

Mirosław TYRKA, Joanna CIURA, Magdalena SZELIGA

## OPTIMALIZACJA SYSTEMU SELEKCJI GENOTYPÓW PSZENICY ZWYCZAJNEJ Z TRANSLOKACJĄ 'PONTIN'

## OPTIMIZATION OF SELECTION SYSTEM OF COMMON WHEAT GENOTYPES WITH 'PONTIN' TRANSLOCATION

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza w Rzeszowie

**Abstract.** The 'pontin' translocation was obtained as a result of the recombination of segment from *Thinopyrum ponticum* with *Lr19* gene, carrying resistance to leaf rust caused by *Puccinia triticina*, with chromosome segment of *Thinopyrum intermedium*, that contains *Bdv2* gene that determines tolerance to Barley Yellow Dwarf Virus. Translocation 'pontin' is attractive for improvement of modern cultivars of common wheat (*Triticum aestivum* L.). The aim of the study was optimization of the set of molecular markers for selection of Polish breeding lines carrying 'pontin' translocation. We found that testing with AG15 and SCS265/253 markers is sufficient for tracing of the presence of 'pontin' translocation introduced from lines ER6, ER20, ER21, ER35 and IK33. As a result of the screening of over 1200 genotypes in 5 loci, lines carrying 'pontin' translocation were identified in materials from Choryń and Strzelce. The optimized system of selection is significant for cumulating resistance genes in selected genotypes.

**Słowa kluczowe:** rdza brunatna, selekcja wspomagana markerami, *Triticum aestivum*.

**Key words:** leaf rust, marker assisted selection, *Triticum aestivum*.

### WSTĘP

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) jest jednym z najważniejszych zbóż uprawianych w Polsce na areale ponad 2 mln ha (FAOSTAT, 2012). Rdza brunatna (*Puccinia triticina*) jest groźną chorobą grzybową pszenicy, która powoduje spadek plonów. Znanych jest ponad 50 genów odporności na rdzę brunatną (Tyrka i Chełkowski 2004), a gen *Lr19* należy do nielicznych efektywnych genów zapewniających odporność w warunkach Polski.

Źródłem genu *Lr19* jest translokacja z *Thinopyrum ponticum* ( $2n = 10x = 70$ ; JJJJ<sub>s</sub>J<sub>s</sub>) [syn. *Agropyron elongatum*, *Lophopyrum ponticum*] do dystalnej części długiego ramienia chromosomu 7D pszenicy zwyczajnej. Fragment chromosomu *Th. Ponticum*, oprócz genu *Lr19*, zawiera również gen *Sr25* warunkujący odporność na rdzę żdźbłową oraz gen *Y* – warunkujący żółte zabarwienie mąki (Knott 1968; Zhang i Dubcovsky 2008). W procesie transferu genu *Lr19* z *Th. ponticum* do pszenicy uzyskano początkowo ozimą linię substytucyjną 'Argus' (7D/7J),

kóra następnie była krzyżowana wstecznie z linią 'Thatcher'. Z potomstwa poddanego promieniowaniu termicznymi neutronami i miękkimi promieniami X uzyskano linię translokacyjną T4, nazwaną 'Agatha' (Sharma i Knott 1966) z translokacją T7DS.7DL-7J#1L. W wyniku traktowania pszenicy 'Agatha' metanosulfonianem etylu (EMS) uzyskano linie 'Agatha-28' i 'Agatha-235' o genotypie *Lr19/Sr25/Y-*, oraz linię T4m (*Lr19/Sr25/Y*) wykorzystywaną w dalszych pracach hodowlanych. Linia 'Agatha' była wykorzystana również do indukcji translokacji przez rekombinację homeologiczną i uzyskania serii linii 7Ag#1 (źródło genu *Lr29*, T7DL-7J#1L.7J#1S), 7Ag#2, 7Ag#3, oraz 7Ag#7. Wprowadzany w wyniku translokacji z *Th. ponticum* gen *Sr25* jest efektywny przeciw nowej rasie rdzy żółtobłowej Ug99. Dodatkowo obecność segmentu może się wiązać ze zwiększonym plonem ziarna o 10–13% (Singh i in. 1998).

Inna translokacja wprowadzona z *Th. intermedium* ( $2n = 6x = 42$ ; JJ<sub>s</sub>S) [syn. *Agropyron intermedium*, *Agropyron glaucum*] do ramienia 7DL pszenicy zwyczajnej przenosi gen *Bdv2* odporności na wirusa żółtej karłowatości jęczmienia (BYDV). W celu przeniesienia odporności na BYDV do pszenicy uzyskano formę oktoploidalną TAF-46, a następnie linię addycyjną L1, która z kolei posłużyła do wyprowadzenia ośmiu linii translokacyjnych TC (TC5, TC6, TC7, TC8, TC9, TC10, TC14 (7D-7S#1) i 5395 niosących odporność na BYDV. Linia TC14 niesie najmniejszą translokację obejmującą 44% dystalnej części długiego ramienia chromosomu 7D (Hohmann i in. 1996). *Th. intermedium* jest również źródłem dwóch innych genów odporności na BYDV dla pszenicy: *Bdv3* (linia substytucyjna P29 – 7S/7D) i *Bdv4* (2D-2S-2). W wyniku krzyżowania linii TC5 (*Bdv2*) z T4m (*Lr19* i *Sr25*) uzyskano mieszańce trójgenomowe 'Pontin' o formule genetycznej 7DS-7DL-7JL-7SL (Ayala-Navarrete i in. 2007, 2013), które mogą znaleźć zastosowanie praktyczne w hodowli nowych odmian pszenicy zwyczajnej.

Pomiędzy segmentem *Thinopyrum ponticum* a chromosomem 7DL pszenicy mogą zachodzić rekombinacje (Gupta i in. 2006). Do wspomagania selekcji genotypów z genem *Lr19* stosowano markery izoenzymatyczne (Winzeler i in. 1995), polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych – RFLP (Prins i in. 1996) oraz różne warianty reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR): polimorfizm produktów powielania zsekwencjonowanego regionu (SCAR, Gupta i in. 2006), miejsca znaczone sekwencyjnie (STS, Prins i in. 2001; Monneveux i in. 2003; Singh i in. 2004; Liu i in. 2010), polimorfizm sekwencji powielonej i pociętej – CAPS (Marais i in. 2001), proste powtórzenia sekwencji – SSR (Li i in. 2006) i analogi genów odporności – RGA (Gennaro i in. 2009). Niezależnie opracowano serię markerów do wspomagania selekcji genu *Bdv2* wprowadzonego z translokacją pochodzącą od *Th. intermedium*. Stosowano markery RFLP i SSR (Ayala i in. 2001), SCAR (Zhang i in. 2004, 2005) oraz STS (Wang i Wei 1995; Ayala-Navarrete i in. 2007; Gao i in. 2009; Zhang i in. 2009), w tym również markery dla rekombinowanej translokacji 'pontin'.

Celem badań było dostosowanie systemu selekcji do śledzenia obecności translokacji przenoszącej gen *Lr19* i odporność na BYDV za pośrednictwem pięciu linii translokacyjnych wykorzystywanych w krajowych programach hodowlanych pszenicy zwyczajnej oraz wykorzystanie wybranych markerów do charakterystyki różnych genotypów pszenicy.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy do identyfikacji genów tolerancji na wirusa żółtej karłowatości jęczmienia (BYDV) i rdzę brunatną stanowiły 44 odmiany pszenicy zwyczajnej (Akteur, Askalon, Bagou, Baletka, Bamberka, Banderola, Belenus, Bockris, Bogatka, Boomer, Brilliant, Bystra, Cubus, Fidelius, Figura, Forkida, Henrik, Jantarka, Jenga, Julius, Kampana, Kepler, Kohelia, Komnata, Kranich, Kredo, Look, Ludwig, Markiza, Mulan, Muszelka, Nadobna, Naridana, Nateja, Natula, Operetka, Ostroga, Ozon, Premio, Rapsodia, Skagen, Szmaragd, Tonacja, Torrild) oraz 1189 genotypów ozimej pszenicy zwyczajnej pochodzących z programów hodowlanych prowadzonych przez oddziały spółek hodowli roślin w: Strzelcach (617), Smolicach (188), Koberzycach (87), Polanowicach (100), Antoninach (138) i Choryni (59). Materiał referencyjny stanowiło 5 linii (ER20, ER35, ER6, IK33 i ER21) z rekombinowaną translokacją z *Thinopyrum ponticum* i *Th. intermedium* dostarczonych i scharakteryzowanych fenotypowo przez prof. A. Łukaszewskiego (tabela 1). Odmianę Kohelia oraz linie HBP97/2011 i SMH8677 wybrano jako genotypy kontrolne (bez translokacji z genem *Lr19*).

Tabela 1. Charakterystyka fenotypowa i markery genów *Bdv2* i *Lr19* w liniach referencyjnych  
Table 1. Phenotypic characteristics and markers of *Bdv2* and *Lr19* genes in reference lines

Linia referencyjna Reference line	Fenotyp Phenotype	Markery – Markers				
		<i>Bdv2</i>		<i>Lr19</i>		
		Bdv2	SC-gp1	SCS265	SCS253	AG15
ER20	<i>Lr19, y, Bdv2</i>	–	+	+	–	+
ER35	<i>Lr19, y, Bdv2</i>	+	+	+	–	+
ER6	<i>Lr19, y, Bdv2</i>	–	+	+	+	+
IK33	<i>Lr19, y, Bdv2/7A</i>	+	+	+	–	+
ER21	<i>Lr19, Sr25, Y, Bdv2</i>	–	+	+	+	+
HBP97/2011	<i>lr19, y, bdv2</i>	–	–	–	+	–
SMH8677	<i>lr19, y, bdv2</i>	–	–	–	+	–
Kohelia	<i>lr19, y, bdv2</i>	–	–	–	+	–

+/- oznacza odpowiednio obecność lub brak prążka diagnostycznego.

+/- marks presence or absence of diagnostic band, respectively.

Spośród licznych markerów zmapowanych w dystalnym fragmencie chromosomu 7DL, które są potencjalnie użyteczne do selekcji w fazie odpychania (Gupta i in. 2006; Ayala-Navarrete 2013), do identyfikacji genów wprowadzanych z translokacją 'pontin' wykorzystano łącznie osiem markerów w tym pięciu genu *Lr19* (Gb, SCS265, SCS253, AG15, WMS44), jednego genu *Sr25* (BF145935) i dwóch genu *Bdv2* (Bdv2, SC-gp1) (tabela 2). Reakcje PCR i profile termiczne zastosowano zgodnie z zaleceniami autorów. Zestaw ośmiu markerów przetestowano na liniach referencyjnych i trzech kontrolnych liniach wrażliwych, natomiast do analiz na 1233 genotypach pszenicy zwyczajnej wybrano pięć markerów (tabela 3). Uwarunkowania genetyczne odporności na wirusa żółtej karłowatości BYDV badano z wykorzystaniem markerów SC-gp1 i Bdv2. Do detekcji genu *Lr19* w materiałach hodowlanych wykorzystano marker AG15 oraz łączne oznaczenie markerów SCS265 i SCS253 (określane dalej jako SCS265/253). Rozdział produktów prowadzono w 1,5-procentowym żelu agarozowym, a uwidaczniano je bromkiem etydydny.

Tabela 2. Markery PCR testowane do oznaczania genu *Lr19*  
 Table 2. PCR markers tested for detection of *Lr19* gene

Marker Marker	Sekwencje starterów lewy/prawy (5'-3') Primer sequence forward/reverse (5'-3')	Długość markera (pz) Marker size (bp)	Piśmiennictwo Reference
Bdv2	CTTAACCTTCATTGTTGATCTTA CGACGAATCCCAGCTAACTAGACT	198	Kong i in. 2009
SC-gp1	CAGGACAAGTGAAAGCACCTAAGC GTCCACAAGTCATATGGGGAGAC	330	Zhang i in. 2004
BF145935	CTTCACCTCCAAGGAGTTCAC GCGTACCTGATCACACCTTGAAGG	260	Liu i in. 2010
Gb	CATCCTTGGGGACCTC CCAGCTCGCATAACATCCA	130	Prins i in. 2001
SCS265	GGCGGATAAGCAGAGCAGAG GGCGGATAAGTGGGTTATGG	512	Gupta i in. 2006
SCS253	GCTGGTTCCACAAAGCAA GGCTGGTTCTTAGATAGTG	737	Gupta i in. 2006
WMS44	GTTGAGCTTTTCAGTTCGGC ACTGGCATCCACTGAGCTG	139	Li i in. 2006
AG15	AGCTCCTTGTGACTGAAATGAATG AGATCTGCATTTTTAGCTTGACCA	600	Gennaro i in. 2009

Tabela 3. Występowanie markerów genów *Bdv2* i *Lr19* w 44 odmianach (CV) i 1189 liniach z miejscowości: Smolice (SM), Choryń (CH), Strzelce (ST), Kobierzyce (KOB), Antoniny (ANT) i Polanowice (POL)

Table 3. Distribution of markers for *Bdv2* and *Lr19* genes in 44 cultivars (CV) and 1189 lines from localizations of Smolice (SM), Choryń (CH), Strzelce (ST), Kobierzyce (KOB), Antoniny (ANT) and Polanowice (POL)

Profil Profile	Markery – Markers					Grupa genotypów – Group of genotypes						
	Bdv2	SC-gp1	SCS265	SCS253	AG15	CV	SM	CH	ST	KOB	ANT	POL
P1	-	-	-	+	-	42	167	2	183	83	87	97
P2	-	+	-	+	-	2	21	0	117	4	51	3
P3	-	+	+	-	-	0	0	8	14	0	0	0
P4	-	+	+	+	-	0	0	0	3	0	0	0
P5	-	+	+	+	+	0	0	7	30	0	0	0
P6	-	+	+	-	+	0	0	16	82	0	0	0
P7	+	+	+	+	-	0	0	1	3	0	0	0
P8	+	+	+	-	-	0	0	7	7	0	0	0
P9	+	+	+	+	+	0	0	4	74	0	0	0
P10	+	+	+	-	+	0	0	9	77	0	0	0
P11	+	-	+	-	-	0	0	4	0	0	0	0
P12	+	-	+	-	+	0	0	1	0	0	0	0
P13	-	-	+	+	-	0	0	0	6	0	0	0
P14	-	-	+	+	+	0	0	0	1	0	0	0
P15	-	-	+	-	-	0	0	0	5	0	0	0
P16	-	-	+	-	+	0	0	0	13	0	0	0
P17	+	-	+	-	+	0	0	0	1	0	0	0
P18	+	-	+	+	+	0	0	0	1	0	0	0
Ogółem Total						44	188	59	617	87	138	100

Tabela 3. Występowanie markerów genów *Bdv2* i *Lr19* w 44 odmianach i 1189 liniach z pięciu miejscowości  
 Table 3. Presence of markers for *Bdv2* and *Lr19* genes in 44 cultivars and 1189 lines from 5 localizations

Profil Profile	Lista genotypów (liczba genotypów) List of genotypes (number of genotypes)
P1	<p>Bdv2(-)/SC-gp1(-)/SCS265(-)/SCS253(+)/AG15(-)            Odmiany–cultivars (42): Akteur, Askalon, Bagou, Baletka, Bamberka, Banderola, Belenus, Bockris, Bogatka, Boomer, Brilliant, Bystra, Cubus, Fidelius, Figura, Forkida, Henrik, Jantarka, Jenga, Julius, Kampana, Kepler, Kohelia, Komnata, Kredo, Look, Ludwig, Markiza, Mulan, Muszelka, Nadobna, Naridana, Nateja, Natula, Operetka, Ostroga, Ozon, Premio, Rapsodia, Skagen, Szmaragd, Tonacja            Linie–lines Smolice (167): DW1-DW8, DW10, DW12-DW15, DW18-DW28, DW32-DW35, DW39-DW42, DW45-DW59, DW61-DW68, DW70-DW72, DW74-DW96, DW98-DW100, DW102-DW108, DW110-DW111, DW113-DW115, DW119, DW121-DW124, DW126-DW136, DW138, DP1-DP6, DP8-DP10, DP12, DP14-35, DP37-48, DP50-59            Linie–lines Kobierzyce (83): KBP1-54, KBP114, KBP115, KBP117-KBP120, KBP124-KBP155            Linie–lines Antoniny (87): PHR1-PHR16, PHR18-PHR42, PHR44, PHR54-PHR56, PHR58-PHR60, PHR70, PHR72-PHR101, PHR124, PHR132-PHR138            Linie–lines Polanowice (97): HBP1-HBP31, HBP33-HBP63, HBP65-HBP91 HBP93-HBP100            Linie–lines Choryń (2): CH1246, CH1248            Linie–lines Strzelce (183): ST204, ST211, ST215, ST225, ST228, ST233, ST237, ST238, ST250, ST254, ST257, ST260, ST263, ST267, ST285, ST287, ST288, ST292, ST295, ST297, ST301-ST304, ST313, ST316-ST319, ST323, ST328, ST329, ST334, ST337, ST348, ST350-ST352, ST357-ST360, ST363, ST364, ST366-ST368, ST370, ST382-ST384, ST386, ST389, ST399, ST400, ST406, ST412, ST444, ST445, ST446, ST449, ST464, ST483, ST489-ST492, ST494-ST496, ST501, ST504, ST506, ST508, ST510, ST513, ST514, ST524, ST525, ST527, ST528, ST529, ST532, ST533, ST535, ST537-ST539, ST549-ST551, ST553, ST554, ST558, ST560, ST562, ST565, ST568, ST570, ST573, ST574, ST581-ST589, ST591-ST595, ST597, ST598, ST602, ST605, ST608, ST611-ST613, ST616, ST619, ST621, ST628-ST630, ST677, ST708-ST712, ST714, ST719, ST720, ST724, ST726-ST728, ST737, ST738, ST739, ST740, ST749, ST750, ST764, ST773, ST780, ST781, ST785, ST786, ST789, ST795, ST796, ST805, ST808, ST810, ST820, ST824, ST826, ST830, ST832, ST835-ST840, ST842-ST845, ST848-ST852, ST856, ST861, ST865</p>
P2	<p>Bdv2(-)/SC-gp1(+)/SCS265(-)/SCS253(+)/AG15(-)            Odmiany–cultivars (2): Kranich, Torrild            Linie–lines Smolice (21): DW11, DW16, DW17, DW29-DW31, DW37, DW38, DW43, DW60, DW69, DW73, DW97, DW109, DW112, DW117, DW120, DW125, DW137, DP7, DP11            Linie–lines Kobierzyce (4): KBP116, KBP121-KBP123            Linie–lines Antoniny (51): PHR17, PHR43, PHR45-PHR53, PHR57, PHR61-PHR69, PHR71, PHR102-PHR123, PHR125-PHR131            Linie–lines Polanowice (3): HBP32, HBP64, HBP92            Linie–lines Strzelce (117): ST208, ST349, ST394, ST398, ST415, ST416, ST436, ST488, ST505, ST701-ST707, ST713, ST715-ST718, ST721-ST723, ST725, ST731-ST736, ST741-ST743, ST745-ST748, ST753-ST763, ST765-ST772, ST774-ST779, ST782-ST784, ST787, ST788, ST790, ST793, ST794, ST798-ST804, ST806, ST807, ST809, ST811-ST819, ST821-ST823, ST825, ST827, ST829, ST831, ST833, ST834, ST841, ST846, ST847, ST853-ST855, ST857-ST860, ST862-ST864, ST866-ST870</p>
P3	<p>Bdv2(-)/SC-gp1(+)/SCS265(+)/SCS253(-)/AG15(-)            Linie–lines Choryń (8): CH1215, CH1223, CH1226, CH1218, CH1229, CH1231, CH1260, CH1266            Linie–lines Strzelce (14): ST214, ST218, ST219, ST222, ST231, ST234, ST236, ST248, ST252, ST266, ST271, ST469, ST678, ST686</p>
P4	<p>Bdv2(-)/SC-gp1(+)/SCS265(+)/SCS253(+)/AG15(-)            Linie–lines Strzelce (3): ST300, ST516, ST563</p>
P5	<p>Bdv2(-)/SC-gp1(+)/SCS265(+)/SCS253(+)/AG15(+)            Linie–lines Choryń (7): CH1219, CH1220, CH1224, CH1227, CH1232, CH1233, CH1234            Linie–lines Strzelce (30): ST305-ST307, ST309, ST310, ST314, ST321, ST322, ST324-ST327, ST335, ST355, ST356, ST371, ST374, ST385, ST387, ST390, ST519-ST523, ST540, ST555, ST556, ST567, ST571</p>
P6	<p>Bdv2(-)/SC-gp1(+)/SCS265(+)/SCS253(-)/AG15(+)            Linie–lines Choryń (16): CH1259, CH1262, CH1211, CH1212, CH1217, CH1221, CH1230, CH1253, CH1256, CH1263, CH1264, CH1265, CH1267, CH1257, CH1258, CH1261            Linie–lines Strzelce (82): ST201-ST203, ST205-ST207, ST209, ST210, ST212, ST213, ST216, ST217, ST220, ST221, ST223, ST224, ST226, ST227, ST229, ST230, ST232, ST235, ST239-ST246, ST249, ST251, ST253, ST255, ST258, ST259, ST261, ST262, ST264, ST265, ST268, ST269, ST275-ST284, ST286, ST296, ST298, ST308, ST311, ST315, ST362, ST376, ST377, ST379, ST407, ST413, ST419, ST421, ST422, ST467, ST470, ST658, ST659, ST661-ST664, ST666, ST667, ST671-ST675</p>

cd. tabela 3 – cont. Table 3.

Profil Profile	Lista genotypów (liczba genotypów) List of genotypes (number of genotypes)
P7	Bdv2(+)/SC-gp1(+)/SCS265(+)/SCS253(+)/AG15(-) Linie–lines Choryń (1): CH1201 Linie–lines Strzelce (3): ST614, ST618, ST632
P8	Bdv2(+)/SC-gp1(+)/SCS265(+)/SCS253(-)/AG15(-) Linie–lines Choryń (7): CH1268-CH1270, CH1272-CH1274, CH1276 Linie–lines Strzelce (7): ST312, ST486, ST499, ST606, ST683, ST685, ST688
P9	Bdv2(+)/SC-gp1(+)/SCS265(+)/SCS253(+)/AG15(+) Linie–lines Choryń (4): CH1207, CH1210, CH1244, CH1247 Linie–lines Strzelce (74): ST299-ST333, ST338, ST341, ST391, ST393, ST396, ST397, ST475-ST477, ST484, ST500, ST511, ST512, ST530, ST531, ST534, ST541, ST543-ST548, ST559, ST561, ST564, ST566, ST569, ST572, ST575-ST580, ST596, ST599, ST600, ST601, ST603, ST604, ST607, ST609, ST610, ST615, ST617, ST620, ST622-ST627, ST633-ST636, ST638, ST639, ST643, ST645, ST646, ST648-ST650, ST652-ST654, ST684
P10	Bdv2(+)/SC-gp1(+)/SCS265(+)/SCS253(-)/AG15(+) Linie–lines Choryń (9): CH1208, CH1251, CH1271, CH1275, CH1203, CH1204, CH1206, CH1209, CH1252 Linie–lines Strzelce (77): ST272, ST273, ST274, ST289, ST290, ST291, ST293, ST294, ST330, ST336, ST340, ST342, ST343, ST344, ST345, ST346, ST347, ST353, ST354, ST361, ST365, ST369, ST372, ST375, ST378, ST388, ST401, ST402, ST403, ST405, ST425, ST426, ST427, ST428, ST429, ST430, ST431, ST432, ST433, ST434, ST435, ST437, ST438, ST439, ST440, ST441, ST442, ST443, ST450, ST451, ST453, ST454, ST455, ST456, ST457, ST458, ST460, ST462, ST468, ST471, ST472, ST473, ST478, ST479, ST481, ST485, ST487, ST498, ST631, ST640, ST641, ST642, ST644, ST647, ST651, ST655, ST682
P11	Bdv2(+)/SC-gp1(-)/SCS265(+)/SCS253(-)/AG15(-) Linie–lines Choryń (4): CH1235, CH1237, CH1241, CH1242
P12	Bdv2(+)/SC-gp1(-)/SCS265(+)/SCS253(-)/AG15(+) Linie–lines Choryń (1): CH1238
P13	Bdv2(-)/SC-gp1(-)/SCS265(+)/SCS253(+)/AG15(-) Linie–lines Strzelce (6): ST507, ST509, ST515, ST517, ST518, ST557
P14	Bdv2(-)/SC-gp1(-)/SCS265(+)/SCS253(+)/AG15(+) Linie–lines Strzelce (1): ST339
P15	Bdv2(-)/SC-gp1(-)/SCS265(+)/SCS253(-)/AG15(-) Linie–lines Strzelce (5): ST247, ST502, ST665, ST679, ST681
P16	Bdv2(-)/SC-gp1(-)/SCS265(+)/SCS253(-)/AG15(+) Linie–lines Strzelce (13): ST270, ST381, ST411, ST542, ST656, ST657, ST660, ST668, ST669, ST670, ST676, ST680, ST687
P17	Bdv2(+)/SC-gp1(-)/SCS265(+)/SCS253(-)/AG15(+) Linie–lines Strzelce (1): ST404
P18	Bdv2(+)/SC-gp1(-)/SCS265(+)/SCS253(+)/AG15(+) Linie–lines Strzelce (1): ST637

## WYNIKI I DYSKUSJA

Optymalizację oznaczeń przeprowadzono na odpornych liniach referencyjnych i trzech losowych, kontrolnych genotypach wrażliwych (tabela 2). Markery SC-gp1, SCS265 i AG15 były obecne jedynie w odpornych liniach referencyjnych. Z przeprowadzonych analiz optymalizacyjnych wynika, że marker Bdv2 jest zbyt specyficzny i nie daje możliwości identyfikacji genu *Bdv2* w materiałach, u których dawcą genu *Bdv2* były linie ER20, ER6 i ER21. Marker SCS253 o wielkość 737 pz (sprzężony z genem *Lr19* w fazie odpychania) jest amplifikowany specyficznie z dystalnej części długiego ramienia chromosomu 7D i występował jedynie u genotypów wrażliwych oraz linii ER6 i ER21, co oznacza, że linie te są heterozygotyczne pod względem posiadanej translokacji. Pozostałe testowane markery (BF145935, Gb i wms44) nie pozwalały na odróżnienie linii referencyjnych od kontrolnych w rozdziale elektroforetycznym na 1,5-procentowym żelu agarozowym.

Do testowania 1233 genotypów pod kątem występowania markerów genu *Bdv2* i *Lr19* przenoszonych przez rekombinowaną translokację 'pontin' wybrano pięć markerów. Markery SCS265 i SCS253 udało się zmultipleksować i były analizowane w pojedynczej reakcji PCR, co pozwalało na identyfikację materiałów heterozygotycznych pod względem translokacji (tabela 3). Na podstawie występowania poszczególnych markerów w badanej grupie genotypów wyodrębniono 18 profili.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wyniki uzyskane dla markera SC-gp1 są zbyt mało specyficzne, co oznacza, że ulegał on powieleniu u części roślin wrażliwych, nieposiadających translokacji „pontin”. Z kolei drugi marker genu *Bdv2* (*Bdv2*) jest zbyt specyficzny i nie daje możliwości identyfikacji tego genu w odpornych materiałach hodowlanych o różnym pochodzeniu. Z tego powodu markery te nie nadają się do identyfikacji translokacji „pontin” poprzez identyfikację obecności genu *Bdv2* w zróżnicowanych materiałach hodowlanych. W celu szerokiej identyfikacji tej translokacji konieczne jest zatem oznaczenie markerów genu *Lr19* również niesionego przez tę translokację, takich jak SCS265/253 i AG15. Stwierdzono również niezgodności pomiędzy występowaniem markera SCS265/253 i AG15, co świadczy o występowaniu rekombinacji w rejonie translokacji. Marker AG15 opracowano na bazie sekwencji genu z motywem miejsca wiązania nukleotydów (Gennaro i in. 2009), dlatego można przypuszczać, że jest ściśle związany z genem *Lr19*. To może wyjaśniać jego większą zdolność do selekcji niż SCS265/253. Z drugiej strony, marker SCS265 był sprzężony z genem *Lr19* w odległości 2,9 cM, natomiast marker SCS253 kosegregował z *Lr19* (Gupta i in. 2006). Wybrane 42 linie o profilach P3, P4, P7, P8, P11, P13 i P15 powinny być przetestowane fenotypowo w celu oceny wartości markerów i siły ich sprzężenia z docelowym genem (tabela 3).

Do indukcji rekombinacji pomiędzy segmentami *Thinopyrum intermedium* a *Thinopyrum ponticum* w tle genetycznym pszenicy zwyczajnej stosowano system z genem ph1b (Ayala-Navarrete i in. 2007). W warunkach funkcjonowania systemu Ph1 rekombinacja pomiędzy fragmentami chromosomów *Thinopyrum* a homeologicznymi fragmentami chromosomów pszenicy powinna ulegać zahamowaniu, lub silnej supresji. W literaturze brak jest informacji o rekombinacji genetycznej w rejonie translokacji 'pontin'. Mapy fizyczne pozwoliły ustalić, że kolejność genów w translokacji 'pontin' jest następująca: *Lr19*-*Sr25*-*Y*-*Bdv2* (Bournival i in. 1994; Ayala-Navarrete i in. 2007). W warunkach braku lub supresji rekombinacji, identyfikacja genów *Bdv2* i *Lr19* za pomocą systemu identyfikacji jednego z nich powinna być skuteczna w programach hodowlanych. Uzyskane wyniki oznaczają jednak, że rekombinacja pomiędzy badanymi markerami wystąpiła również w warunkach funkcjonowania systemu Ph1. Z uwagi na brak informacji o skali rekombinacji pomiędzy wykorzystywanymi markerami trudno jest określić poziom błędu związanego z wnioskowaniem o obecności genu *Bdv2* na podstawie markera genu *Lr19*. Uzyskane wyniki świadczą, że oba geny mogą być rozdzielone w wyniku rekombinacji. Obecność genu *Lr19* i *Bdv2* stwierdzono jedynie w materiałach ze Strzelec i Choryni (profile P7–P12, P17 i P18, tabela 3). Obecność genu *Lr19* w materiałach hodowlanych pochodzących ze Strzelec zidentyfikowano wcześniej (Okoń i in. 2012).

## PODSUMOWANIE

W ramach przeprowadzonych badań dostosowano system selekcyjny do obecnej w liniach ER6, ER20, ER21, ER35 i IK33 translokacji fragmentu 7JL–7SL z gatunków *Thinopyrum ponticum* i *Thinopyrum intermedium* do dystalnej części długiego ramienia chromosomu 7D. Stwierdzono, że do śledzenia obecności translokacji ‘pontin’ wprowadzanej z tych linii wystarczające są testy markerami AG15 i SCS265/253. Genotypy z markerami genów *Lr19* i *Bdv2* zidentyfikowano w materiałach pochodzących ze Strzelec i Choryni. Zastosowany system selekcji jest przydatny dla podejmowanych prób nagromadzania genów odporności w wybranych genotypach.

## PIŚMIENNICTWO

- Ayala L., Henry M., González-de-León D., van Ginkel M., Mujeeb-Kazi A., Keller B., Khairallah M.** 2001. A diagnostic molecular marker allowing the study of *Th. intermedium*-derived resistance to BYDV in bread wheat segregating populations. *Theor. Appl. Genet.* 102, 942–949.
- Ayala-Navarrete L., Bariana H.S., Singh R.P., Gibson J.M., Mechanicos A.A., Larkin P.J.** 2007. Trigenomic chromosomes by recombination of *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum* translocations in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 116, 63–75.
- Ayala-Navarrete L.I., Mechanicos A.A., Gibson J.M., Singh D., Bariana H.S., Fletcher J., Shorter S., Larkin P.J.** 2013. The Pontin series of recombinant alien translocations in bread wheat: single translocations integrating combinations of *Bdv2*, *Lr19* and *Sr25* disease-resistance genes from *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum*. *Theor. Appl. Genet.* 126, 2467–75.
- Bournival B., Obanni M., Abad A., Ohm H., Mackenzie S.** 1994. Isolation of a new species-specific repetitive sequence from *Thinopyrum elongatum* and its use in the studies of alien translocations. *Genome* 37, 97–104.
- FAOSTAT.** 2012. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>, dostęp z dnia 4.11.2013.
- Gao L., Ma Q., Liu Y., Xin Z., Zhang Z.** 2009. Molecular characterization of the genomic region harboring the BYDV-resistance gene *Bdv2* in wheat. *J. Appl. Genet.* 50, 89–98.
- Gennaro A., Koebner R.M.D., Ceoloni C.** 2009. A candidate for *Lr19*, an exotic gene conditioning leaf rust resistance in wheat. *Funct. Integr. Genomics* 9, 325–334.
- Gupta S.K., Charpe A., Prabhu K.V., Rizwanul Haque Q.** 2006. Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 113, 1027–1036.
- Hohmann U., Badaeva K., Busch W., Friebe B., Gill B.S.** 1996. Molecular cytogenetic analysis of *Agropyron* chromatin specifying resistance to barley yellow dwarf virus in wheat. *Genome* 39, 336–347.
- Knott D.R.** 1968. Translocations involving *Triticum* chromosomes and *Agropyron* chromosomes carrying rust resistance. *Can. J. Genet. Cytol.* 10, 695–696.
- Kong L., Anderson J.M., Ohm H.W.** 2009. Segregation distortion in common wheat of a segment of *Thinopyrum intermedium* chromosome 7E carrying *Bdv3* and development of a *Bdv3* marker. *Plant Breed.* 128, 591–597.
- 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.
- Liu S., Yu L.-X., Singh R.P., Jin Y., Sorrells M.E., Anderson J.A.** 2010. Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr26*. *Theor. Appl. Genet.* 120, 691–697.



- Marais G.F., Marais A.S., Groenewald J.Z.** 2001. Evaluation and reduction of Lr19-149, a recombinated form of the *Lr19* translocation of wheat. *Euphytica* 121, 289–295.
- Monneveux P., Reynolds M.P., Gonzalez Aguilar J., Singh R.P.** 2003. Effects of the 7DL.7Ag translocation from *Lophopyrum elongatum* on wheat yield and related morphophysiological traits under different environments. *Plant Breed.* 122, 379–384.
- Okoń S., Matysik P., Nita Z., Bichoński A., Rubrycki K., Woźna-Pawlak U., Kowalczyk K.** 2012. Identyfikacja genu *Lr19* odporności na rdzę brunatną w polskich liniach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). *Ann. UMCS, Sec. E.* 67, 39–43.
- Prabhu K.V., Gupta S.K., Charpe A., Koul S.** 2004. SCAR marker tagged to the alien leaf rust resistance gene *Lr19* uniquely marking the *Agropyron elongatum*-derived gene Lr24 in wheat: a revision. *Plant Breed.* 123, 417–420.
- 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.
- Prins R., Marais G.F., Janse B.J.H., Pretorius Z.A., Marais A.S.** 1996. A physical map of the Thinopyrum-derived *Lr19* translocation. *Genome* 39, 1013–1019.
- Sharma D., Knott D.R.** 1966. The transfer of leaf rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. *Can. J. Genet. Cytol.* 8, 137–143.
- Singh R., Datta D., Priyamvada, Singh S., Tiwari R.** 2004. Marker-assisted selection for leaf rust resistance genes *Lr19* and *Lr24* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Appl. Genet.* 45, 399–403.
- Singh R.P., Huerta-Espino J., Rajaram S., Crossa J.** 1998. Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7Ag and 1BL.1RS in spring wheat. *Crop Sci.* 38, 27–33.
- Tyrka M., Chełkowski J.** 2004. Enhancing the resistance of triticale by using genes from wheat and rye. *J. Appl. Genet.* 45, 283–95.
- Wang RR-C., Wei J-Z.** 1995. Variations of two repetitive DNA sequences in several Triticeae genomes revealed by polymerase chain reaction and sequencing. *Genome* 38, 1221–1229.
- Winzeler M., Winzeler H., Keller B.** 1995. Endopeptidase polymorphism and linkage of the Ep-D1c null allele with the *Lr19* leaf rust resistance gene in hexaploid wheat. *Plant Breed.*, 114, 24–28.
- Zhang W., Dubcovsky J.** 2008. Association between allelic variation at the Phytoene synthase 1 gene and yellow pigment content in the wheat grain. *Theor. Appl. Genet.* 116, 635–645.
- Zhang W., Lukaszewski A.J., Kolmer J., Soria M.A., Goyal S., Dubcovsky J.** 2005. Molecular characterization of durum and common wheat recombinant lines carrying leaf rust resistance (*Lr19*) and yellow pigment (*Y*) genes from *Lophopyrum ponticum*. *Theor. Appl. Genet.* 111, 573–582.
- Zhang Z., Lin Z., Xin Z.** 2009. Research progress in BYDV resistance genes derived from wheat and its wild relatives. *J. Genet. Genomics* 36, 567–573.
- Zhang Z., Xu J., Xu Q., Larkin P., Xin-Z.** 2004. Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene *Bdv2* useful in wheat for marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 109, 433–439.

Badania zrealizowano w ramach dotacji MRiRW do tematu pt. „Wprowadzenie odporności na wirusa żółtej karłowatości jęczmienia oraz odporności na rdzę brunatną *Lr 19* do polskich materiałów hodowlanych pszenicy”.

