

¹Institut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

sylwia.okon@up.lublin.pl

²Hodowla Roślin Strzelce

³Małopolska Hodowla Roślin, SHR Polanowice

⁴Poznańska Hodowla Roślin, SHZ Nagradowice

⁵Poznańska Hodowla Roślin, SHZiT Antoniny

SYLWIA OKOŃ¹, PRZEMYSŁAW MATYSIK², ZYGMUNT NITA²,
ANDRZEJ BICHOŃSKI³, KRZYSZTOF RUBRYCKI⁴,
URSZULA WOŻNA-PAWLAK⁵, KRZYSZTOF KOWALCZYK¹

Identyfikacja genu *Lr 19* odporności na rdzę brunatną w polskich liniach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)

Identification of *Lr19* gene in Polish common wheat (*Triticum aestivum* L.)
breeding lines

Streszczenie. Rdza brunatna powodowana przez grzyb *Puccinia triticina* jest jedną z najgroźniejszych chorób pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). Najskuteczniejszą metodą kontrolowania i ograniczania skutków porażenia przez ten patogen jest wprowadzenie do uprawy odmian z genetycznie uwarunkowaną odpornością. Celem prezentowanych badań była identyfikacja genu *Lr19* odporności na rdzę brunatną w polskich liniach hodowlanych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) z wykorzystaniem markerów molekularnych. Przedmiotem badań było 246 polskich linii hodowlanych pszenicy zwyczajnej. Wyizolowane DNA poddano amplifikacji z wykorzystaniem specyficznych starterów SCAR. Po wykonaniu analiz DNA spośród badanych form obecność genu odporności na rdzę brunatną *Lr19* stwierdzono jedynie w 33 liniach pochodzących z Hodowli Roślin Strzelce. Przeprowadzone analizy świadczą o tym, że gen *Lr19* nie jest szeroko stosowany w polskich programach pszenicy zwyczajnej.

Słowa kluczowe: geny *Lr*, SCAR, pszenica zwyczajna, rdza brunatna

WSTĘP

Rdza brunatna powodowana jest przez grzyb *Puccinia triticina*. Obok mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer f. sp. *tritici*), rdzy żdźbłowej (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*) oraz rdzy żółtej (*Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Eriks.) jest jedną z najgroźniejszych chorób grzybowych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) zarówno w Europie, jak i na całym świecie [Kolmer i in. 2007, Lind i Gulyaeva 2007, McCallum i in. 2007].

Uzyskanie odporności na rdzę brunatną jest jednym z głównych celów programów hodowlanych pszenicy. Uprawa odmian pszenicy posiadających geny odporności na rdzę brunatną jest najbardziej efektywną i najbardziej ekonomiczną metodą kontrolowania i ograniczania skutków występowania tej choroby. W hodowli pszenicy zwyczajnej w Europie wykorzystywane są różne geny odporności na rdzę brunatną, ale większość z nich jest nieefektywna przeciwko występującym populacjom grzyba. Jednym z ważniejszych genów odporności na rdzę brunatną jest *Lr19*. Gen *Lr19* został wprowadzony z *Agropyron elongatum*. Warunkuje on odpowiedź na patogen opartą na reakcji nadwrażliwości rośliny. Został wprowadzony do szeregu odmian pszenicy. Wykorzystując markery RAPD, SSR i Alp, gen *Lr19* zlokalizowano na długim ramieniu chromosomu 7D w pszenicy [Cherukuri i in. 2003, Li i in. 2006, 2007]. Gen ten warunkuje dobrą odporność na rdzę brunatną w wielu regionach świata i może być używany w kombinacji z innymi genami odporności na rdzę brunatną w celu nadania długotrwałej odporności na ten patogen [Roelfs 1988, Prins 1997, Tomar i Menon 1998, Mesterhazy i in. 2000, Pink 2002].

Tradycyjne metody identyfikacji genów odporności na choroby grzybowe opierają się na testach żywiciel–patogen, które są bardzo czasochłonne i wymagają dużego nakładu pracy. Dlatego też obecnie większość genów odporności na rdzę brunatną u pszenicy może być identyfikowana za pomocą markerów molekularnych [Feuillet i in. 1995, Schachermayr i in. 1997, Cherukuri i in. 2005]. Markery molekularne pozwalają na identyfikację pożądanych genotypów w krótkim czasie, a tym samym na szybką i efektywną selekcję.

Celem prezentowanych badań była identyfikacja za pomocą markerów molekularnych genu odporności na rdzę brunatną *Lr19* w liniach hodowlanych pszenicy zwyczajnej pochodzących z trzech polskich spółek hodowli roślin.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem analiz było 246 linii hodowlanych pszenicy zwyczajnej. 142 linie pochodziły z Hodowli Roślin Strzelce, 44 linie z Małopolskiej Hodowli Roślin oraz 60 linii uzyskano z Poznańskiej Hodowli Roślin. Jako kontrolę zastosowano linie bliskoizogeniczne odmiany Thatcher z genem *Lr19* oraz bez genu odporności na rdzę brunatną.

DNA wyizolowano z liści pięciodniowych siewek metodą CTAB [Doyle i Doyle 1987]. Stężenie DNA określono za pomocą elektroforezy na 1,5% żelu agarozowym przez porównanie z molekularnym wzorcem masy MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas). Następnie próbki doprowadzono do jednakowego stężenia DNA 20 ng/μl.

Reakcje PCR przeprowadzono na termocyklerze T Professional (Biometra). Identyfikację genu *Lr19* przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Gupta i in. [2006].

Zastosowano parę starterów o sekwencjach: 5'-GCTGGTTCCACAAAGCAAA-3' oraz 5'-GGCTGGTTCCTTAGATAGGTG-3'. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 20 µl wchodziły: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (Fermentas, Litwa), 200 µM każdego dNTP, 250 nM każdego ze starterów, 1 mM MgCl₂, 60 ng genomowego DNA, 0,5 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, Litwa). Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 2 min w 95°C, 35 cykli: 94°C – 60 s, 60°C – 60 s, 72°C – 2 min z końcową inkubacją 7 min w 72°C. Uzyskane w wyniku reakcji PCR produkty rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym zawierającym 0,01% EtBr w 1× stężonym buforze TBE. Zastosowano marker wielkości GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Otrzymane wzory rozdziałów obserwowano na transiluminatorze i sfotografowano za pomocą zestawu Poly Doc (Vilber Lourmat).

WYNIKI I DYSKUSJA

Markery molekularne stały się w ostatnich latach bardzo wygodnym narzędziem do identyfikacji genów warunkujących ważne cechy użytkowe. Selekcja wspierana markerami pozwala na znaczne skrócenie procesu hodowli nowych odmian, a identyfikacja form odpornych – na kontrolowanie skutków występowania chorób grzybowych. Dlatego też ważne jest przygotowanie markerów molekularnych odznaczających się silnym sprzężeniem z genem odporności, co pozwala na efektywną selekcję form odpornych.

Do tej pory dla genu *Lr19* opracowano kilka markerów molekularnych pozwalających na jego identyfikację. Autrique i in. [1995] zidentyfikowali marker RFLP sprzężony z genem odporności *Lr19*, jednak ze względu na złożoną procedurę nie jest on szeroko wykorzystywany w selekcji form odpornych. Prins i in. [2001] zidentyfikowali marker AFLP umożliwiający identyfikację genu *Lr19* i przekonwertowali go w specyficzny marker SCAR. Tyryshkin i in. [2006] przeprowadzili badania mające na celu sprawdzenie użyteczności tego markera w selekcji. Autorzy przeanalizowali 55 form pszenicy zwyczajnej, jednak nie zidentyfikowali produktu wielkości 130pz u form zawierających gen *Lr19*. Uzyskane przez nich wyniki sugerują, że marker zidentyfikowany przez Prinsa i in. [2001] nie jest całkowicie sprzężony z genem *Lr19*. Gupta i in. [2006] określili marker RAPD sprzężony z genem odporności na rdzę brunatną *Lr19* i przekonwertowali go w specyficzny marker SCAR. Wyniki uzyskane przez autorów potwierdziły, że marker ten jest blisko sprzężony z analizowanym genem i może być wykorzystywany w MAS.

W prezentowanej pracy do identyfikacji genu odporności na rdzę brunatną *Lr19* w polskich liniach pszenicy zwyczajnej wykorzystano parę specyficznych starterów opracowanych przez Gupta i in. [2006]. Użyteczność starterów została sprawdzona na liniach bliskoizogenicznych odmiany Thatcher posiadających gen *Lr19* oraz bez genów odporności na rdzę brunatną. Produkt wielkości 736pz obecny był w próbach form wrażliwych, niezawierających genu *Lr19*, a obecność tego produktu wskazuje na brak genu odporności *Lr19*, natomiast brak produktu amplifikacji wielkości 736pz świadczy o obecności genu *Lr19* w analizowanym materiale. Wśród analizowanych 246 linii hodowlanych pszenicy zwyczajnej produkt wielkości 736pz obecny był w 213 próbach. Brak genu odporności na rdzę brunatną stwierdzono we wszystkich liniach pochodzących z Poznańskiej Hodowli Roślin i z małopolskiej Hodowli Roślin oraz w 109 liniach pszenicy pochodzących z Hodowli Roślin Strzelce. Brak produktu amplifikacji, a tym

samym obecność genu *Lr19*, stwierdzono jedynie w 33 liniach pszenicy zwyczajnej pochodzących z Hodowli Roślin Strzelce. Podobne wyniki uzyskali Kowalczyk i in. [2012], analizując polskie linie hodowlane pszenicy zwyczajnej. Gen *Lr19* zidentyfikowali jedynie w 25 spośród analizowanych linii, 20 pochodziło z Hodowli Roślin Strzelce, a 5 z Hodowli Roślin Smolice. Kowalczyk i in. [2009] wykorzystali markery molekularne do identyfikacji różnych genów odporności na rdzę brunatną, w tym genu *Lr19* w liniach hodowlanych pszenicy zwyczajnej. Spośród analizowanych 350 linii gen *Lr19* stwierdzili jedynie w 38 formach. Ponadto gen ten zidentyfikowali w odmianie pszenicy zwyczajnej Ostka strzelecka.

WNIOSKI

1. Wykazano przydatność markerów SCAR do identyfikacji genu *Lr19* w polskich liniach hodowlanych pszenicy zwyczajnej. Markery te mogą być z powodzeniem wykorzystane do wspierania selekcji w hodowli odpornościowej.

2. Z przeprowadzonych badań wynika, że efektywny gen odporności na rdzę brunatną *Lr19* nie jest powszechnie wykorzystywany w polskich programach hodowlanych.

PIŚMIENNICWO

- Autrique E.R.P., Shingh R.P., Tanksley S.D., Sorrells M.E., 1995. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat form wild relatives. *Genome* 38, 75–83.
- Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A., Koul S., Prabhu K.V., Singh R.B., Haq Q.M.R., 2005. Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. *Euphytica* 143, 19–26.
- Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A., Koul S., Prabhu K.V., Singh R.B., Haq Q.M.R., Chauchan S.V.S., 2003. Identification of a molecular marker linked to an *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr19* for leaf rust resistance in wheat. *Plant Breed.* 122, 204–208.
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Feuillet C., Messmer M., Schachermayr G., Keller B., 1995. Genetic and physical characterization of the LR1 leaf rust resistance locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Mol. General Genet.* 248, 553–562.
- Gupta S.K., Charpe A., Prabhu K.V., Haque Q.M.R., 2006. Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 113, 1027–1036.
- Kolmer J.A., Jin Y., Long D.L., 2007. Wheat leaf rust in the United States. *Austr. J. Agric. Res.* 58, 631–638.
- Kowalczyk K., Okoń S., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., 2009. Wykorzystanie genów odporności na rdzę brunatną *Lr19*, *Lr21* i *Lr35* w programach hodowlanych pszenicy zwyczajnej w Polsce. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 542, 255–260
- Kowalczyk K., Okoń S., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., 2012. Using of DNA markers for selection of common wheat in Polish breeding programmes. The 15th International EWAC Workshop, 7–11 November 2011, Novi Sad, Serbia (w druku).
- Li X., Yang W., Li Y., Liu D., Yan H., Meng Q., Zhang T., 2006. A SSR marker for leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Agric. Sci. China* 5, 111–115.

- Li X., Yang W., Li Y., Liu D., Yan H., Meng Q., Zhang T., 2007. Identification of AFLP markers linked to *Lr19* resistance to wheat leaf rust. *Agric. Sci. China* 6, 311–315.
- Lind V., Gulyaeva E., 2007. Virulence frequencies of *Puccinia triticina* in Germany and the European regions of Russian Federation. *J. Phytopathol.* 155, 13–21.
- McCallum B.D., Fetch T., Chong J., 2007. Cereal rust control in Canada. *Austr. J. Agric. Res.* 58, 639–647.
- Mesterhazy A., Bartos P., Goyeau H., Nicks R.E., Csösz M., Anderson O., Casulli F., Ittu M., Jones E., Manisterski J., Manninger K., Pasquini M., Rubiales D., Schachermayr G., Strzembicka A., Szunics L., Todorova M., Unger O., Vanco B., Vida G., Walter U., 2003. European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie* 20, 793–804.
- Pink D.A.C., 2002. Strategies using gene for non durable disease resistance. *Euphytica* 124, 227–236.
- Prins R., Marais G.F., Pretorius Z.A., Janse B.J.H., Marais A.S., 1997. A study of modified forms of the *Lr19* translocation of common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 95, 424–430.
- Prins R., Groenewald J.Z., Marais G.F., Snape J.W., Koebner R.M.D., 2001. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 103, 618–624.
- Roelfs A.P., 1988. Resistance to leaf and stem rust in wheat. W: Breeding strategies for resistance to the rots of wheat, Simmonds N.W., Rajram S. (red.). CIMMYT, Mexico, 10–22.
- Schachermayr G., Feuillet C., Keller B., 1997. Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr10* in diverse genetic backgrounds. *Mol. Breed.* 3, 65–74.
- Tomar S.M.S., Menon M.K., 1998. Adult plant response of near-isogenic lines and stocks of wheat carrying specific *Lr* genes against leaf rust. *Ind. Phytopathol.* 51, 61–67.
- Tyrshkin L.G., Gul'tyaeva E.I., Alpat'eva N.V., Kramer I., 2006. Identification of effective leaf-rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum*) using STS markers. *Russ. J. Genet.* 42, 662–666.

Summary. Leaf rust caused by *Puccinia triticina*, is considered to be one of the most significant fungal diseases of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). The most effective method of disease control is breeding cultivars with genes having genetically conditioned resistance. The aim of the present studies was identification of *Lr19* resistance gene to leaf rust in Polish breeding lines using molecular markers. The plant materials of the present studied were 246 Polish common wheat breeding lines. The isolated DNA was analyzed in PCR with specific SCAR markers. Among the analyzed breeding lines the *Lr19* gene was identified only in 33 lines from Strzelce Breeding Company. The obtained results suggested that *Lr19* gene is not popular in the Polish breeding programmes.

Key words: common wheat, leaf rust, *Lr* genes, SCAR