Wheat

# Wyniki – temat badawczy 1

Lp.	Genotyp	Donor/akceptor	Geny typu „slow rusting”				Geny główne	
			Lr34	Lr46	Lr67	Lr68	Lr10	Lr13
<b>Pszenvica jara</b>								
1.	Glenlea	Donor	+	+	-	+	-	-
2.	NP846	Donor	+	+	-	+	-	-
3.	A99AR	Donor	+	+	-	+	-	-
4.	Itaka	Akceptor	-	-	-	+	+	-
5.	Merkawa	Akceptor	-	+	-	-	-	+
6.	Aura	Akceptor	-	+	-	-	x	x
7.	Harenda	Akceptor	-	-	-	-	-	+
8.	Jutrzenka	Akceptor	-	-	-	-	-	+
9.	Carusum	Akceptor	-	+	-	+	-	+
<b>Pszenvica ozima</b>								
10.	TX	Donor	+	+	-	-	-	+
11.	Purdue	Donor	-	+	+	+	-	-
12.	Bataja	Akceptor	-	-	-	-	-	-
13.	Kariatyda	Akceptor	-	-	-	-	-	-
14.	Symetria	Akceptor	-	+	-	-	-	+
15.	Euforia	Akceptor	-	+	-	+	-	-
16.	Medalistka	Akceptor	-	+	-	-	-	+
17.	NAD	Akceptor	-	-	-	-	-	-
18.	AND	Akceptor	-	-	-	-	-	-

## 1. Formy jare (F<sub>1</sub>) – korzystne układy:

- Carusum x donory (*Lr34+Lr46+Lr68+Lr13*)
- Merkawa x donory (*Lr34+Lr46+Lr68+Lr13*)
- Jutrzenka x donory (*Lr34+Lr46+Lr68+Lr13*)
- Itaka x donory (*Lr34+Lr46+Lr68+Lr10*)
- Aura x donory (homozygotyczne: *Lr46*)

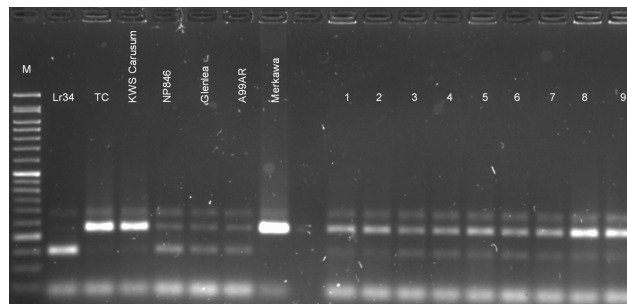
## 2. Formy ozime (BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>) – korzystne układy:

- Euforia x TX (*Lr34+Lr46+Lr68+Lr13*)
- Euforia x Purdue (*Lr46+Lr67+Lr68+Lr13*)
- Medalistka x TX (*Lr34+ Lr46+Lr68+Lr13*)
- Medalistka x Purdue (*Lr46+Lr67+Lr68+Lr13*)

## Formy ozime (F<sub>1</sub>) – korzystne układy:

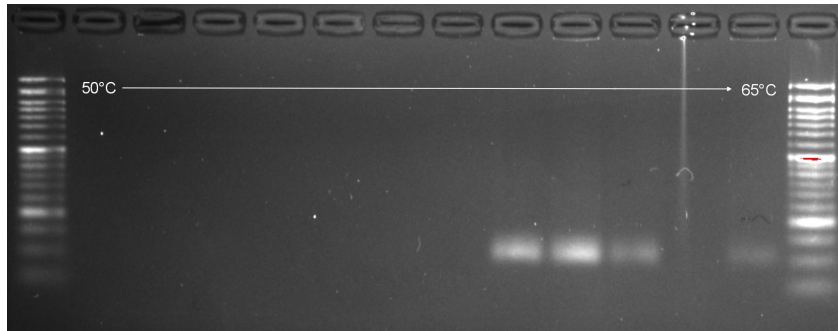
- Symetria x TX (*Lr34+Lr46+Lr68+Lr13*)

**Brak BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>!!! Do powtórzenia!**

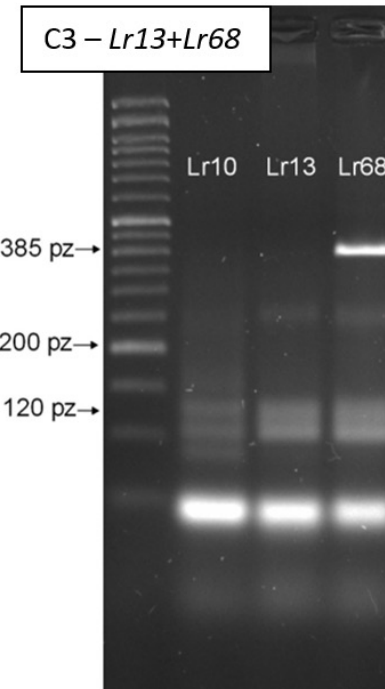
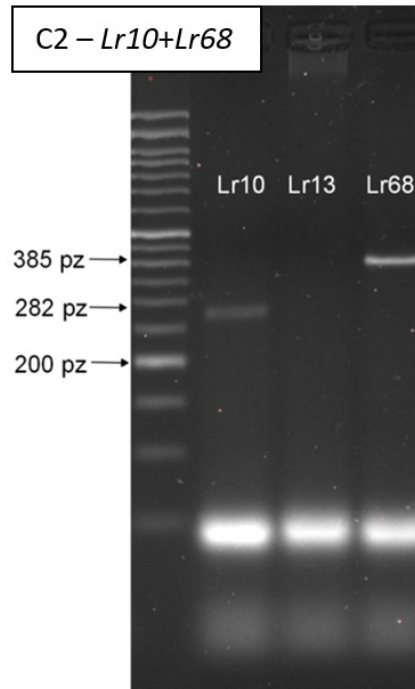
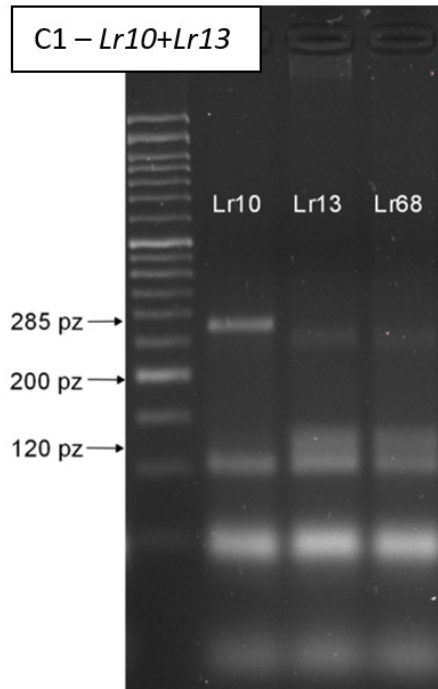


# Wyniki – temat badawczy 1

## Opracowanie i dostosowanie protokołów simpleks i multipleks PCR



Gen – Marker	Sekwencja starterów	Temperatura anealingu*	Wielkość produktu
Lr10 -	F: GAA GCC CTT CGT CTC ATC TG	60°C	282 pz
Lrk10D	R: TTG ATT CAT TGC AGA TGA GAT CAC G		
Lr13 -	F: GTG CCT GTG CCA TCG TC	60°C	120 pz
Xgwm630	R: CGA AAG TAA CAG CGC AGT GA		
Lr68 - csGs	AAG ATT GTT CAC AGA TCC ATG TCA GAG TAT TCC GGC TCA AAA AGG	60°C	385. pz





# Wyniki – temat badawczy 1

## Obserwacje nekrozy końcówek liści (LTN)



- Lr34 - Ltn1,
  - Lr46 - Ltn2,
  - Lr67 - Ltn3,
  - Lr68 - Ltn4.
- 
- Charakterystyczne nekrozy końcówek liści obserwowano u 47 badanych genotypów

Nr	Odmiana/Genotyp	Numer referencyjny	LTN 2021	LTN 2022	LTN 2023															
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						
1.	Ceruga-4	Pi 560118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	San Martin	Pi 116314	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	H 51	Pi 191925	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	Artigas	Pi 192535	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.	Larranaga	Pi 191713	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	ProINTA Imperial NIL Glu-B3i_BuckManant.	Pi 674008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7.	NP 818	Pi 422294	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8.	Buck Manantial	Pi 344455	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.	Janz	Pi 591910	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10.	7536K-51A4	Pi 553001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	7531-V3D	Pi 552994	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12.	Jacui	Pi 520498	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.	P8802-C1*3A2C16	Pi 596351	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14.	P8802-C1*3A2A2U	Pi 596350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.	HD 2329	Pi 648391	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16.	K494	Pi 250413	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.	Glenlea	Ctr 17272	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18.	Artigas	Pi 73046	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19.	Amurskaya 90	Pi 592036	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20.	Lerma Rojo	Ctr 13651	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21.	363-11	Pi 527696	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22.	256-3	Pi 527695	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23.	NP 846	Pi 322263	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24.	75M-505-001-001	Pi 556464	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25.	7531-APSA	Pi 552997	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26.	7531-AG5B	Pi 552996	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27.	7531-AG5A	Pi 552995	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
28.	CM 46725-3P-1P-3P-2P	Pi 520562	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29.	Cook	Pi 442900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30.	PAT 7219	Pi 422416	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31.	HI 617	Pi 422283	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
32.	Oxley	Pi 386167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33.	NP 718	Pi 322236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34.	San Martin	Pi 104137	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35.	A99AR	Pi 600923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36.	Klein San Martin	Pi 191884	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37.	H 51	Pi 184512	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38.	San Martin	Pi 117500	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
39.	San Martin	Ctr 8437	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40.	Record	Ctr 8399	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41.	Frontana	Ctr 12470	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42.	Chris	Ctr 13751	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43.	ROD	Pi 191772	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44.	Frontana 3671	Pi 193932	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45.	Frontana LF 320	Pi193933	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46.	Frontana LF 321	Pi193934	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47.	Fronthatch-1	Pi 290745	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48.	Fronthatch-2	Pi 297014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49.	Fronthatch-3	Pi 299419	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50.	Toropi	Pi 344200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51.	Frontaleza	Pi 351779	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52.	Sparrow	Pi 519725	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53.	Pavon 76	Pi 519847	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
54.	Pavon 76	Pi 520003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55.	Pavon	Pi 520054	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56.	Pavon	Pi 520172	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57.	Myna	Pi 520340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
58.	Junco	Pi 519947	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
59.	Tanager	Pi 519878	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60.	Parula	Pi 520340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
61.	Rayon 89	Pi 591786	+	+	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
62.	Cumpas 88	Pi 591786	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
63.	Mochis 88	Pi 591791	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64.	P8901-AP	Pi 613175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65.	P8901-AQ	Pi 613176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66.	Tlaxcala F2000	Pi 619634	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67.	Lr34	GSTR 433	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68.	IWA8608696	Pi 624623	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69.	Anza	Pi 638742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70.	UC1110	Pi 671999	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
71.	Kern	Pi 672001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
72.	TX89D6435	Pi 584759	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
73.	Purdue	Ctr 13227	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## Wnioski i mierniki – temat badawczy 1

1. Wykorzystano analizy PCR z użyciem pojedynczych markerów (Lr34, Lr46, Lr67, Lr68, Lr10 i Lr13) do określenia obecności alleli genów odporności typu "slow rusting" w pszenicy.
2. Potwierdzono obecność badanych alleli zarówno w ozimych genotypach mieszańcowych pszenicy pokolenia BC1F1, jak i w jarych mieszańcach pokolenia F1.
3. Opracowano trzy protokoły multipleksowego PCR dla głównych genów (Lr10 i Lr13) oraz genów typu "slow rusting" (Lr68) w celu selekcji wspomaganej markerami.
4. Przeprowadzono analizy dotyczące układu allelicznego Lr34+Lr48+Lr68+Lr13, identyfikując korzystne układy alleliczne w roślinach ozimych.
5. W jarych kombinacjach krzyżowanych osiągnięto nadrzędny cel piramidyzacji genów odporności poziomej typu "slow rusting" z genami odporności pionowej.
6. Zidentyfikowano wartościowe kombinacje genów, szczególnie homozygotyczne względem allelu Lr46res, Lr68res, Lr13res, co może zwiększyć trwałość odporności na patogeny.
7. Gen Lr34 jest uznawany za źródło trwałej i rasowo niespecyficznej odporności na różne patogeny.
8. W związku z powyższymi wnioskami, zaproponowano badania z wykorzystaniem technologii CRISPR-Cas9 do dokładnej edycji trzech SNP w genie Lr34 w celu modyfikacji allelu Lr34sus na Lr34res.

L.p	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba genotypów	1000	675
2.	Liczba analizowanych prób	2000	886
3.	Liczba badanych genów	6	6
4.	Liczba analizowanych markerów	8	8

# Temat badawczy 2

## Analiza ekspresji genów typu „slow rusting” w mieszańcowych genotypach pszenicy

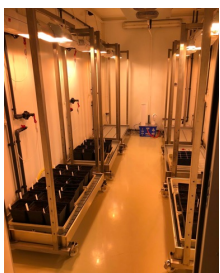
### Genotyp referencyjny

### Formy mieszańcowe

Glenlea	Glenlea x Itaka
Glenlea	(Glenlea x Aura) x Aura
Glenlea	(Glenlea x Harenda) x Harenda
Glenlea	(Glenlea x Jutrzenka) x Jutrzenka
Glenlea	Glenlea x Merkawa

- Izolacja RNA
  - Synteza cDNA
  - qPCR (ang. quantitative polymerase chain reaction)
  - ddPCR (ang. droplet digital PCR)
  - Testy inokulacyjne – fitotron
  - Obserwacje naturalnego porażenia
  - **Brak BC1F1 Carusum x Glenlea**
- Analiza ekspresji genów *Lr34*, genów kandydatów *Lr46* (*Glu2*, *Rik2*, *Rik3*) oraz genu *Lr67* wykonana zostanie w grudniu 2023
  - Dyskusja oraz wnioski zostaną opracowane po analizie wszystkich wyników oraz umieszczone w ostatecznej wersji sprawozdania.

Nr	Odmiana/Genotyp	Numer referencyjny	Odporność na rdzę brunatną (skala 1 – 9)*			Odporność na rdzę żółtą (skala 1 – 9)*		
			1	2	3	1	2	3
1.	Ceruga-4	PI 560118	3	3	3	3	4	3
2.	San Martin	PI 116314	5	5	5	5	5	5
3.	H 51	PI 191925	1	3	3	1	3	3
4.	Artigas	PI 192535	1	3	2	1	3	3
5.	Laranga	PI 191713	3	5	5	3	5	5
6.	ProNtA Imperial NIL Glu- B3i_BuckManant.	PI 674008	3	3	3	3	3	3
7.	NP 818	PI 422294	2	2	2	2	2	2
8.	BuckManantial	PI 344455	4	4	4	4	4	4
9.	Janz	PI 591910	3	3	3	3	3	3
10.	7536K-51A4	PI 553001	6	6	6	6	6	6
11.	7531-V3D	PI 552994	5	6	6	4	6	6
12.	Jacui	PI 520498	3	4	3	3	2	3
13.	P8802-C1*3A2C16	PI 596351	1	5	4	1	3	2
14.	P8802-C1*3A2AZU	PI 596350	4	4	4	3	3	3
15.	HD 2329	PI 648391	3	3	3	3	4	3
16.	K494	PI 250413	7	7	7	7	7	7
17.	Glenlea	Cltr 12722	7	7	7	6	7	7
18.	Artigas	PI 73046	3	3	3	3	3	3
19.	Amurskaya 90	PI 592036	5	5	5	2	2	2
20.	Lerma Rojo	Cltr 13651	1	2	2	1	2	2
21.	363-11	PI 527696	6	5	6	5	5	5
22.	256-3	PI 527695	1	7	7	1	7	7
23.	NP 846	PI 322263	7	6	7	7	6	7
24.	75M-505-001-001	PI 556464	2	3	3	3	3	3
25.	7531-AGSA	PI 552997	3	3	3	3	3	3
26.	7531-AGS8	PI 552996	1	2	3	4	4	4
27.	7531-AGSA	PI 552995	-	-	-	-	-	-
28.	CM 46725-3P-1P-3P-2P	PI 520562	1	3	2	5	3	4
29.	Cook	PI 442900	2	2	2	2	2	3
30.	PAK7219	PI 422416	3	3	3	3	3	3
31.	HI 617	PI 422283	-	-	-	-	-	-
32.	Oxley	PI 386167	3	3	3	3	3	3
33.	NP 718	PI 322236	2	2	2	4	4	4
34.	San Martin	PI 104137	1	4	5	4	4	3
35.	A394R	PI 680923	7	7	7	5	5	7
36.	Klein San Martin	PI 191884	5	5	5	4	4	4
37.	H 51	PI 184512	2	2	2	2	2	2
38.	San Martin	PI 117500	-	-	-	-	-	-
39.	San Martin	Cltr 8437	3	3	3	3	3	3
40.	Recond	Cltr 8399	3	3	3	3	3	3
41.	Frontana	Cltr 12470	4	4	3	2	4	3
42.	Chris	Cltr 13751	4	4	3	4	4	4
43.	ROD	PI 191772	2	3	3	2	3	3
44.	Frontana 3671	PI 193932	3	3	3	3	3	3
45.	Frontana LF 320	PI 193933	1	3	2	1	3	2
46.	Frontana LF 321	PI 193934	3	3	3	2	2	2
47.	Fronthatch-1	PI 290745	2	4	3	4	2	3
48.	Fronthatch-2	PI 297014	3	3	3	3	3	2
49.	Fronthatch-3	PI 299419	6	4	3	6	4	3
50.	Tanopi	PI 344200	5	4	4	5	4	5
51.	Frontaleza	PI 351779	6	6	6	6	4	5
52.	Sparrow	PI 519725	4	4	4	4	4	4
53.	Pavon F76	PI 519847	4	4	4	4	6	6
54.	Pavon 76	PI 520003	4	4	3	6	6	3
55.	Pavon	PI 520054	1	2	2	4	4	3
56.	Pavon	PI 520072	3	3	3	7	3	5
57.	Myna	PI 520340	3	3	3	7	5	3
58.	Junco	PI 519947	4	3	3	2	4	4
59.	Tanager	PI 519878	3	3	3	3	3	3
60.	Parula	PI 520340	7	5	4	4	4	4
61.	Rayon 89	PI 591786	-	-	-	-	-	-
62.	Cumpas 88	PI 591786	4	4	3	4	4	4
63.	Mochis 88	PI 591791	7	7	6	7	7	6
64.	P8901-AP	PI 613175	7	7	7	7	7	7
65.	P8901-AC	PI 613176	7	7	4	3	4	5
66.	Tlaxcala F2000	PI 619634	4	4	4	1	2	4
67.	Lr34	GSTR 433	4	4	4	6	4	6
68.	IWA8608696	PI 624623	5	4	4	5	4	5
69.	Anza	PI 638742	1	2	2	1	3	3
70.	LUC110	PI 671999	1	1	1	1	1	1
71.	Kern	PI 672001	2	2	2	4	2	2
72.	TX89D6435	PI 584759	7	7	7	7	7	7
73.	Purdue	Cltr 13227	7	7	7	7	7	7



L. p	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba genotypów	5	0
2.	Liczba analizowanych mikro RNA	6	0
3.	Liczba badprób mRNA do analiz qPCR	150	0
4.	Liczba badprób mRNA do analiz ddPCR	150	0

# Informacja nt. prezentacji wyników badań

Konferencja pt. DNI MŁODEGO NAUKOWCA, Radzików, 9-10 listopada 2023 r.

- Roksana Bobrowska, REFERAT pt.: „Wykorzystanie reakcji multiplex PCR do jednoczesnej identyfikacji genów odporności na choroby pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)” – Strony sprawozdania z 2022 r. 5-26.
- Aleksandra Noweiska, E-poster pt.: „Analiza obecności wybranych genów odporności na rdze brunatną u odmian pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.)”. Strony sprawozdania z 2022 r. 5-26.
- Julia Spychała, E-poster pt.: „Analiza profili ekspresji genów typu „slow rust” oraz badanie powiązanych miRNA u mieszańców pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na infekcję *Puccinia triticina*”. Strony sprawozdania z 2022 r. 27-59.

## Publikacja:

- Spychała J, Tomkowiak A\*, Noweiska A, Bobrowska R, Bocianowski J, Książkiewicz M, Sobiech A, Kwiatek MT. (2023). Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance Genes Lr34/Yr18 and Lr67/Yr46 in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Associated miRNAs Patterns. *Genes*, 14(7): 1376. Strony sprawozdania z 2022 r. 27-59.

## Analiza obecności wybranych genów odporności na rdze brunatną u odmian pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.)

Aleksandra Noweiska\*, Roksana Bobrowska, Julia Spychała, Michał T. Kwiatek

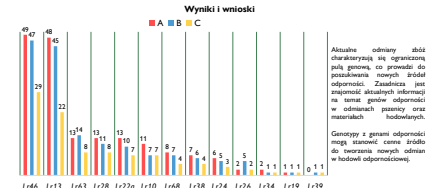
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Dojazd 11, 60-637 Poznań  
E-mail: aleksandra.noweiska@up.poznan.pl



### Wprowadzenie

Pathogen *Puccinia triticina* Erikh. (Pt), odpowiedzialny za rdzę brunatną blis, w optymalnych warunkach klimatycznych może mieć znaczący wpływ na liście sterna oraz łodygi sterna u blisli ozimej. Według danych z 2022 r. występowanie choroby spowodowane przez *Puccinia triticina* Erikh. ograniczone jest między innymi poprzez stosowanie odmian z genami odporności. Do tej pory zidentyfikowano ponad 80 genów odporności Lr (ang. leaf rust), jednak nie wszystkie są powiązane z odpornością na wywołaną patogenem. Celem prezentowanych badań była analiza obecności wybranych genów odporności na rdzę brunatną u odmian pszenicy ozimej zarejestrowanych w Polsce. Europejski badawczy ośrodek w przelazonych latach hodowlanych.

Materiały i metody	A		B		C	
	Gen	Amplif	Gen	Amplif	Gen	Amplif
Analiza przeprowadzono na 125 odmianach pszenicy ozimej, podzielonych na 3 grupy: A - odmiany zarejestrowane w Polsce, B - odmiany zarejestrowane w Europie Zachodniej, C - liście hodowlane. Do badań wykorzystano markery molekularne oparte o geny odporności Lr34, Lr37, Lr38, Lr24, Lr26, Lr28, Lr29, Lr34, Lr38, Lr41 (Lr39), Lr46, Lr67 oraz Lr68.	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif
	Carv	Amplif	Carv	Amplif	Carv	Amplif



Badania dofinansowane przez PMBRV w ramach badań podstawowych na rzecz postępu hodowlanego w produkcji roślinnej w latach 2021-2022 – zadanie nr 5 „Analiza molekularna genów warunkujących odporność poziomą u pszenicy (*Triticum aestivum* L.) na porażenie przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Puccinia* sp.”

**genes**

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<sup>1,2</sup>, Agnieszka Yankowiak<sup>1,2</sup>, Aleksandra Noweiska<sup>1,2</sup>, Roksana Bobrowska<sup>1</sup>, Jan Bocianowski<sup>1,2</sup>, Michał Książkiewicz<sup>1,2</sup>, Aleksandra Sobiech<sup>1,2</sup> and Michał Tomasz Kwiatek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, 11 Dąbki St., 60-637 Poznań, Poland; jula.spychala@up.poznan.pl (J.S.); aleksandra.noweiska@up.poznan.pl (A.N.); roksana.bobrowska@up.poznan.pl (R.B.); jan.bocianowski@up.poznan.pl (J.B.); michal.kstajkiewicz@up.poznan.pl (M.K.); aleksandra.sobiech@up.poznan.pl (A.S.); and michal.tomasz.kwiatek@up.poznan.pl (M.T.K.)

<sup>2</sup> Department of Molecular and Plant Pathology, Poznań University of Life Sciences, 28 Hołubki St., 60-637 Poznań, Poland; jula.spychala@up.poznan.pl (J.S.); agnieszka.yankowiak@up.poznan.pl (A.Y.); jan.bocianowski@up.poznan.pl (J.B.); and michal.tomasz.kwiatek@up.poznan.pl (M.T.K.)

\* Correspondence: agnieszka.yankowiak@up.poznan.pl

**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 filamentous fungus *Puccinia triticina* Erikh. 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 non-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 transcriptional responses of two major wheat APR genes, Lr34 and Lr67, and three complementary miRNAs, miR3960b, miR3960c, and miR3960d, to inoculations with Pt in wheat. Plant material consisted of five wheat reference varieties, Ariga, Ariga, N7846, Glendora, Lerma Rojo, and T30PH345, containing the Lr34/Yr18 and Lr67/Yr46 resistance genes. Their 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 at 12, 24 and 48 h postinoculation (hpi). The APR gene expression was quantified using real-time PCR with the reference gene, whereas miRNA was quantified using droplet digital PCR. This paper describes the resistance response of APR genes to inoculation with stressor leaf-infecting fungi that occur in control Europe. The study revealed high variability of expression profiles between varieties and time-points, with the presence 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 in tested cultivars was significantly higher than in a control line carrying wild (susceptible) alleles.

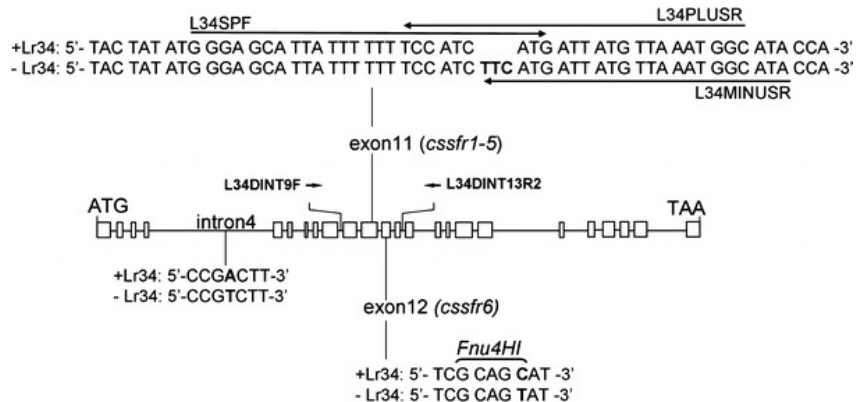
**Keywords:** leaf rust; APR resistance; slow rusting; miRNA; RT-PCR; ddPCR

**1. Introduction**

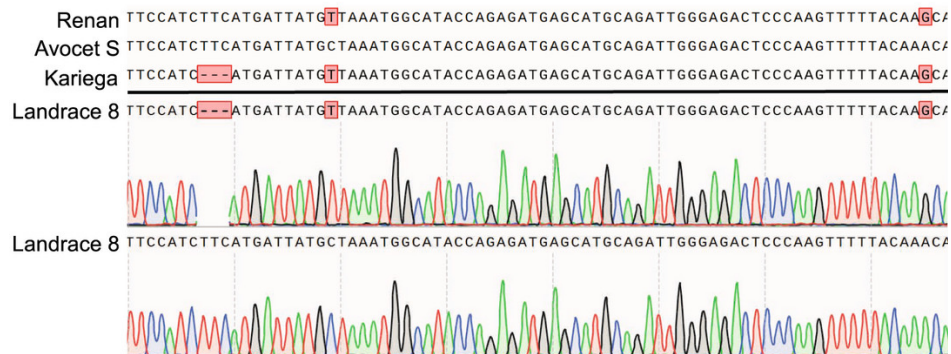
Leaf (brown) rust represents one of the world's greatest threats to wheat production. The disease is caused by the pathogenic fungus *Puccinia triticina* Erikh. The appearance of the disease is observed globally, particularly in regions where common wheat is grown

# Propozycja modyfikacji/nowego zadania:

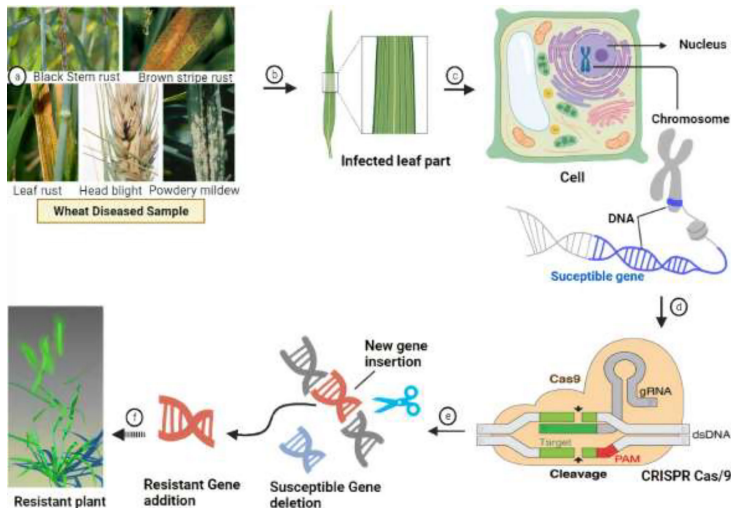
Wykorzystanie technologii CRISPR-Cas9 w celu dokładnej edycji trzech SNP (polimorfizmów pojedynczego nukleotydu) w genie *Lr34*



Simon G. Krattinger et al. Science, 2009



Edith Sanchez et al. et al. Plant Biotech. J., 2022



## Propozycja planu badawczego:

1. Identyfikacja SNP do edycji
2. Projektowanie cRNA i sgRNA
3. Przygotowanie systemu CRISPR-Cas9:
4. Transformacja komórek roślinnych przy użyciu opracowanego systemu CRISPR-Cas9.
5. Selekcja i hodowla transformowanych komórek:
6. Analiza genotypu transformowanych roślin:
7. Analiza fenotypu transformowanych roślin:
8. Weryfikacja stabilności zmian genetycznych:
9. Analiza poziomu ekspresji genu *Lr34* w transformowanych roślinach pszenicy w porównaniu z roślinami kontrolnymi.