

SPRAWOZDANIE

z realizacji w 2021 r. zadania nr 5 pt.

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

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji nr KS.zb.802.10.2021 z dnia 14 czerwca 2021 r.

Zadanie nr 5

Kierownik zadania: prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek

Wykonawcy:

Prof. UPP dr hab. Jerzy Nawracała, Prof. UPP dr hab. Łukasz Wolko, Prof. UPP dr hab. Danuta Kurasiak-Popowska, dr hab. Agnieszka Tomkowiak, mgr inż. Roksana Bobrowska, mgr inż. Aleksandra Noweiska, mgr inż. Julia Spychała

Wstęp

Pszenica uprawna (*Triticum aestivum* L.) to jeden z najważniejszych gatunków roślin uprawnych o olbrzymim znaczeniu cywilizacyjnym. Wartość gospodarcza tego gatunku determinowana jest przez bardzo wiele cech, jednak najistotniejszymi są wielkość i jakość plonu. Obecnie podstawowe kierunki hodowli pszenicy koncentrują się przede wszystkim na wysokim plonowaniu, dobrej jakości handlowej, a także odporności na stropy biotyczne i abiotyczne. Choroby wywołane przez grzyby patogeniczne istotnie limitują wysokość i jakość plonu pszenicy uprawnej. Do najgroźniejszych chorób pszenicy wywołanych przez grzyby zaliczyć można rdzę brunatną, powodowaną przez *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. W Polsce, w optymalnych warunkach rozwoju choroba ta może powodować znaczny spadek plonu, nawet do 30%.

Obecnie zidentyfikowano ponad 100 alleli genów warunkujących odporność na rdzę brunatną, ok. 130 alleli genów warunkujących odporność na rdzę żółtą oraz ponad 140 alleli genów odpowiadających za odporność na mączniaka prawdziwego.

Geny odporności podzielono na dwie grupy. Do pierwszej z nich należą tzw. „główne geny odporności” odpowiedzialne za indukcję odporności typu pionowej („gen na gen”), zwanej inaczej „odpornością rasowo-specyficzną”. Odporność pionowa jest efektywna jedynie w przypadku określonych ras fizjologicznych grzybów patogenicznych. Niestety podstawową wadą tej odporności jest to, że podlega zjawisku „załamywania się” wynikającemu z procesów przystosowawczych w populacjach patogenów.

Do drugiej grupy genów odporności zaliczamy geny warunkujące odporność w stadium rośliny dorosłej (ang. *adult plant resistance*, APR), zwanej także „odpornością rasowo-niespecyficzną” lub „częściową”. Zabezpiecza ona roślinę jednocześnie przed wieloma rasami patogenów, stąd charakteryzuje się ona większą trwałością w warunkach produkcyjnych a cechą charakterystyczną dla ich działania jest spowolnienie procesu infekcji patogena (ang. *slow rusting* - w przypadku rdzy) i obniżenie poziomu porażenia. Do tej pory najlepiej poznany genem warunkującym odporność typu poziomego jest gen *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* (dalej opisany jako *Lr34*). Dotychczas, gen *Lr34* został uznany za źródło trwałej i rasowo niespecyficznej odporności na rdzę

brunatną, żółtą, żółtobłą oraz mączniaka prawdziwego. Gen ten został sklonowany a sekwencja poznana. Koduje on transporter wiążący ATP (tzw. *ABC transporter – ATP Binding Cassette transporter*). Jest to wielodomenowe białko błonowe, wykorzystujące energię z hydrolizy ATP do translokacji substancji przez błonę komórek wszystkich organizmów żywych. Dlatego też gen *Lr34* jest powszechny we wszystkich odmianach pszenicy heksaploidalnej, w kilku wariantach allelicznych. Allel zapewniający odporność (*Lr34res*) różni się od powszechnie obecnego w pszenicy allelu *Lr34sus* trzema mutacjami typu SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu – ang. *single nucleotide polymorphism*) w intronie 4 oraz egzonach 11 i 12 sekwencji genu *Lr34*. Cechą charakterystyczną działania tego allelu jest podwyższenie odporności na infekcję niezależnie od rasy i rodzaju patogena.

Oprócz genu *Lr34* zidentyfikowano tylko trzy inne geny o podobnym mechanizmie działania, tj. *Lr46/Yr29/Pm39* (dalej pod nazwą *Lr46*), *Lr67/Yr49* (*Lr67*) oraz *Lr68*, które określane są także jako geny typu „slow rusting” i mają szerokie spektrum indukowania odporności.

Geny typu APR są z powodzeniem używane w programach hodowlanych CIMMYT (The International Maize and Wheat Improvement Center). Udowodniono, że każdy z wyżej opisanych genów powoduje spowolnienie infekcji patogena i w konsekwencji obniżenie stopnia porażenia. Nie ma natomiast danych, jak te geny ze sobą współdziałają i jaki byłby ich wspólny wpływ na kształtowanie poziomu odporności na choroby wywołane przez grzyby patogeniczne. Co więcej, nowym wyzwaniem w hodowli jest stworzenie kombinacji (piramid genowych) zawierających zarówno geny odporności typu pionowego i poziomego.

Cele zadania – tematy badawcze

1. Analiza molekularna 146 prób pobranych z 73 genotypów pszenicy zwyczajnej, potencjalnie posiadających geny typu „slow rust”, w celu identyfikacji markerów genów *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* i *Lr68*.
2. Analizy ddPCR 150 prób pobranych z pięciu genotypów wyjściowych (fitotron) w celu określenia ekspresji genów typu „slow rust”.

Material, metody i wyniki

W pierwszym temacie badawczym materiałem do badań były 73 genotypy pszenicy zwyczajnej, które wg literatury zawierają geny odporności poziomej na rdzę brunatną. Analiza form wyjściowych pozwoliła na selekcję genotypów posiadających zarówno poszukiwane geny odporności, jak i odpowiedni poziom ekspresji tych genów, co zostało przeanalizowane w ramach odpowiednio tematu badawczego nr 1 i 2. Wybrane w ten sposób genotypy zostaną użyte do krzyżowań z polskimi odmianami/liniami hodowlanymi pszenicy w dalszych etapach projektu, zaczynając od 2022 roku

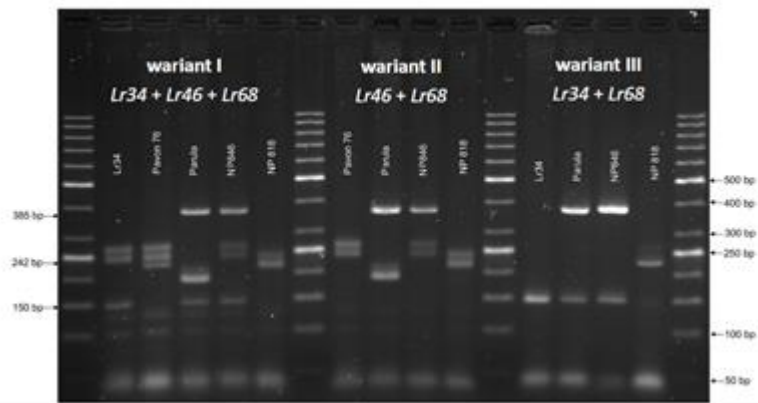
Materiał do izolacji genomowego DNA stanowić była tkanka liściowa każdego z 73 genotypów. Materiał do analiz molekularnych zbierano w fazie drugiego liścia (BBCH 12). Liście pobierane były do probówek typu eppendorf i przechowywane w temperaturze -80°C do momentu izolacji DNA. Genomowe DNA izolowane było za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu GnenMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit firmy EURX® sp. z o.o. Badania w ramach zadania nr 1 polegały na identyfikacji *loci* genów *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* i *Lr68* za pomocą markerów molekularnych typu SSR (ang. Simple Sequence Repeats – proste sekwencje powtórzone) oraz CAPS (ang. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence - polimorfizm sekwencji powielonej i pociętej). Do analizy markerów SSR (Short Simple Repeats) i CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) zastosowano startery zsyntetyzowane przez firmę MERCK (tab. 1.).

Tabela 1. Sekwencje starterów markerów genów warunkujących odporność typu slow rust.
T.a. – temperatura annealingu

Lp	Gen	Marker	Typ markera	Sekwencje starterów (5' – 3')		T.a. [°C]	Źródło
				Forward	Reverse		
1.	Lr34	csLV34	SSR	GTT GGT TAA GAC TGG TGA TGG	TGC TTG CTA TTG CTG AAT AGT	55	MAS Wheat
2.		Xgwm295	SSR	GTG AAG CAG ACC CAC AAC AC	GAC GGC TGC GAC GTA GAG	60	
3.		Xgwm130	SSR	AGC TCT GCT TCA CGA GGA AG	CTC CTC TTT ATA TCG CGT CCC	58	
4.		Xbarc352	SSR	CCC TTT CTC GCT CGC CTA TCC C	CTG TTT CGC CCA ATC TCG GTG TG	60	
5.	Lr46	csLV46G22	CAPS	Sekwencje oraz warunki reakcji otrzymane dzięki współpracy z Prof. E. Lagudah'em Poufne do momentu publikacji wyników			MAS Wheat
6.		Xgwm259	SSR	AGG GAA AAG ACA TCT TTT TTT TC	CGA CCG ACT TCG GGT TC	61	
7.	Lr67	Xcfd71	SSR	CAA TAA GTA GGC CGG GAC AA	TGT GCC AGT TGA GTT TGC TC	60	
8.		Xcfd23	SSR	TAG CAG TAG CAG CAG CAG GA	GCA AGG AAG AGT GTT CAG CC	60	
9.	Lr68	csGS	SSR	AAG ATT GTT CAC AGA TCC ATG TCA	GAG TAT TCC GGC TCA AAA AGG	60	
10.		cs7BLNLR	CAPS	GAA GGA GTG CTT CCT CCA CTG	CTT GGT TCT CCT GTT CTT CCC	60	

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

Analizy markerów za pomocą metody PCR oraz rozdziálu elektroforetycznego otrzymanych produktów w żelu agarozowym wykonano dla dwóch prób każdego z 73 genotypów przeznaczonych do analiz. Do analiz wykorzystano 10 markerów molekularnych (tab. 1) oraz jeden marker morfologiczny (*Ltn*), które posłużyły do identyfikacji alleli sprzężonych z czterema genami warunkujących odporność typu slow rusting. Łącznie przetestowano 146 prób. Zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej każda analiza PCR została wykonana w dwóch powtórzeniach. Łącznie wykonano 272 analizy PCR. W celu zidentyfikowania *locus* genu *Lr34* u 73 genotypów pszenicy zwyczajnej wykorzystano cztery markery: *csLV34*, *Xgwm29*, *Xbarc352*, 5 oraz *Xgwm130*. Obecność wszystkich markerów sprzężonych z allelem *Lr34res* stwierdzono u siedmiu genotypów. W celu zidentyfikowania *locus* genu *Lr46* u 73 genotypów pszenicy zwyczajnej wykorzystano dwa markery: *Xwmc44* oraz marker typu CAPS *csLV46G22*. Jako genotyp referencyjny, posiadający allel *Lr46res* (warunkujący odporność), użyto odmianę Pavon76. Warianty wskazujące na obecność allelu *Lr46res* wszystkich dwóch użytych markerów zostały zidentyfikowane u 6 genotypów. Identyfikacja *locus* genu *Lr67* została wykonana przy użyciu dwóch markerów typu SSR: *Xcfd71* oraz *Xcfd23*. Wskazujące na odporność warianty obu markerów zidentyfikowano u 8 genotypów. W celu identyfikacji allelu *Lr68res*, warunkującego odporność typu slow rusting, użyto jednego markera typu SSR (*csGS*) oraz jednego markera typu CAPS (*cs7BLNLR*). U 20 genotypów stwierdzono warianty oba markerów, które są charakterystyczne dla allelu warunkującego odporność. Dodatkowo przeprowadzono obserwacje nekrozy końcówek liści (LTN), cechy sprzężonej z genami odporności typu slow rusting, a dokładniej z genami: *Lr34* (*Ltn1*), *Lr46* (*Ltn2*), *Lr67* (*Ltn3*) oraz *Lr68* (*Ltn4*). Charakterystyczne nekrozy końcówek liści obserwowano u 48 badanych genotypów. Celem badań w ramach tematu nr 1 było opracowanie warunków reakcji multiplex PCR do detekcji genów odporności *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* w pszenicy przy użyciu następujących markerów genetycznych: *csLV34*, *Xwmc44* oraz *csGS*. W wyniku badań opracowano warunki reakcji multiplex PCR dla czterech wariantów symultanicznej detekcji genów typu „slow rusting”: *Lr34* + *Lr46* + *Lr68* (wariant I), *Lr46* + *Lr68* (wariant II) oraz *Lr34* + *Lr68* (wariant III) (fot. 1).



Fot. 1. Elektroforogram przedstawiający obecność markerów molekularnych *csLV34* (dla genu *Lr34*), *Xwmc44* (dla genu *Lr46*) oraz *csGS* (dla genu *Lr68*) w genotypach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.); M—GenerRuler 50 bp DNA ladder (Nippon Genetic Europe, Germany)

W drugim temacie badawczym materiałem do badań było 5 genotypów pszenicy wybranych na podstawie zadania badawczego nr 1. Genotypy wysiane zostały w trzech powtórzeniach biologicznych, w dwóch wariantach (inokulowane i nieinokulowane). Łącznie wysiano **30 roślin** (5 genotypów referencyjnych × 3 powtórzenia × 2 warianty). Kryterium wyboru materiałów do badań w ramach tematu badawczego 2 była obecność genów typu "slow rusting". Obecność tych genów została wcześniej zweryfikowana w ramach tematu badawczego 1. Ponadto pod uwagę brano liczbę loci występującą w danym genotypie. Wobec powyższego wybrano genotypy posiadające skumulowane loci genów typu "slow rusting" (piramidyzacja). W skład analizowanych odmian wchodziły: Artigas, NP846, Glenlea, Lerma Rojo i TX. Obserwacje naturalnego porażenia przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Puccinia* przeprowadzono w sześciu lokalizacjach na terenie kraju dla roślin w stadium siewki oraz w stadium rośliny dorosłej. Obserwacje przeprowadzone w Rolniczym Gospodarstwie Doświadczalnym Dłoń wykazały niskie porażenie roślin przez *P. tritricina* (powodującą rdzę brunatną). Badane rośliny w stadium siewki charakteryzowały się porażeniem w zakresie 5-9 wg dziewięciostopniowej skali porażenia (1- najbardziej porażone; 9- całkowicie odporne). Osiem genotypów charakteryzowało się całkowitą odpornością. Obserwacje roślin w stadium rośliny dorosłej wykazały, iż badane genotypy także charakteryzowały się niskim stopniem porażenia o podobnym zakresie w porównaniu do obserwacji na siewkach – tj. w zakresie 5-9. Tylko jeden genotyp (Glenlea) charakteryzował się całkowitym brakiem objawów porażenia. Aby zapewnić poprawność wnioskowania na temat ekspresji miRNA związanego z analizowanymi genami (*Lr34*, geny kandydujące *Lr46*, *Lr67*) w pierwszej kolejności analizowano ekspresję samych genów. Wobec powyższego z badanych próbek izolowano zarówno matrycowe RNA (mRNA) oraz mikro RNA (miRNA). W przypadku mRNA reakcja odwrotnej transkrypcji została przeprowadzona przy użyciu kitu iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR z firmy BIO-RAD. W przypadku analiz miRNA do reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano kit SuperScript™ IV Reverse Transcriptase 10 000 U z firmy ThermoFisher Scientific. Po reakcji odwrotnej transkrypcji mierzono koncentrację cDNA każdej próbki, która była bardzo wyrównana i mieściła się w granicach od 200 ng/μl do 250 ng/μl. Do analiz qPCR niezbędne było wykonanie rozcieńczeń do 20 ng/μl. Podobnie jak w przypadku analiz mRNA po reakcji odwrotnej transkrypcji mierzono koncentrację cDNA każdej próbki, która była dość wysoka i mieściła się w granicach od 500 ng/μl do 600 ng/μl. Do analiz ddPCR wymagana jest koncentracja od 3 ng/μl do 6 ng/μl dlatego matrycę rozcieńczono sto razy. Aby móc wnioskować na temat roli miRNA w reakcji obronnej rośliny na porażenie przez *Puccinia tritricina* w pierwszej kolejności analizowano ekspresję genów odporności *Lr34*, kandydatów *Lr46* oraz *Lr67* a następnie komplementarnych do nich miRNA. Niestety w bazach danych nie znaleziono sekwencji genu *Lr68* oraz komplementarnych miRNA dla genu *Lr67* dlatego nie podlegały one analizom. Na podstawie danych literaturowych wybrano 4 geny

referencyjne pszenicy, które ulegały stabilnej ekspresji: TUB β , ARF, RLI oraz EF2-1. Wybrane geny przetestowano na matrycy zbiorczej cDNA (próby po 12, 24, 48 h od inokulacji). Po wykonaniu krzywych wzorcowych dla pozostałych genów referencyjnych wytypowano dwa z nich: TUB β oraz ARF i dla nich wykonano analizy qPCR. Ekspresja genu referencyjnego była porównywana z ekspresją genu analizowanego dla każdej próbki. W badaniach wykazano, że spośród analizowanych genów *slow rust* tylko dla genu *Lr34*, genu kandydata *Lr46-Glu2* oraz genu kandydata *Lr46-RLK1* nie zaobserwowano istotnych różnic w profilu ekspresji dla analizowanych odmian w wybranych punktach czasowych. Oznacza to, że po porażeniu roślin *Puccinia Triticina*, każdy z tych genów aktywował się i działał w podobny sposób, w każdej odmianie. W prezentowanych badaniach analizowano poziom ekspresji genu *Lr34* w 5 odmianach, w odpowiedzi na porażenie przez *P. trititica*. Ostatecznie najskuteczniej zareagował system odpornościowy w odmianie Glenlea oraz Artigas ponieważ po 48h od infekcji poziom ekspresji genu *Lr34* przekroczył wyjściowy poziom ekspresji sprzed inokulacji. Ponadto analizowano także poziom ekspresji 9 genów kandydatów *Lr46*. Analiza wariacji pozwoliła na wybór jednego (*Lr46-Glu2*), którego profil ekspresji nie różnił się istotnie dla 5 analizowanych odmian w wybranych punktach czasowych. Z analiz wynika, że po 24 godzinach od inokulacji, w przypadku wszystkich odmian uruchomiła się reakcja obronna. Poziom ekspresji *Lr46-Glu2* zdecydowanie przekroczył poziom wyjściowy. Jest to klasyczna reakcja obronna roślin na stres często podawana w doniesieniach literaturowych, gdzie po 24 godzinach obserwujemy najwyższy poziom ekspresji danego genu. Po 48 godzinach w przypadku wszystkich odmian poziom ekspresji *Lr46-Glu2* spadł ale w odmianach Artigas, Glenlea, Lerma Rojo i TX nadal przewyższał poziom wyjściowy. W badaniach analizowano również ekspresję genu *Lr67*. W porównaniu do genów *Lr34* i *Lr46-Glu2* gen *Lr67* wykazywał zróżnicowaną ekspresję w obrębie odmian co wykazała również analiza wariacji. W przypadku odmian Artigas, NP846 i TX ekspresja genu *Lr67* spadła bezpośrednio po porażeniu (6h) i po 24 godzinach zaczęła się podnosić. W przypadku odmiany Lerma Rojo ekspresja genu *Lr67* malała i rosła na zmianę w raz z upływem czasu od inokulacji, natomiast w przypadku odmiany Glenlea ekspresja *Lr67* najpierw rosła (6h), następnie spadała (12h i 24h) i znów rosła (48h). Ostatecznie odmiany Artigas i Glenlea najsilniej zareagowały na stres ponieważ poziom ekspresji genu *Lr67* po 48h od inokulacji podobnie jak przypadku genu *Lr34* i genu kandydata *Lr46-Glu2* przewyższał poziom wyjściowy sprzed inokulacji. Kolejną zastosowaną metodą pozwalającą na analizę ekspresji było ddPCR. W badaniach analizowano ekspresję miR9653b, którego sekwencja jest komplementarna do sekwencji genu *Lr34*. Stwierdzono, że wyniki wskazują na możliwość blokowania ekspresji genu *Lr34* przez miR9653b w odmianie Artigas ponieważ gdy rósł poziom ekspresji genu *Lr34* spadał poziom ekspresji miR9653b i odwrotnie. Podobne zależności obserwowano w przypadku odmian NP846 i TX w prawie wszystkich punktach czasowych, gdy spadał poziom ekspresji genu *Lr34* rósł poziom ekspresji miR9653b i odwrotnie. Zależności te pokrywały się również w niektórych punktach czasowych w przypadku odmian Glenlea (12h i 24h) i Lerma Rojo (24h i 48h). Ponadto zaobserwowano blokowanie ekspresji genu kandydata *Lr46-Glu2* przez miR5384-p ponieważ dla odmian Glenlea i NP846 we wszystkich punktach czasowych zaobserwowano prawidłowość, że gdy rośnie ekspresja tego genu maleje ekspresja miR5384-p, które jest do niego komplementarne i odwrotnie gdy maleje ekspresja *Lr46-Glu2* rośnie ekspresja miR5384-p. Dla pozostałych odmian podobne prawidłowości zaobserwowano tylko w wybranych punktach czasowych: Artigas (6h), Lerma Rojo (12h) i TX (6h i 12h).

Najważniejsze wnioski:

1. Markery molekularne pozwoliły wyselekcjonować genotypy posiadające dwa lub więcej alleli genów warunkujących odporność typu slow rusting.
2. Włączenie do analiz obserwacji morfologicznego markera *Ltn* (nekroza końcówek liści), który jest sprzężony z loci: *Lr34* (*Ltn1*), *Lr46* (*Ltn2*) *Lr67* (*Ltn3*) oraz *Lr68* (*Ltn4*) jest jednym z czynników weryfikujących obecność alleli warunkujących odporność.
3. Opracowane trzy warianty multipleks PCR okazały się być skuteczne w identyfikacji genotypów charakteryzujących się piramidyzacją genów typu slow rusting w analizowanej puli genotypów.
4. Analiza wariacji wykonana dla każdego genu wykazała, że tylko dla genu *Lr34*, genu kandydata *Lr46-Glu2* oraz genu kandydata *Lr46-RLK1* nie zaobserwowano istotnych różnic w profilu ekspresji dla poszczególnych odmian w analizowanych punktach czasowych. Oznacza to, że po porażeniu roślin, każdy z tych genów aktywował się i działał w podobny sposób, w każdej odmianie. Z pośród tych genów najmniej zróżnicowany profil ekspresji odnotowano dla genu *Lr34* oraz genu kandydata *Lr46-Glu2*.
5. W przypadku genu *Lr34* aktywację układu odpornościowego u wszystkich analizowanych odmian odnotowano po 24h od inokulacji. Najwyższy wzrost ekspresji po 24h odnotowano dla odmian Glenlea i Lerma Rojo. Ostatecznie najskuteczniej zareagował system odpornościowy w odmianie Glenlea oraz Artigas ponieważ po 48h od infekcji poziom ekspresji genu *Lr34* przekroczył wyjściowy poziom ekspresji sprzed inokulacji.
6. W przypadku genu kandydata *Lr46-Glu2* przełom dla mechanizmu odporności nastąpił po 24 godzinach od inokulacji, gdzie w przypadku wszystkich odmian uruchomiła się reakcja obronna. Poziom ekspresji *Lr46-Glu2* zdecydowanie przekroczył poziom wyjściowy sprzed inokulacji. Po 48 godzinach w przypadku wszystkich odmian poziom ekspresji *Lr46-Glu2* spadł ale w odmianach Artigas, Glenlea, Lerma Rojo i TX nadal przewyższał poziom wyjściowy sprzed inokulacji.
7. Gen *Lr67* wykazuje zróżnicowaną ekspresję w obrębie odmian, co wykazała analiza wariacji. Ostatecznie odmiany Artigas i Glenlea najsilniej zareagowały na stres ponieważ poziom ekspresji genu *Lr67* po 48h od inokulacji podobnie jak przypadku genu *Lr34* i genu kandydata *Lr46-Glu2* przewyższał poziom wyjściowy sprzed inokulacji.
8. Wyniki wskazują na możliwość blokowania ekspresji genu *Lr34* przez komplementarne do jego sekwencji miR9653b w odmianie Artigas ponieważ gdy rósł poziom ekspresji genu *Lr34* spadał poziom ekspresji miR9653b i odwrotnie. Podobne zależności obserwowano w przypadku odmian NP846 i TX w prawie wszystkich punktach czasowych, gdy spadał poziom ekspresji genu *Lr34* rósł poziom ekspresji miR9653b i odwrotnie. Zależności te pokrywały się również w niektórych punktach czasowych w przypadku odmian Glenlea (12h i 24h) i Lerma Rojo (24h i 48h).
9. Zaobserwowano możliwość blokowania ekspresji genu kandydata *Lr46-Glu2* przez miR5384-p ponieważ dla odmian Glenlea i NP846 we wszystkich punktach czasowych zaobserwowano prawidłowość, że gdy rośnie ekspresja tego genu maleje ekspresja miR5384-p, które jest do niego komplementarne i odwrotnie gdy maleje ekspresja *Lr46-Glu2* rośnie ekspresja miR5384-p. Dla pozostałych odmian podobne prawidłowości zaobserwowano tylko w wybranych punktach czasowych: Artigas (6h), Lerma Rojo (12h) i TX (6h i 12h).
10. Bazując na wynikach analiz molekularnych, oraz obserwacji porażenia (temat badawczy nr 2) wybrano 5 genotypów (Glenlea, Lerma Rojo, NP486, TX89D6435, Purdue, Sparrow, A99 AR, 7531-V3D oraz Artigas) jako źródła co najmniej dwóch genów odporności typu slow rusting, które mogą zostać wykorzystane do poszerzenia puli genetycznej odmian pszenicy uprawnej.