



UNIWERSYTET  
PRZYRODNICZY  
W POZNANIU



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

**ROKSANA BOBROWSKA**

**Przeniesienie *loci* genów warunkujących odporność  
horyzontalną na rdzę brunatną z pszenicy zwyczajnej  
(*Triticum aestivum* L.) do pszenżyta ( $\times$  *Triticosecale*  
Wittmack)**

**Transfer of gene loci determining horizontal resistance to leaf rust from common  
wheat (*Triticum aestivum* L.) to triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack)**

Praca doktorska  
wykonana pod kierunkiem  
Prof. UPP dr hab. Michała Kwiatka,  
Dziedzina: nauki rolnicze  
Dyscyplina naukowa:  
rolnictwo i ogrodnictwo

Poznań, 2022

**Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji  
rozprawy doktorskiej:**

- P1. **Skowrońska R.**, Kwiatek M., Tomkowiak A., Nawracała J. (2019) **Development of multiplex PCR to detect *slow rust* resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat.** Journal of Applied Genetics, 60(3): 301-304. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z>  
Impact Factor: 3,240  
Punktacja wg MEiN: 140,000
- P2. **Skowrońska R.**, Tomkowiak A., Szwarc J., Nawracała J., Kwiatek M. (2020) **Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *slow rust* resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat (*Triticum aestivum* L.).** Journal of Plant Protection Research, 60(4): 388-398. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.134914>  
Punktacja wg MEiN: 100,000
- P3. **Skowrońska R.**, Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) **Molecular identification of *slow rusting* resistance *Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack) cultivars.** Journal of Applied Genetics, 61(3): 359-366. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00562-8>  
Impact Factor: 3,240  
Punktacja wg MEiN: 140,000
- P4. **Skowrońska R.**, Mariańska M., Ulaszewski W., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) **Development of triticale  $\times$  wheat prebreeding germplasm with *loci* for *slow-rusting* resistance.** Frontiers in Plant Science, 11: 447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00447>  
Impact Factor: 5,753  
Punktacja wg MEiN: 100,000
- P5. **Bobrowska R.**, Noweiska A., Spychała J., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2022). **Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* “*slow rusting*” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.).** Biomolecular Concepts, 13(1): 1-9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>  
Punktacja wg MEiN: 70,000

**Sumaryczny IF: 12,233**

**Sumaryczna pkt wg MEiN: 550,000**

*Składam serdeczne podziękowania*

*Promotorowi, za przekazaną wiedzę, cenne uwagi,  
wsparcie i pomoc przy realizacji niniejszej pracy doktorskiej*

*Współautorom publikacji  
Współpracownikom Katedry Genetyki i Hodowli Roślin  
za życzliwą pomoc na wielu etapach pracy*

*oraz **Rodzinie**, za możliwość nauki i wsparcie przez wszystkie lata.*

## Spis treści

<b>ROZDZIAŁ I Autoreferat rozprawy</b>	<b>6</b>
1. Wykaz stosowanych skrótów	7
2. Wprowadzenie	9
2.1. <i>Pszenżyto – filogenza, wykorzystanie i znaczenie</i>	9
2.2. <i>Choroby grzybowe w uprawie pszenżyta</i>	11
2.3. <i>Hodowla odpornościowa zbóż</i>	12
2.4. <i>Techniki molekularne i cytogenetyczne w hodowli</i>	15
3. Hipoteza badawcza i cel pracy doktorskiej	17
4. Materiał i metody	18
4.1. <i>Materiał badawczy</i>	18
4.2. <i>Metody badawcze</i>	21
4.2.1 Izolacja DNA przeznaczonego do analiz molekularnych	21
4.2.2 Analizy molekularne	21
4.2.3. Identyfikacja markera morfologicznego LTN	24
4.2.4. Analiza żywotności ziaren pyłku	25
4.2.5. Wyprowadzenie mieszańców F <sub>1</sub> poprzez kontrolowane krzyżowanie	25
4.2.6. Analizy cytogenetyczne	26
5. Wyniki i dyskusja	30
5.1 <i>Wyniki</i>	30
5.1.1 Opracowanie metody multipleks PCR dla genów typu <i>slow rusting</i>	30
5.1.2 Molekularna identyfikacja genów typu <i>slow rusting</i> w pszenicy	30
5.1.3 Molekularna identyfikacja genów typu <i>slow rusting</i> w mieszańcach pszenżyta × pszenicy F <sub>1</sub>	31
5.1.4 Molekularna identyfikacja genów <i>Lr68</i> oraz <i>Lr46</i> w odmianach pszenżyta	32
5.1.5 Porównanie użyteczności diagnostycznej markerów molekularnych do identyfikacji <i>locus</i> genu <i>Lr46</i> w genotypach pszenicy	32

5.1.6	Identyfikacja markera morfologicznego LTN	33
5.1.7	Krzyżowanie	33
5.1.9	Analiza żywotności ziaren pyłku	34
5.1.10	Analizy cytogenetyczne	34
5.2	Dyskusja	36
6.	Literatura	44
<b>ROZDZIAŁ II Publikacje wchodzące w skład rozprawy</b>		<b>57</b>
1.	Development of multiplex PCR to detect <i>slow rust</i> resistance genes <i>Lr34</i> and <i>Lr46</i> in wheat	58
2.	Multiplex PCR assay for simultaneous identification of <i>slow rust</i> resistance genes <i>Lr34</i> , <i>Lr46</i> and <i>Lr68</i> in wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	63
3.	Molecular identification of <i>slow rusting</i> resistance <i>Lr46/Yr29</i> gene locus in selected triticale ( $\times$ <i>Triticosecale</i> Wittmack) cultivars	75
4.	Development of Triticale $\times$ Wheat Prebreeding Germplasm With <i>Loci</i> for Slow-Rusting Resistance	84
5.	Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the <i>Lr46/Yr29</i> "slow rusting" locus in wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	93
<b>ROZDZIAŁ III Podsumowanie i wnioski</b>		<b>103</b>
<b>ROZDZIAŁ IV Streszczenie</b>		<b>105</b>
<b>ROZDZIAŁ V Summary</b>		<b>108</b>
<b>ROZDZIAŁ VI Oświadczenia autorów</b>		<b>111</b>

**ROZDZIAŁ I**  
**Autoreferat rozprawy**

# 1. Wykaz stosowanych skrótów

× - krzyżowanie

μ - mikro ( $10^{-6}$ ), przedrostek jednostki miary w układzie SI, oznaczający mnożnik 0,000 001 =  $10^{-6}$  (jedna milionowa)

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

**CAPS** – (ang. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) fragmenty restrykcyjnie amplifikowanych sekwencji

**CE** – (ang. *Crossing Efficiency*) efektywność krzyżowania

**CIMMYT** – (ang. *International Maize and Wheat Improvement Center*) Międzynarodowy Ośrodek Uszlachetniania Kukurydzy i Pszenicy

**cM** – centymorgan, jednostka dystansu genetycznego w oparciu o częstotliwość rekombinacji

**COBORU** – Centralny Ośrodek Badań Odmian Roślin Uprawnych

**Coss.** – Ernest Saint-Charles Cosson

**CTAB** – bromek heksadecylotrimetyloamoniowy

**DAPI** – 4'-6-diamidyno-2-fenylindol

**Desf.** – René Desfontaines

**DH** – (ang. *double haploid*) podwojone haploidy

**DIG** - digoxigenina-11-dUTP

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

**f. sp.** – *Formae specialis*

**F<sub>1</sub>** – (łac. *filia* = córka, *filius* = syn) pierwsze pokolenie potomne

**FAO** – (ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa

**FISH** – (ang. *Fluorescence in situ Hybridization*) fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

**GISH** – (ang. *Genomic in situ Hybridization*) genomowa hybrydyzacja *in situ*

**GUS** – Główny Urząd Statystyczny

**ISH** – (ang. *in situ Hybridization*) hybrydyzacja *in situ*

**Kom. osob.** – komunikacja osobista

**L.** – Karol Linneusz

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

**LTN** – (ang. *Leaf Tip Necrosis*) nekroza wierzchołków liści

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

**P.** – (łac. *Puccinia*) rodzaj grzybów z rodziny rdzowatych

**PBS** – buforowana fosforanem sól fizjologiczna (pH 7,4)

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

**Pm** – (ang. *powdery mildew*) gen odporności na mączniaka prawdziwego

**pz** – par zasad

**RNaza** – rybonukleaza

**sdH<sub>2</sub>O** – sterylna woda destylowana

**SDS** – (ang. *Sodium Dodecyl Sulphate*) siarczan dodecyłu sodu

**sp.** – (łac. *species*) gatunek

**ssp.** – (łac. *subspecies*) podgatunek

**SSC** – roztwór cytrynianu sodu i soli fizjologicznej

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

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

**var.** – (łac. *varietas*) odmiana

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

## 2. Wprowadzenie

### 2.1. Pszenżyto – filogenza, wykorzystanie i znaczenie

Pszenżyto ( $\times$ *Triticosecale* Wittmack) jest sztucznie otrzymanym allopoliploidem powstałym poprzez skrzyżowanie pszenicy (*Triticum* spp.) z żytem (*Secale cereale* L.). Celem stworzenia pszenżyta było otrzymanie zboża łączącego doskonałe cechy jakościowe pszenicy ze zdolnościami adaptacyjnymi, wigorem i tolerancją lub odpornością na abiotyczne i biotyczne stresy charakteryzujące żyto. Pierwsze, sterylne mieszańce zostały uzyskane pod koniec XIX wieku (Wilson 1873). Proces hodowli pszenżyta stał się możliwy na początku XX wieku, gdy opracowano techniki *embryo rescue* oraz metody indukcji podwojonych haploidów (DH) z użyciem kolchicyny (Blakeslee i Avery 1937, Laibach 1925). Najczęściej spotykane są formy heksaploidalne (AABBRR). Pszenżyta oktaploidalne (AABBDDRR), które określa się mianem pierwotnych, wykazują lepsze właściwości jakościowe, jednak cechują się niestabilnością genetyczną i sterylnością kwiatostanów (Mergoum i in. 2009). Pszenżyta tetraploidalne (AARR) również wykazują sterylności kwiatostanów (Simmonds 1976).

Pszenżyta powstałe poprzez pierwsze krzyżowania pszenicy z żytem, bez kolejnych hybrydyzacji, nazywane są pszenżytami pierwotnymi. W proces powstawania pszenżyta pierwotnego zaangażowane było International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), a także krajowe programy hodowlane we Wschodniej i Zachodniej Europie, Australii, Chinach i Kanadzie. W hodowli pszenżyta pierwotnego pojawiało się jednak wiele problemów takich jak: częściowa sterylności kwiatów, zasychanie ziarniaków, niski plon i słaba adaptacja roślin. Ze względu na to, hodowcy skupili się na uzyskaniu pszenżyta wtórnego, poprzez krzyżowanie różnych pszenżyt pierwotnych oraz krzyżowania wsteczne z pszenicą (Mergoum i in. 2009, Randhawa i in. 2015).

W Polsce próby hodowli pszenżyta ozimego podjęto już w XIX wieku. W 1902 roku ukazał się po polsku podręcznik zatytułowany *Hodowla i uszlachetnianie roślin gospodarskich*. Był on owocem wieloletnich badań prof. Antoniego Sempołowskiego. W tej wielce nowatorskiej, jak na owe czasy książce (niektóre przemyslenia zachowały aktualność do II połowy XX wieku), autor zwracał m.in. uwagę na możliwość krzyżowania pszenicy z żytem (Sempołowski 1902). Dzięki inspiracji Profesora Polska stała się krajem pionierskim w hodowli i uprawie pszenżyta, bo tak nazwano tę

mieszańcową formę. Wieloletnie badania pozwoliły na zarejestrowanie już przed II wojną pierwszą odmiany pszenżyta (Kruszynkowskie). Odmiany przeznaczone do produkcji towarowej zaczęły powstawać w Polsce dopiero na początku lat 80 XX w. Prekursorową odmianą zarejestrowaną w 1982 roku było 'Lasko', które – ze względu na swoją wysoką skłonność do wymarzania – przeznaczone było na cele eksportowe (Arseniuk i in. 2003). Od czasu pojawienia się pierwszych odmian pszenżyta powierzchnia zasiewu uprawy na świecie wzrasta z roku na rok. Obecnie w Krajowym Rejestrze COBORU (Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych) zarejestrowane są 43 odmiany pszenżyta ozimego oraz 17 odmian pszenżyta jarego (COBORU). Pszenżyto stanowi 12,9% wszystkich zasiewów w Polsce, a średni plon tej uprawy w 2020 roku wyniósł 4,46 t/ha (GUS). Na świecie w 2020 roku wyprodukowano ponad 15 mln ton pszenżyta, a powierzchnia zasiewu wyniosła prawie 4 mln ha. Głównymi producentami pszenżyta była Polska (6 mln ton), Niemcy (2 mln ton), Białoruś (1,5 mln ton), Francja (1,2 mln ton) i Hiszpania (800 tys. ton) (FAO).

Pszenżyto jest gatunkiem uprawnym o ugruntowanej pozycji na arenie międzynarodowej i jest wykorzystywane głównie na paszę dla zwierząt gospodarskich, w szczególności dla drobiu i trzody chlewnej, w postaci ziarna, ale także jako roślina wypasowa. Wykazano, że białko pszenżyta charakteryzuje się korzystniejszym układem aminokwasowym i jest lepiej przyswajalne przez zwierzęta niż białko żyta i pszenicy (Arseniuk i Oleksiak 2002). Ponadto, współczesne odmiany pszenżyta są konkurencyjnym surowcem do produkcji bioetanolu i biogazu. Pszenżyto posiada układ enzymów autoamylolitycznych, który pomaga w konwersji dużych ilości skrobi w cukry fermentujące (McGoverin i in. 2011). Ze względu na brak genomu D pszenicy, w którym zlokalizowane są najważniejsze geny warunkujące wartość technologiczną, pszenżyto charakteryzuje się niską wartością wypiekową. Prowadzono jednak badania składu chemicznego i cech fizycznych mąki z ziarna pszenżyta i wykazano, że mąka pszenżytnia może być z powodzeniem wykorzystywana do wyrobów ciastkarskich (Archemowicz i in. 2014). Jednym z głównych problemów w hodowli pszenżyta jest brak wystarczającej różnorodności genetycznej (Mergoum i in. 2004, Niedziela i in. 2016). Pszenżyto jest nowym gatunkiem uprawnym, który w porównaniu z innymi uprawami, takimi jak pszenica i jęczmień, nie przeszedł naturalnego procesu ewolucji i specjacji (Mergoum i in. 2004). Wykazano, że większość plazmy zarodkowej pszenżyta jest genetycznie podobna (De Costa i in. 2007, Kuleung i in. 2006, Trebichalsky i in. 2013). Tams i in.

(2004) analizowali europejskie odmiany pszenżyta z 13 firm hodowlanych i wykazali, że plazma zarodkowa genotypów charakteryzowała się zmiennością wynoszącą zaledwie 15,3%. Jedną z metod poszerzania różnorodności genetycznej pszenżyta może być introgresja chromatyny spokrewnionych gatunków, takich jak pszenica.

## 2.2. Choroby grzybowe w uprawie pszenżyta

Pszenżyto początkowo charakteryzowało się wysoką odpornością na choroby w porównaniu z pszenicą, jednak wraz z rosnącą powierzchnią uprawy pojawiały się nowe rasy w populacjach patogenów (Arseniuk 1996, Mergoum i in. 2004, 2009). Pszenżyto jest corocznie porażane przez to samo spektrum patogenów, co jego formy wyjściowe – pszenica i żyto (Audenaert i in. 2014). Rdza żdźbłowa, powodowana przez *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, została uznana za pierwszą chorobę pszenżyta w Australii, która wystąpiła w skali epidemii (Arseniuk 1996). Obecnie do głównych zagrożeń biotycznych w uprawie pszenżyta należą choroby powodowane przez patogeny grzybowe *Puccinia* sp., *Septoria* sp., *Blumeria graminis* oraz *Fusarium* sp. a także bakterie *Xanthomonas* sp. i *Pseudomonas* sp. (Arseniuk 1996, Mergoum i in. 2004, 2009, 2019, Sapkota 2015, Sapkota i in. 2018).

Rdza brunatna jest najczęstszą i najbardziej rozpowszechnioną chorobą, atakującą zboża na całym świecie (Cliford 1985, Park i in. 2015). Rdza brunatna na pszenżycie jest spowodowana przez patotypy obligatoryjnego patogena pszenicy *Puccinia triticina* Eriksson, które stały się zjadliwe wobec genotypów pszenżyta (Sodekiewicz i in. 2008, Mikhailova i in. 2009). Patogen *P. triticina* Erikss. należy do królestwa grzybów (*Fungi*), typu podstawczaki (*Basidiomycota*), klasy rdze (*Pucciniomycetes*), rzędu rdzowce (*Pucciniales*), rdzowate (*Pucciniaceae*) i rodzaju rdza (*Puccinia*) (<http://www.indexfungorum.org/>).

*P. triticina* Erikss. jest makrocycliczną i heteroecyjną rdzą dwudomową, wytwarzającą pięć stadiów zarodników. Żywicielem ecjalanym, na którym rozwijają się bazydiospory i ecjospory są różne gatunki rutewki (*Thalictrum*) i zdrojówki (*Isopyrum*), jednak w Europie nie odgrywają one żadnej roli (Bolton i in. 2008). Żywicielem telialnym jest pszenica zwyczajna (*T. aestivum* L.), pszenica durum (*T. turgidum* L. var. *durum*), pszenica płaskurka (*T. dicoccon* (Schrank) Schübl.) i *T. dicoccoides* (Körn. ex Asch. i Graebn.) Schweinf., *Aegilops speltoides* Tausch., *Ae. cylindrica* i pszenżyto. Pierwsze objawy na liściach pojawiają się w maju lub czerwcu w postaci chlorotycznych plam,

a następnie w tym miejscu w ciągu 7–10 dni po inokulacji grzybnia rozrastająca się w tkance liścia powoduje powstawanie rdzawych uredinów z urediniosporami. Pomarańczowo-czerwone urediniospory są uwalniane, gdy uredinie rozrywają epidermę liści. Uredinia mogą się tworzyć także na pochwach liściowych, źdźbłach i kłosach. Urediniospory są przenoszone przez wiatr lub deszcz i osadzają się po obu stronach liścia pszenicy. Kiełkowanie zarodników następuje po 4–8 godz. w temperaturze 20°C i wilgotności 100% (Hu i Rijkenberg 1998, Zhang i Dickinson 2001, Zhang i in. 2003), ale zarodniki mogą zachować żywotność przez 1–3 dni (Allen 1926). Patogen zimuje w postaci urediniospor lub grzybni w oziminach, samosiewach lub trawach (Bolton i in. 2008). W miarę dojrzewania rośliny żywicielskiej i rozwoju infekcji, w urediniach powstają dikariotyczne, brązowoczarne, dwukomórkowe teliospory, o grubych, gładkich ściankach. W klimacie śródziemnomorskim teliospory pozwalają rdzy przetrwać gorące i suche lata, aby jesienią zainfekować alternatywnych żywicieli.

Straty plonu w wyniku infekcji *P. triticina* są zwykle wynikiem redukcji ciężaru ziarniaków oraz ich wypełnienia (Sayre i in. 1998, Woś i in. 1994) oraz pomarszczenia i ograniczenia zawiązywania ziarniaków (Roelfs 1992). Porażone zboża gorzej zimują, ze względu na gorsze rozkrzewienie systemu korzeniowego. Wykazano, że porażenie 10% liści pszenżyta przez rdzę brunatną skutkuje do 3% straty plonu ziarna (Zhang i in. 2010). W sprzyjających warunkach straty plonu powodowane przez patogena mogą wahać się od 15% (Roelfs i Bushnell 1985) do ponad 50%, jeśli infekcja występuje we wczesnych stadiach wzrostu (Huerta-Espino i in. 2011).

### **2.3. Hodowla odpornościowa zbóż**

Obecnie, jedną z najskuteczniejszych i najbardziej przyjaznych dla środowiska metod zwalczania chorób jest hodowla odmian odpornych (Dinh i in. 2020). W pszenicy skatalogowano ponad 100 genów i alleli odporności na rdzę brunatną, które oznaczane są symbolem *Lr* (ang. *Leaf rust*), ok. 130 alleli genów warunkujących odporność na rdzę żółtą (*Yr*, ang. *Yellow rust*) oraz ponad 140 alleli genów odpowiadających za odporność na mączniaka prawdziwego (*Pm*, ang. *Powdery mildew*) (McIntosh i in. 2019).

Geny odporności można sklasyfikować w dwóch grupach. Do pierwszej grupy należą geny zapewniające odporność rasowo-specyficzną, czyli główne geny odporności indukujące odporność pionową „gen na gen” (Flor 1971). Geny te zapewniają roślinom odporność przez cały cykl wegetacyjny, stąd ten typ odporności nazywany jest

odpornością w stadium siewki (ang. *seedling resistance*). Geny główne są skuteczne jedynie w przypadku danych ras fizjologicznych patogenów. Ekspresja genów występuje w przypadku jednoczesnej obecności genu efektorowego awirulencji (*Avr*) w genotypie patogena i genu odporności w roślinie. Działanie genu objawia się reakcją nadwrażliwości rośliny na infekcję patogena (Bolton i in. Kolmer, i Garvin 2008). Obecnie większość z genów odporności na choroby w pszenicy jest rasowo-specyficzna. Populacja *P. triticina* Erikss. składa się z wielu ras o zróżnicowanym poziomie zjadliwości i charakteryzuje się częstymi mutacjami sekwencji genu *Avr* w organizmie patogena, która skutkuje brakiem rozpoznania przez gen główny rośliny-gospodarza (Dodds i Rathjen 2010). W związku z tym patogen może szybko przystosować się do porażenia odmian posiadających jeden lub wiele genów odporności, które wcześniej były skuteczne przeciwko rasom patogena występującym na danym terenie (McCallum i in. 2014). Wykazano, że trwałość odporności pionowej jest odwrotnie proporcjonalna do zakresu jej stosowania w uprawach roślin (Parlevliet 1993). Geny rasowo-specyficzne zapewniają odporność odmianom zaledwie przez 5-7 lat, dlatego należy stale poszukiwać i wprowadzać do programów hodowlanych nowe źródła odporności (Kilpatrick 1975). Obecnie stosuje się wiele źródeł odporności warunkowanej genami głównymi i dąży się do ich piramidyzacji, czyli równoczesnego wprowadzania kilku genów w nowych odmianach (Kolmer 1996).

Drugą grupę stanowią geny warunkujące odporność w stadium roślin dorosłej (APR, ang. *Adult Plant Resistance*), nazywanej także odpornością poziomą, rasowo-niespecyficzną lub częściową. Zapewnia ona roślinom odporność przed wieloma rasami patogenów, w związku z tym charakteryzuje się większą trwałością w warunkach polowych (Van Ginkel i Rajaram 1993, Krattinger 2011). Ekspresja genów następuje w stadium rośliny dorosłej (Ellis i in. 2014). Odporność nie objawia się reakcją nadwrażliwości, jak w przypadku genów rasowo-specyficznych, ale obniżonym tempem rozwoju grzybów (Rubiales i Niks 1995, Risk i in. 2012). Ponieważ priorytetem większości programów hodowlanych zbóż na świecie jest obecnie osiągnięcie trwałej odporności na patogeny grzybowe, dlatego dobrą alternatywą dla genów rasowo-specyficznych może być wprowadzanie do odmian odporności poziomej. W puli genowej pszenicy zidentyfikowano do tej pory osiem genów, które nadają trwałą odporność roślin dorosłych na liczne choroby grzybowe i opracowano dla nich markery molekularne. Geny te nazwano: *Lr34* (=Yr18/Sr57/Pm38), *Lr46* (=Yr29/Sr58/Pm39, *Lr67*

(=*Yr46/Sr55/Pm46*), *Lr68*, *Lr74*, *Lr75*, *Lr77* i *Lr78* (Suenaga i in. 2003, Singh i in. 1998, Hiebert i in. 2010, Herrera-Foessel i in. 2012, McIntosh i in. 2015, Singla i in. 2017, Kolmer i in. 2018a, Kolmer i in. 2018b). Tylko dwa geny zostały wizolowane: *Lr34* (Krattinger i in. 2009) i *Lr67* (Moore i in. 2015). Ponieważ cechą charakterystyczną dla działania genów jest spowolnienie procesu infekcji patogena rdzy, nazywane są genami typu *slow rusting* (powolne rdzewienie). Ekspresja genów skutkuje częściową odpornością na wszystkie rasy patogenów grzybowych pszenicy wywołujących nie tylko rdzę brunatną, ale także rdzę żółtą (*P. striiformis* f. sp. *tritici* Westend), rdzę żdźbłową (*P. graminis* f. sp. *tritici* Pers.) i mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* Speer f. sp. *tritici*).

Przedłożona rozprawa doktorska dotyczyła wprowadzenia do genomu pszenżyta *loci* trzech genów typu *slow rust*: *Lr34*, *Lr46*, *Lr68*. Do tej pory najbardziej poznanym jest gen *Lr34* (opisywany także: *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38*). Gen jest szeroko stosowany w hodowli odmian pszenicy na całym świecie, a jego odporność pozostaje skuteczna przez wiele lat pomimo zastosowania w rolnictwie na dużą skalę. Gen koduje transporter wiążący ATP (tzw. *ABC transporter – ATP Binding Cassette transporter*) (Krattinger i in. 2009), czyli wielodomenowe białko błonowe, które wykorzystuje energię z hydrolizy ATP do translokacji substancji przez błonę komórkową organizmów żywych. *Lr34* jest powszechnie występującym genem we wszystkich odmianach pszenicy heksaploidalnej, w różnych wariantach alelicznych: allel *Lr34res* – zapewniający odporność różni się od powszechnie występującego allelu *Lr34sus* trzema mutacjami SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfizm pojedynczego nukleotydu) w intronie 4 oraz egzonach 11 i 12 sekwencji genu *Lr34* (Krattinger i in. 2009). Największa efektywność genu następuje w temperaturze tj. 4-10°C, w stadium liścia flagowego oraz w stadium siewki (Risk i in. 2012). W wysokich temperaturach efektywność genu obniża się (McIntosh i in. 1995). Gen wywodzi się prawdopodobnie z chińskich odmian lokalnych (Krattinger i in. 2009, Kolmer i in. 2008). Gen został zidentyfikowany w kilku odrębnych grupach materiału genetycznego, np. w liniach CIMMYT i europejskiej plazmie zarodkowej pszenicy ozimej, na przykład odmianie ‘Frontana’, która została opracowana w Brazylii, lub włoskiej odmianie ‘Mentana’ (Kolmer i in. 2013).

Gen *Lr46* (opisywany także jako *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39*) również zapewnia częściową odporność roślin dorosłych na rdzę brunatną oraz rdzę żółtą od ponad 60 lat (Kolmer 2015). Gen został po raz pierwszy opisany w odmianie ‘Pavon 76’

i zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 1B (Singh i in. 1998). Efekt genu *Lr46* jest podobny, ale mniejszy w porównaniu z *Lr34* w roślinach dorosłych (Martinez i in. 2001). Lagudah (2011) wskazał, że gen *Lr46* jest bardziej efektywny w chłodniejszych środowiskach, a obecność innych genów *Lr* może wpływać na ekspresję *Lr46*. William i in. (2003) stwierdzili, że *Lr46* jest powiązany lub plejotropowy z genem odporności na rdzę żółtą *Yr29*. Określono również, że genotypy pszenicy z genem *Lr46* posiadają gen odporności na rdzę żdźbłową *Sr58* (Singh i in. 2013) oraz gen odporności na mączniaka prawdziwego (*Pm39*) (Lillemo i in. 2008).

Herrera-Foessel i in. (2012) zidentyfikowali kolejny gen APR, *Lr68* w odmianie pszenicy 'Parula'. Gen został zmapowany w specyficznym obszarze bogatym w geny na chromosomie 7BL pomiędzy locus *Psy1-1* (gen warunkujący żółte bielmo) a markerem molekularnym *Xgwm146*. Gen prawdopodobnie pochodzi z brazylijskiej odmiany pszenicy 'Frontana', która jest znana z APR na *P. triticina* ze względu na obecność genu *Lr34* i 2–3 dodatkowych niezidentyfikowanych genów typu *slow rusting* (Singh i Rajaram 1992). Lillemo i in. (2011) wykazali, że działanie *Lr68* w uprawach zbóż na terenie Urugwaju i Argentyny było silniejsze niż *Lr34*.

Ponadto z obecnością genów związana jest nekroza wierzchołków liści *LTN* (ang. *Leaf Tip Necrosis*), warunkowana przez geny *Ltn1* i *Ltn2*. Jest to proces podobny do starzenia, który rozwija się głównie w liściach flagowych dorosłych roślin pszenicy i może być wykorzystywany jako marker morfologiczny dla genów typu *slow rusting* (Singh 1992, Krattinger i in. 2009).

#### **2.4. Techniki molekularne i cytogenetyczne w hodowli**

W komercyjnej hodowli pszenżyta stosuje się głównie tradycyjne metody hodowlane. Pszenżyto jest rośliną samopylną, lecz charakteryzuje się także pewnym stopniem fakultatywnej obcopylności (0-60%). Przeniesienie obcych genów, warunkujących pożądane cechy, można osiągnąć poprzez wyprowadzanie linii translokacyjnych z wykorzystaniem krzyżowań oddalonych, a następnie krzyżowań wstecznych (Lelley 2006, Randhawa i in. 2015). W celu ulepszenia pszenżyta mogą być wykorzystywane także nowoczesne techniki hodowlane takie jak: selekcja wspomagana markerami MAS (ang. *Marker-Assisted Selection*), genomowa hybrydyzacja *in situ* GISH (ang. *Genomic in situ Hybridization*), technika podwojonych haploidów (DH) i techniki inżynierii genetycznej.

Stosowanie markerów molekularnych nie tylko skraca cykl hodowlany, ale jest również bardziej efektywne, głównie dlatego, że wyeliminowany zostaje wpływ czynników środowiskowych na wyniki analiz (Mergoum i in. 2009). Obecnie dostępność markerów molekularnych dla pszenżyta jest ograniczona, ale wiele markerów molekularnych pszenicy i żyta zostało zaadoptowanych do analiz genomu pszenżyta, dlatego metody mogą być stosowane także w pszenżycie (Mergoum i in. 2019). W literaturze dostępnych jest szereg markerów molekularnych używanych do identyfikacji *loci* wyżej opisywanych genów typu *slow rusting* w pszenicy.

Multipleksowa reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) jest wariantem PCR, w którym w tej samej reakcji amplifikowane są produkty charakterystyczne dla różnych *loci*. Od czasu pierwszej publikacji w 1988 r. (Chamberlain i in. 1988) metoda ta była z powodzeniem stosowana w wielu obszarach badań DNA, w tym w analizach delecji (Henegariu i in. 1994), mutacji (Shuber i in. 1993), polimorfizmów (Mutirangura i in. 1993), w testach ilościowych (Mansfield i in. 1993), a także w identyfikacji genów odporności na choroby zbóż (Tomkowiak i in. 2019, Sumíková i Hanzalova 2010). Zastosowanie metody typu multipleks PCR do jednoczesnej identyfikacji wielu genów pozwala na skrócenie czasu i ograniczenie kosztów procesu wyboru komponentów do krzyżowań.

Jedną z najważniejszych analiz po uzyskaniu roślin mieszańcowych jest analiza cytogenetyczna w celu poznania struktury genomowej mieszańców. Przełomem było opracowanie metod hybrydyzacji kwasów nukleinowych *in situ* (ISH, ang. *in situ hybridization*) polegającej na połączeniu metod cytogenetycznych i molekularnych. Technika polega na łączeniu sondy, czyli wyznakowanego jednoniciowego DNA lub RNA z komplementarnymi sekwencjami w komórce. W wyniku hybrydyzacji możliwa jest fizyczna lokalizacja sekwencji DNA na chromosomach mitotycznych lub mejotycznych oraz jądrach interfazowych na preparatach cytogenetycznych. U roślin fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) została po raz pierwszy zastosowana w 1985 roku na materiale pozyskanym z pszenicy (Rayburn i Gill 1985). Genomowa hybrydyzacja *in situ* (GISH) stanowi modyfikację metody FISH, w której sondę stanowić może całkowite genomowe lub subgenomowe DNA. Z wykorzystaniem metody GISH możliwa jest identyfikacja chromosomów pochodzących od różnych komponentów użytych w krzyżowaniach. Metoda GISH została po raz pierwszy wykorzystana na materiale roślinnym przez Schwarzecher i in. (1989).

### 3. Hipoteza badawcza i cel pracy doktorskiej

Jak wykazano we wprowadzeniu, ze względu na powiększającą się powierzchnię uprawy pszenżyta i pojawianie się nowych zjadliwych ras patogenów, obecnie konieczne jest wprowadzanie nowych skutecznych genów odporności na choroby pszenżyta, w celu ograniczenia rozwoju patogena i zmniejszania ilości stosowanych środków ochrony roślin. W związku z tym hipoteza badawcza zakładała, że istnieje możliwość poszerzenia puli genowej pszenżyta o geny typu *slow rusting*, zapewniające rasowo-niespecyficzną odporność na rdzę brunatną (powodowaną przez *Puccinia triticina* Erikss.) przy wykorzystaniu technik kontrolowanego krzyżowania.

Badania obejmowały:

- 1) Identyfikację genów odporności horyzontalnej na rdzę brunatną w zgromadzonych 73 genotypach pszenicy zwyczajnej (*T. aestivum* L.),
- 2) Opracowanie metod typu multipleks PCR do jednoczesnej identyfikacji *loci* genów *Lr34*, *Lr46*, *Lr68* w różnych wariantach,
- 3) Identyfikację *locus* genu *Lr46* w wybranych odmianach pszenżyta ( $\times$ *Triticosecale* Wittmack) przy użyciu markerów molekularnych *Xwmc44* oraz *csLV34G22* oraz markera morfologicznego *LTN*,
- 4) Wyprowadzenie roślin mieszańcowych pszenica – pszenżyto poprzez kontrolowane krzyżowanie dwóch odmian pszenżyta z 33 genotypami pszenicy,
- 5) Ocena uzyskanych mieszańców F<sub>1</sub> przy użyciu markerów molekularnych oraz genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH),
- 6) Ocena przydatności dostępnych w literaturze markerów molekularnych do identyfikacji *locus* genu *Lr46* w pszenicy.

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę możliwości przeniesienia *loci* genów warunkujących odporność horyzontalną na rdzę brunatną z pszenicy zwyczajnej (*T. aestivum* L.) do pszenżyta ( $\times$ *Triticosecale* Wittmack.) oraz opracowanie warunków reakcji typu multipleks PCR, które mogłyby skrócić czas analiz i ich kosztochłonność w aspekcie zastosowana w hodowli komercyjnej. Celem pośrednim pracy było opracowanie metod pozwalających na wybór materiałów do krzyżowań, a także ocenę uzyskanych roślin mieszańcowych pod względem przeniesienia chromosomów lub fragmentów chromatyny z pszenicy do pszenżyta. Cele zostały zrealizowane przy użyciu markerów molekularnych, cytogenetyki molekularnej oraz technik kontrolowanego krzyżowania oddalonego.

## 4. Materiał i metody

### 4.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiło 14 odmian pszenżyta ozimego oraz 6 odmian pszenżyta jarego (*×Triticosecale* Wittmack), które jest obecnie zarejestrowane w Krajowym Rejestrze COBORU (Tab. 1). Większość odmian jest corocznie polecana do uprawy na terenie Polski w zależności od regionu. Do badań użyto ponadto 2 genotypy pszenicy ozimej oraz 71 genotypów pszenicy jarej (*Triticum aestivum* L.), która według danych literaturowych oraz analizy rodowodowej może być źródłem różnych genów typu *slow rusting* (Tab. 2).

Ziarniaki pszenicy pozyskano z National Small Grains Germplasm Facility, National Small Grains Collection w Aberdeen, Idaho, USA. Ziarniaki pszenżyta uzyskano z firmy nasiennej DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. w Choryni.

Materiał referencyjny dla genów typu *slow rusting* w analizach molekularnych stanowiły następujące genotypy pszenicy: ‘Lr34’ (dla genu *Lr34*), ‘Pavon 76F’ (*Lr46*) oraz ‘Parula’ (*Lr68*).

Tabela 1. Odmiany pszenżyta ozimego (*Triticosecale* Witt.) uzyskane z firmy nasiennej DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. w Choryni.

Lp.	Odmiana	Odporność na rdzę brunatną (1-9)*	Odporność na rdzę żółtą (1-9)*	Lp.	Odmiana	Odporność na rdzę brunatną (1-9)*	Odporność na rdzę żółtą (1-9)*
1.	Avocado	8.3	8.2	11.	Subito	8.1	7.5
2.	Belcanto	8.6	8.7	12.	Trapero	8.3	8.4
3.	Dolindo	8.5	8.0	13.	Trismart	6.8	6.8
4.	Fredro	7.5	7.5	14.	Twingo	8.0	8.3
5.	Kasyno	8.5	8.8	15.	Dublet	7.5	8.5
6.	Maestozo	8.3	7.3	16.	Mamut	8.3	8.7
7.	Orinoko	8.2	7.8	17.	Mazur	8.2	8.5
8.	Pizarro	8.0	8.4	18.	Puzon	8.3	8.1
9.	Porto	8.5	8.3	19.	Santos	8.4	8.5
10.	Rotondo	8.0	6.5	20.	Sopot	8.0	8.4

\*Ocena połowa odporności wg skali COBORU : 9 - oznacza stan najkorzystniejszy, 1 – stan najmniej korzystny. Dane pochodzą z badań PDO (Porejestrowe Doświadczalnictwo Odmianowe) z lat 2016-2018 (Drażkiewicz 2019).

Tabela 2. Genotypy pszenicy zwyczajnej (*T. aestivum* L.) stanowiące materiał badawczy w cyklu publikacji wraz z wykazem pochodzenia, rodowodem oraz postulowanymi *loci* genów typu *slow rusting* na podstawie literatury.

Lp.	Genotyp	Numer identyfikacyjny	Pochodzenie	Rodowód ( <a href="https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx">https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx</a> )	Postulowane <i>loci</i> genów typu <i>slow rusting</i>
1.	Ceruga-4	PI 560118	USA, Georgia	Coker 916//Tyler/Buck Manantial	<i>Lr46</i>
2.	San Martin	PI 116314	Argentyna, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	<i>Lr46</i>
3.	H 51	PI 191925	Argentyna, Buenos Aires	Americano 25e/Favorito//Universal	<i>Lr46</i>
4.	Artigas	PI 192535	Urugwaj	Americano 25E/Americano 26N	<i>Lr46</i>
5.	Larranaga	PI 191713	Urugwaj	Americano 25e/Pelon 33c	<i>Lr46</i>
6.	ProINTA Imperial	PI 674008	USA, Kalifornia	Buck Manantial/ProINTA Imperial//*6 ProINTA Imperial	<i>Lr46</i>
7.	NP 818	PI 422294	Indie, Delhi	Democrat/C 518//Spaldings Prolific/NP 114/3/E 220 (Kenya C10854)	<i>Lr46</i>
8.	Buck Manantial	PI 344455	Argentyna, Buenos Aires	Rafaela MAG/Buck Quequen	<i>Lr46</i>
9.	Janz	PI 591910	Australia, Queensland	3AG3/4*Condor//Cook	<i>Lr34</i>
10.	7536K-51A4	PI 553001	Kanada, Saskatchewan	Willet/McMurachy//Glenlea	<i>Lr34, Lr46</i>
11.	7531-V3D	PI 552994	Kanada, Saskatchewan	Glenlea/NB313	<i>Lr34, Lr46</i>
12.	Jacui	PI 520498	Brazylia, Rio Grande do Sul	S 8/Toropi	<i>Lr34, Lr46</i>
13.	P8802-C1*3A2C16	PI 596351	Kanada, Saskatchewan	Benito*6/Glenlea//Benito	<i>Lr34</i>
14.	P8802-C1*3A2A2U	PI 596350	Kanada, Saskatchewan	Benito*6/Glenlea//Benito	<i>Lr34</i>
15.	HD 2329	PI 648391	Indie, Delhi	HD 1962/E 4870//K 65/3/HD 1553/UP 262	<i>Lr34, Lr46</i>
16.	K494	PI 250413	Pakistan	–	<i>Lr67</i>
17.	Glenlea	Cltr 17272	Kanada, Manitoba	Pembina*2/Bage//CB 100 CB 100 = Sonora 64/Tezanos Pintos Precoz//Nainari 60	<i>Lr34, Lr46</i>
18.	Artigas	PI 73046	Urugwaj	Americano 25E/Americano 26N	<i>Lr46</i>
19.	Amurskaya 90	PI 592036	Rosja, Amurskaja oblast'	Glenlea/Altair 12	<i>Lr34, Lr46</i>
20.	Lerma Rojo	Cltr 13651	Meksyk, Ciudad de México	Lerma 50/Yaqui 48//Mario Escobar*2/Supremo 211	<i>Lr34, Lr46</i>
21.	363-11	PI 527696	Kanada, Saskatchewan	PI 191320/Glenlea	<i>Lr46</i>
22.	256-3	PI 527695	Kanada, Saskatchewan	PI 191320/Glenlea	<i>Lr46</i>
23.	NP 846	PI 322263	Indie, Delhi	Rio Negro/NP 760	<i>Lr46, Lr67</i>
24.	75M-505-001-001	PI 556464	Kanada, Alberta	Bluebird sib/Tobari 66/4/Toropi//Ciano 67/Inia 66 sib/3/Ciano 67/Inia 66 sib	<i>Lr34, Lr46</i>
25.	7531-AP5A	PI 552997	Kanada, Saskatchewan	Glenlea/NB313	<i>Lr34, Lr46</i>
26.	7531-AG5B	PI 552996	Kanada, Saskatchewan	Glenlea/NB313	<i>Lr34, Lr46</i>
27.	7531-AG5A	PI 552995	Kanada, Saskatchewan	Glenlea/NB313	<i>Lr34, Lr46</i>
28.	CM 46725-3P-1P-3P-2P	PI 520562	Meksyk, Ciudad de México	Zopilote sib/4/Toropi//Ciano/Noroeste 66/3/Bluebird/Ciano/5/Ciano sib/3/Penjamo 62//Gallo/Bluetit/6/Pavon sib Timgalen/Condor sib//Condor	<i>Lr34, Lr46</i>
29.	Cook	PI 442900	Australia, Queensland	–	<i>Lr34</i>
30.	PAT 7219	PI 422416	Brazylia, Rio Grande do Sul	S12/J9280–67//Nobre/Toropi	<i>Lr34, Lr46</i>
31.	HI 617	PI 422283	Indie	selection from C306	<i>Lr46, Lr67</i>
32.	Oxley	PI 386167	Australia, Queensland	Penjamo 62/4*Gabo 56//Tezanos Pintos Precoz/Nainari 60/4/2* Lerma Rojo//Norin 10/Brevor 14/3/3*Andes; sister line of Condor ; "Norin 10/Brevor 14" = Cltr 13253, Norin 10/Brevor, Sel. 14	<i>Lr34, Lr46</i>
33.	NP 718	PI 322236	Indie, Delhi	NP 52/NP 165	<i>Lr46, Lr67</i>
34.	San Martin	PI 104137	Argentyna, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	<i>Lr46</i>
35.	A99AR	PI 600923	USA, Minnesota	Glenlea/Zaragoza	<i>Lr34, Lr46</i>
36.	Klein San Martin	PI 191884	Argentyna, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	<i>Lr46</i>

Tabela 2. Ciąg dalszy.

Lp.	Genotyp	Numer identyfikacyjny	Pochodzenie	Rodowód ( <a href="https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx">https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx</a> )	Postulowane loci genów typu <i>slow rusting</i>
37.	H 51	PI 184512	Argentyna, Buenos Aires	Americano 25e/Favorito/Universal	Lr46
38.	San Martin	PI 117500	Argentyna, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	Lr46
39.	San Martin	Cltr 8437	Argentyna, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	Lr46
40.	Record	Cltr 8399	Argentyna, Buenos Aires	Americano 26N/Americano 25E	Lr46
41.	Frontana	Cltr 12470	Peru, Junin	Fronteira/Mentana	Lr34, Lr46
42.	Chris	Cltr 13751	USA, Minessota	Kenya 58/Newthatch//Thatcher/3/Frontana/Thatcher	Lr34
43.	ROD	PI 191772	Portugalia	-	Lr34
44.	Frontana 3671	PI 193932	Kolumbia, Cundinamarca	-	Lr34, Lr46
45.	Frontana LF 320	PI 193933	Kolumbia, Cundinamarca	-	Lr34, Lr46
46.	Frontana LF 321	PI193934	Kolumbia, Cundinamarca	-	Lr34, Lr46
47.	Fronthatch-1	PI 290745	Kenia, Rift Valley	Frontana/Kenya 58//Newthatch	Lr34, Lr46
48.	Fronthatch-2	PI 297014	Kenia, Rift Valley	Frontana/Kenya 58//Newthatch	Lr34, Lr46
49.	Fronthatch-3	PI 299419	Kenia, Rift Valley	Frontana/Kenya 58//Newthatch	Lr34, Lr46
50.	Toropi	PI 344200	Brazylia, Rio Grande do Sul	Petiblanco 8//Frontana 1971.37/Quaderna	Lr34, Lr46
51.	Fortaleza	PI 351779	Brazylia, Rio Grande do Sul	Colonista/Frontana	Lr34, Lr46
52.	Sparrow	PI 519725	Meksyk, Mexico City	Frontana/Mida/3/Kenya 117A//2*Copifen/4/Sonora 64//Klein Rendidor/Ciano sib/5/Lerma Rojo 64*2/Sonora 64 Vicom/Ciano sib/Siete Cerros 66/3/Kalyansona/Bluebird	Lr46
53.	Pavon F76	PI 519847	Meksyk, Mexico City	Vicom/Ciano sib/Siete Cerros 66/3/Kalyansona/Bluebird	Lr46
54.	Pavon 76	PI 520003	Meksyk, Mexico City	Vicom/Ciano sib/Siete Cerros 66/3/Kalyansona/Bluebird	Lr46
55.	Pavon	PI 520054	Meksyk, Mexico City	Vicom 71//Ciano 67 sib/Siete Cerros 66/3/Kalyansona/Bluebird	Lr46
56.	Pavon	PI 520172	Meksyk, Mexico City	Vicom 71//Ciano 67 sib/Siete Cerros 66/3/Kalyansona/Bluebird	Lr46
57.	Myna	PI 520334	Meksyk, Mexico City	Nord Desprez/Wagga Wagga//Lee/Frontana/3/Newthatch/4/Tanori 71 resel	Lr34, Lr46
58.	Junco	PI 519947	Meksyk, Mexico City	Bluebird/Gallo//Carpintero/3/Pavon sib	Lr46
59.	Tanager	PI 519878	Meksyk, Mexico City	Siskin sib/Pavon 76 sib	Lr46
60.	Parula	PI 520340	Meksyk, Mexico City	Frontana//Kenya Farmer/Newthatch/3/2*Federation//Kenya 350 ADC92/Gabo/4/Bluebird/Chanate	Lr34, Lr46, Lr68
61.	Rayon 89	PI 591786	Meksyk, Mexico City	Parula/Veery #6	Lr34, Lr46, Lr68
62.	Cumpas 88	PI 591786	Meksyk, Mexico City	Parula/Veery #6	Lr34, Lr46, Lr68
63.	Mochis 88	PI 591791	Meksyk, Mexico City	Parula/Veery #6	Lr34, Lr46, Lr68
64.	P8901-AP	PI 613175	Kanada, Saskatchewan	Laura/RL5801//5*Laura	-
65.	P8901-AQ	PI 613176	Kanada, Saskatchewan	Laura/RL5801//5*Laura	-
66.	Tlaxcala F2000	PI 619634	Meksyk, Mexico City	Zacatecas VT74/Romoga F96	Lr34, Lr46
67.	Lr34	GSTR 433	Kanada, Manitoba	Thatcher*6/Terenzio	Lr34
68.	IWA8608696	PI 624623	Iran, Kordestan	-	Lr34
69.	Anza	PI 638742	USA, California	Lerma Rojo//Norin 10/Brevor/4/Yaktana 54//Norin 10/Brevor/3/3*Andes	Lr34
70.	UC1110	PI 671999	USA, California	GSTR 274 / 4* GSTR 13501	Lr34, Lr46
71.	Kern	PI 672001	USA, California	GSTR 274 / 4* PI612142+Yr5+2NS-2AS+Lr47	Lr34
72.	TX89D6435	PI 584759	USA, Texas	Collin/Enano//TAM 200	Lr34, Lr46
73.	Purdue	Cltr 13227	USA, Indiana	Wabash//American Banner/Aniversario	Lr34, Lr46

## 4.2 Metody badawcze

### 4.2.1 Izolacja DNA przeznaczonego do analiz molekularnych

DNA wyizolowano z liści 10-dniowych siewek przy użyciu kitu Gene MATRIX Plant & Fungi DNA Purification KIT (EURx Ltd., Polska) zgodnie z załączonym protokołem. Stężenie i jakość DNA określono za pomocą spektrofotometru DeNovix (DeNovix Inc., USA). Próby rozcieńczano buforem Elution (EURx Ltd, Polska) w celu uzyskania jednolitego stężenia 50 ng/μl.

### 4.2.2 Analizy molekularne

- **amplifikacja metodą multipleks PCR w celu jednoczesnej identyfikacji *locus* genów typu *slow rusting* (Publikacje P1. i P2. wchodzące w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

W celu jednoczesnej identyfikacji *locus* genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* zastosowano trzy markery molekularne: *csLV34*, *Xwmc44* oraz *csGS*. Marker STS (ang. *Sequence Tagged Sites*) *csLV34* mapuje 0,4 cM od genu *Lr34*, a sekwencja starterów jest następująca: *csLV34F* 5'-GTT GGT TAA GAC TGG TGA TGG -3'; *csLV34R* 5'- TGC TTG CTA TTG CTG AAT AGT -3' (Lagudah i in. 2006). Jak donosi literatura, wielkość amplifikowanego produktu w genotypach odpornych wynosi 150 pz (par zasad), a w przypadku genotypów podatnych 229 pz. Sekwencja starterów markera *Xwmc44* to: *WMC44F* 5'-GGTCTTCTGGGCTTTGATCCTG-3'; *WMC44R* 5'-GTTGCTAGGGACCCGTAGTGG-3'. Produktem tego markera typu SSR (ang. *Simple Sequence Repeat*) jest prążek o wielkości 242 pz w genotypach odpornych, a *locus* markera znajduje się 0,4 cM od genu *Lr46* (Suenaga i in. 2003). Trzecim użytym do reakcji typu multipleks PCR markerem był dominujący marker STS o nazwie *csGS* i następującej sekwencji starterów: *csGSF* 5'-AAGATTGTTACAGATCCATGTCA-3'; *csGSR* 5-'GAGTATTCCGGCTCAAAAAGG-3'. Wielkość amplifikowanego produktu dla odpornych genotypów to 385 pz. Marker znajduje się w odległości 1,2 cM od *locus* genu *Lr68* (Herrera-Foessel i in. 2012).

W skład mieszaniny reakcyjnej multipleks PCR wchodziło: 12,5 μl 2× PCR TaqNovaHs PCR Master Mix (Blirt), który zawierał 2× stężony bufor reakcyjny PCR, 4 nM MgCl<sub>2</sub>, mieszaninę 1,6 nM dNTP (0,4 nM każde dNTP), 2 μl matrycy DNA (50 ng/μl), 6,5 μl wody do PCR, a także w zależności od wariantu połączonych w jednej reakcji markerów różne objętości starterów (Tab. 1.).

Tabela 3. Objętości starterów oraz mieszaniny reakcyjnej w poszczególnych wariantach multipleks PCR.

Lp.	Wariant multiplex PCR	Startery	Objętość staterów	Objętość mieszaniny reakcyjnej
1	<i>Lr34 + Lr46</i>	<i>csLV34R</i>	0,8 µl	25 µl
		<i>csLV34F</i>	0,8 µl	
		<i>WMC44R</i>	1,2 µl	
		<i>WMC44F</i>	1,2 µl	
2	<i>Lr34 + Lr46 + Lr68</i>	<i>csLV34R</i>	0,8 µl	27 µl
		<i>csLV34F</i>	0,8 µl	
		<i>WMC44R</i>	1,2 µl	
		<i>WMC44F</i>	1,2 µl	
		<i>csGSR</i>	1 µl	
		<i>csGSF</i>	1 µl	
3	<i>Lr46 + Lr68</i>	<i>WMC44R</i>	1,2 µl	25,4 µl
		<i>WMC44F</i>	1,2 µl	
		<i>csGSR</i>	1 µl	
		<i>csGSF</i>	1 µl	
4	<i>Lr34 + Lr68</i>	<i>csLV34R</i>	0,8 µl	24,6 µl
		<i>csLV34F</i>	0,8 µl	
		<i>csGSR</i>	1 µl	
		<i>csGSF</i>	1 µl	

Profil reakcji multipleks PCR zmodyfikowano w odniesieniu do standardowego protokołu i przetestowano różne temperatury przyłączania starterów. Końcowa reakcja multipleks PCR w każdym z wariantów składała się z początkowej denaturacji w 94°C przez 5 min, a następnie 40 cykli (denaturacja, 94°C przez 45 s; przyłączenie starterów, 60°C przez 30 s; elongacja, 72°C przez 1 min), następnie końcowej elongacja przez 7 min w 72°C i przechowywania w 4°C. Reakcję przeprowadzono przy użyciu termocyklera Labcycler (SensoQuest GmbH).

— **identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z genami *Lr34* oraz *Lr46* w genotypach pszenicy oraz otrzymanych z krzyżowania roślinach (Publikacja P4. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

W celu potwierdzenia obecności alleli związanych z genami typu *slow rusting* w genotypach pszenicy i otrzymanych z krzyżowania roślinach F<sub>1</sub> wykorzystano markery *csLV34* (Lagudah i in. 2005) sprzężony z genem *Lr34* oraz *Xwmc44* (Suenaga i in. 2003) i *csLV46G22* sprzężone z genem *Lr46*. Marker CAPS (ang. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), jest ściśle sprzężony z genem *Lr46* i metodyka została

udostępniona dzięki uprzejmości dr Evans'a Lagudah'a z CSIRO Plant Industry w Canberry w Australii (komunikacja osobista 2020). Objętość reakcji PCR wynosiła 20  $\mu$ l i składała się ze 1  $\mu$ l (100 nM) każdego z dwóch starterów danego markera, 10  $\mu$ l 2 $\times$  PCR TaqNovaHs PCR Master Mix (Blirt), 2  $\mu$ l matrycy DNA (50 ng/ $\mu$ l), 6  $\mu$ l wody do PCR. Profil reakcji PCR był taki sam jak w przypadku wyżej opisanego multipleks PCR, z temperaturą przyłączania starterów wynoszącą 50°C (dla markera *csLV34*), 61°C (*Xwmc44*) lub 64°C (*csLV46G22*). Produkty amplifikacji PCR markera *csLV46G22* trawiono enzymem restrykcyjnym BspEI w termocyklerze w 37°C przez godzinę (Lagudah, kom. osob. 2020, Ponce-Molina i in. 2018).

— **amplifikacja metodą PCR w celu identyfikacji markerów csGS (niepublikowane dane) oraz Xwmc44 i csLV46G22 w genotypach pszenżyta (Publikacja P3. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Z uwagi na braku genomu D w pszenżycie nie analizowano obecności genu *Lr34* znajdującego się na chromosomie 7DL. Istniało jednak przypuszczenie, że *loci* genów *Lr46* (1BL) lub *Lr68* (7BL) mogą być obecne w analizowanych odmianach pszenżyta. Materiał został przeanalizowany na obecność markerów *csGS* (*Lr68*) oraz *Xwmc44* i *csLV46G22* (*Lr46*). Sekwencje starterów omówiono wyżej. Objętość mieszaniny reakcyjnej PCR wynosiła 25  $\mu$ l i składała się z 12,5  $\mu$ l 2 $\times$  PCR TaqNovaHs PCR Master Mix (Blirt, Polska), 1  $\mu$ l każdego startera (stężenie dla każdego startera wynosiło 100  $\mu$ M), 2  $\mu$ l matrycy DNA i 6,5  $\mu$ l wody do PCR. PCR zmodyfikowano na podstawie standardowego protokołu. Temperatura przyłączania starterów wynosiła 60°C dla *csGS* oraz 61°C dla *Xwmc44* (Suenaga et al. 2003). Profil PCR modyfikowano na podstawie standardowego protokołu i końcowy profil był taki sam jak wyżej.

— **amplifikacja metodą PCR markerów molekularnych Xwmc44, Xbarc80, Xgwm130 oraz csLV46G22 w celu porównania ich przydatności do identyfikacji locus genu Lr46 (publikacja P5. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Do potwierdzenia obecności alleli związanych z *Lr46* wykorzystano następujące markery molekularne: *csLV46G22R*, *Xwmc44*, *Xgwm259* i *Xbarc80*. Marker mikrosatelitarny *Xgwm259* mapuje około 20 cM dystalnie do *Lr46* (Somers i in. 2004). Sekwencja starterów jest następująca: *Xgwm259F* 5' AGGGAAAAGACATCTTTTTTTTTC i *Xgwm259R* 3' 5' CGACCGACTTCGGGTTC 3'.

Według literatury oczekiwany produkt powinien wynosić 105 pz. *Locus* mikrosatelitarny markera *Xbarc80* mapuje 10–11 cm dystalnie do markera *Xgwm259*, a sekwencja jego starterów to: *Barc80F* 5' GCGAATTAGCATCTGCATCTGTTTGAG 3' i *Barc80R* 5' CGGTCAACCAACTACTGCACAAC 3'. Wielkość amplifikowanego produktu według Giffey i in. (2009) wynosi 100 pz, jednak według bazy MASwheat i przedstawionego tam elektroforogramu, oczekiwany produkt dla genotypu referencyjnego jest powyżej wzorca o wielkości 100 pz. Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 20 µl, składającej się z 1 µl dwóch starterów (Sigma); 12,5 µL FastGene® Optima HotStart ReadyMix (NIPPON Genetics Europe GmbH), który zawiera mieszaninę FastGene® Optima DNA Polymerase (0,2 U na µl reakcji), FastGene® Optima Buffer (1×), dNTPs (0,4 mM każdego dNTP), MgCl<sub>2</sub> (4 mM) i stabilizatory; 2 µL matrycy DNA oraz wodę do PCR. Procedurę PCR zmodyfikowano w odniesieniu do standardowego protokołu. Temperatury przyłączania starterów dla poszczególnych markerów wynosiły 61°C dla *Xwmc44* Suenaga i in. 2003), 56°C dla *Xgwm259* (Cobo i in. 2019), 50°C dla *Xbarc80* (Griffey i in. 2009) oraz 64°C dla *csLVG22R* (Lagudah, kom. os. 2020). Metodyka dotycząca profilu reakcji PCR była taka sama jak w wyżej opisywanych podpunktach.

— **rozdział elektroforetyczny oraz wizualizacja wyników (publikacje P1., P2., P3., P4., P5. wchodzące w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Produkty amplifikacji w przypadku wszystkich analiz molekularnych przygotowano poprzez dodanie 0,5 µl Midori Green Direct (NIPPON Genetics EUROPE) do każdej próbki i rozdzielono przy użyciu 2% żelu agarozowego (SIGMA) w buforze 1x TBE (BioShop) przy 100 V przez dwie i pół godziny. Do wizualizacji produktów PCR zastosowano system Molecular Imager Gel Doc™ XR UV z oprogramowaniem Biorad Bio Image™.

**4.2.3. Identyfikacja markera morfologicznego LTN (publikacja P3. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Nekrozę wierzchołków liści LTN (ang. *Leaf Tip Necrosis*), będącą markerem morfologicznym dla genów typu *slow rusting* (Singh 1992, Krattinger i in. 2009) identyfikowano w dwudziestu odmianach pszenżyta w warunkach polowych w ogrodzie doświadczalnym Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Zaobserwowano i oceniono dziesięć losowo wybranych liści flagowych danego genotypu, stosując wyniki dodatnie/ujemne (LTN+/LTN-).

#### **4.2.4. Analiza żywotności ziaren pyłku (publikacja P4. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Ocenę żywotności ziaren pyłku przeprowadzono na 33 genotypach pszenicy wyselekcjonowanych na bazie analiz molekularnych, które miały być dawcą pyłku do krzyżowań z odmianami pszenżyta. Ziarna pyłku wybarwiono 2% roztworem acetokarminu w glicerynie w proporcji 1:1. Ocenę żywotności pyłku przeprowadzono za pomocą mikroskopu Delta Genetic Pro (Delta Optical, Polska). Żywotność pyłku określono na podstawie stopnia wypełnienia ziaren cytoplazmą. Pyłek intensywnie wybarwiony (całkowicie wypełniony cytoplazmą) uznawano jako żywotny, a pyłek niewybarwiony lub częściowo wybarwiony (pusty lub częściowo wypełniony cytoplazmą) jako nieżywotny. W obrębie każdego genotypu analizowano ok. 200 ziaren pyłku. Następnie obliczano żywotność ziaren pyłku dzieląc sumę ziaren żywotnych przez całkowitą liczbę ziaren pyłku (żywotne i nieżywotne). Wyniki przedstawiono w procentach.

#### **4.2.5. Wyprowadzenie mieszańców F<sub>1</sub> poprzez kontrolowane krzyżowanie (publikacja P4. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Rośliny mieszańcowe F<sub>1</sub> uzyskano w wyniku krzyżowania pszenżyta (rodzic żeński) z pszenicą (zapyłacz) w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W tym celu wysiano 10 nasion z każdego genotypu w plastikowych doniczkach w pięciu powtórzeniach co dwa tygodnie w celu synchronizacji terminu dojrzałości znamion słupków form akceptorowych i terminu pylenia zapyłaczy (pszenicy). Ponadto, dostosowywano termin kwitnienia komponentów ojcowskich poprzez przycinanie roślin, manipulowanie fotoperiodem, obniżanie (zastosowanie komory jarowizacyjnej) lub podwyższanie temperatury otoczenia. Nie dostosowywano natomiast terminu kwitnienia roślin matecznych, w celu ograniczenia negatywnego wpływu manipulacji na stopień wykształcenia ziarniaków mieszańcowych. Kwiaty roślin matecznych (pszenżyta) wykastrowano w celu uniknięcia samozapylenia stosując metodę Tschermaka (1921), polegającą na obcinaniu górnej części kłosek (1/3 długości) wraz z ośmi, rozchylaniu plewek, usunięciu kwiatów środkowych i usunięciu pylników. Termin kastracji wybierano na podstawie oceny morfologicznej roślin matecznych. Zabieg ten wykonywano u roślin, których kłosa były jeszcze w pochwach liściowych, a liść flagowy osadzony jest 3-5 cm ponad pochwą. W tym okresie rozwoju

rośliny pylniki mają barwę zieloną lub lekko żółtą. Wykastrowane kwiaty liczone i zapyłano świeżo zebrany pyłkiem pszenicy po upływie 3-6 dni od wykonania kastracji w okresie 3 miesięcy (kwiecień – czerwiec 2019 r.). Do krzyżowań wybierano dobrze rozwinięte znamiona słupków w momencie częściowego rozwierania się plewek, wywołanego przez napęcznienie łuszczyk miodnikowych. Dojrzałe pylniki roślin ojcowskich zebrano do próbki i wymieszano, aby dokładnie pokryły się pyłkiem osypanym z pękających pylników. Dojrzałe, posiadające turgor, pokryte pyłkiem pylniki (lub ich fragmenty) wkładano do wykastrowanych kwiatów. Zapyłony kłos izolowano przy pomocy torebek papierowych opisanych datą kastracji i zapylenia oraz symbolami form rodzicielskich. Przeprowadzono ocenę efektywności krzyżowania poprzez analizę średnich uzyskanych poprzez iloraz liczby otrzymanych ziarniaków przez liczbę wszystkich zapyłonych kwiatów.

#### **4.2.6. Analizy cytogenetyczne (publikacja P4. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

##### **— wykonanie preparatów metodą trawienia enzymatycznego**

Procedurę akumulacji i utrwalania metafazy mitotycznej przeprowadzono zgodnie z metodyką Kwiatka i in. (2016). Nasiona mieszańców F<sub>1</sub> kiełkowano na wilgotnej bibule filtracyjnej na szalkach Petriego przez 3-4 dni. W celu nagromadzenia metafazy mitozy, wierzchołki korzeni zebrano i przechowywano w lodzie przez 26 godzin w ciemności. Utrwalenie wierzchołków korzeni wykonano przy użyciu mieszaniny etanolu i kwasu octowego (3:1). Utrwalone merystemy trawiono w mieszaninie maceracyjnej składającej się 0,01 M buforu cytrynianowego, zawierającego 20% pektynazy (Sigma) oraz 1% celulazy z *Aspergillus niger* (Calbiochem) i 1% celulazy „Onozuka” R-10 z *Trichoderma viride* (Hasterok i in. 2006). Końcówki korzeni umieszczano w 0,01 M buforze cytrynianowym celem wypłukania enzymu maceracyjnego, a następnie na szkiełku w 60% kwasie octowym i preparowano metalową igłą pod mikroskopem stereoskopowym Delta Optical StereoLight (Delta Optical, Polska). Tkankę wraz z kroplą 60% kwasu octowego przenoszono na szkiełko podstawowe, przykrywano szkiełkiem nakrywkowym (20 × 20 mm) i rozgniatano. Następnie sprawdzano jakość preparatu pod mikroskopem kontrastowo-fazowym (Nikon, Japonia). Szkiełko zanurzano w ciekłym azocie w celu usunięcia szkiełka nakrywkowego i przechowywano w temperaturze 4 °C.

### — izolacja genomowego DNA przeznaczonego do analiz cytogenetycznych

Całkowite genomowe DNA *Aegilops tauschii* Coss., stanowiące prekursor genomu D pszenicy ( $2n = 2x = 14$  chromosomów; DD; PI 603226; US National Plant Germplasm System) wyizolowano przy użyciu zestawu DNeasy Plant Maxi Kit 24 (Qiagen, Niemcy).

Genomowe DNA z żyta *S. cereale* L. (Imperial; PI 323382; US National Plant Germplasm System), stanowiące prekursor genomu R oraz *T. durum* Desf. ( $2n = 4x = 28$  chromosomów; AABB; Ceres; HR Smolice; Polska), stanowiące prekursor genomów A i B, zostało wyizolowane według procedury Lombard i Delourme (1997). W porcelanowym moździerzu rozdrabniano 5g tkanki traktowanej ciekłym azotem i umieszczano utartą tkankę w próbówce typu Falcon (50 ml). Następnie do materiału dodawano 30 ml 2% CTAB, czyli buforu izolacyjnego. Po wymieszaniu próby umieszczano w łaźni wodnej w temperaturze 65°C na 2h, mieszając próbki co 10 minut. Po okresie inkubacji do prób dodano 20 ml mieszaniny składającej się z chloroformu i 1-oktanolu w stosunku 24:1 i wirowano z prędkością 4500 obrotów na minutę przez 45 minut. Do nowych próbek typu Falcon pobierano górną fazę wodną i dodawano 16 ml 100% izopropanolu schłodzonego do temperatury -20°C. Następnie próby dokładnie mieszano i odstawiano na dobę do temperatury 4°C. W kolejnym etapie materiał wirowano z prędkością 3800 obrotów na minutę, zlewano supernatant i suszono próby przez 40 minut. Do prób dodawano 5 µl RNazy oraz 10 ml TE i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C. Następnie do prób dodawano 5 ml 5M NaCl i mieszano, po czym ponownie dodawano 10 ml 100% izopropanolu (-20°C). Po raz kolejny materiał mieszano i odstawiano na dobę (4°C). Po okresie inkubacji próby wirowano przez 10 minut i zlewano supernatant, a otrzymany osad zawieszono w 5 ml 70% izopropanolu (-20°C). Próby ponownie wirowano przez 10 minut z prędkością 3800 obr./min. z chłodzeniem (4°C). Po zlaniu supernatantu materiał suszono przez 15 minut. Do prób dodawano 100 µl ddH<sub>2</sub>O i poddawano inkubacji w temperaturze 37°C przez 15 minut.

### — przygotowanie sond molekularnych oraz blokera

Genomowe DNA *A. tauschii* Coss. zostało wyznakowane przez nick translację z użyciem fluorochromu Atto-488 (Atto-488NT kit; Jena Bioscience, Niemcy). Całkowite genomowe DNA żyta znakowano w ten sam sposób fluorochromem Atto-550. W skład mieszaniny o objętości 20 µl wchodziło: 6 µl znakowanej sekwencji genomowego DNA; 2 µl ddH<sub>2</sub>O; 2 µl 10 × NT labeling buffer; 2 µl Atto-488 lub Atto-

550 labeling mix; 2 µl mieszaniny enzymów. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze w warunkach: niktranslacja w 15°C przez 95 minut i zatrzymanie reakcji w temperaturze 60°C przez 15 minut.

W celu przygotowania blokera genomów A i B wykorzystano 230 µl DNA *T. durum* Desf. o DNA, które umieszczono w probówce typu Eppendorf (2 ml). Dodano 20 µl 5M NaCl i gotowano przez 45 minut w celu pocięcia DNA na fragmenty ok. 300-500 pz). Następnie próbki umieszczano w lodzie na 5 minut. Po okresie inkubacji do prób dodawano 3M NaAC w objętości 1/10 roztworu, czyli 25 µl i następnie 750 µl 100% EtOH (2x objętość roztworu). Próby umieszczano na noc w temperaturze -20°C. Następnego dnia próby wirowano przez 30 minut przy 14 000 rpm w temperaturze 4°C. Po wirowaniu zlewano supernatant i przemywano 50 µl 70% EtOH (-20°C), wkrapiając po ściankach probówki. Próby następnie ponownie wirowano przez 5 minut przy 14 000 rpm w temperaturze 4°C. Po wirowaniu odsączano EtOH i suszono przez 15 minut w cieplarni w temperaturze 37°C. Uzyskany materiał rozpuszczano w 40 µl TE i przechowywano przez dobę w temperaturze 4°C, a następnie w -20°C. Bloker stosowano w stosunku 1 : 50 (sonda/bloker).

#### — genomowa hybrydyzacja *in situ* GISH

Chromosomy roślin mieszańcowych F<sub>1</sub> analizowano za pomocą metody GISH. Celem analizy było obliczenie efektywności hybrydyzacji krzyżowej CE (ang. *Crossing Efficiency*). Analizę GISH wykonano według Kwiatka i in. (2016).

Przed hybrydyzacją przygotowane preparaty traktowano 170 µl RNAzy (SIGMA, 100 mg/ml w 2×SSC). Na preparaty nałożono folię i inkubowano w wilgotnym pojemniku przez godzinę w cieplarni w 37°C. Następnie preparaty płukano dwukrotnie w 2×SSC przez 5 minut, w trakcie płukania zdejmowano folię. Preparaty płukano następnie w paraformaldehydzie w 1×PBS przez 15 minut i ponownie płukano dwukrotnie w 2×SSC przez 5 minut. Kolejnym etapem była dehydratacja w szeregu alkoholowym (etanol 70%, 90% i 100%) przez 3 minuty. Preparaty następnie suszono. W skład mieszaniny hybrydyzacyjnej o objętości 38 µl wchodziło: wyznakowane genomowe DNA (100 ng), formamid (20 µl), siarczan dekstranu (8 µl), 20 × SSC (4µl), SDS (detergent, 2 µl), bloker DNA z *T. durum* (5000 ng) woda destylowana. Mieszaninę hybrydyzacyjną denaturowano przez 10 minut w 75°C, a następnie stabilizowano na lodzie. Uzyskaną mieszaninę nakładano na preparaty, przykrywano folią i poddawano

denaturacji w 70 °C przez 4 minut i 30 sekund. Preparaty następnie umieszczano w wilgotnym pojemniku i inkubowano w temperaturze 37°C w cieplarni przez dobę.

Po hybrydyzacji preparaty poddawano płukaniu w temperaturze 42°C w 2 × SSC przez 5 minut, dwukrotnie w 0,1 × SSC przez 5 minut i w 2 × SSC przez 5 minut. Następnie w celu immunodetekcji na preparaty nakładano mieszaninę antyciał AntiDig (Roche) z blocking reagent i inkubowano przez 1 godzinę w 37 °C. Preparaty płukano w 4 × SSC z Tween 20 przez 8 minut, a następnie w 2 × SSC przez 1 minutę. Preparaty poddawano następnie dehydratacji w szeregu alkoholowym (1 minuta). Ostatnim etapem było zamykanie preparatów przy użyciu DAPI w Vectashield w objętości 10 µl na preparat.

#### — analiza mikroskopowa i dokumentacja wyników

Preparaty analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Axio Observer 7 (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Obróbkę obrazu wykonano przy użyciu oprogramowania ZEN Pro (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Każdy genotyp oceniano poprzez analizę zestawów chromosomów u 10 jąder komórkowych.

## 5. Wyniki i dyskusja

### 5.1 Wyniki

#### 5.1.1 Opracowanie metody multipleks PCR dla genów typu *slow rusting* (publikacje P1 i P2. wchodzące w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)

Do jednoczesnej identyfikacji genów *Lr34*, *Lr46* oraz *Lr68* wykorzystano markery molekularne *csLV34*, *Xwmc44* i *csGS*. W badaniach podjęto próbę opracowania łącznie 4 wariantów reakcji do jednoczesnej identyfikacji: *Lr34 + Lr46*, *Lr34 + Lr46 + Lr68*, *Lr46 + Lr68*, *Lr34 + Lr68*. Produkty amplifikacji markera *csLV34* o wielkości 145 pz zaobserwowano w genotypach: ‘Lr34’, ‘NP846’, ‘TX89D643’5, ‘Parula ‘S’” i ‘Mochis’. W pozostałych odmianach ‘Pavon F7’6, ‘Rayon 8’9, ‘NP818’ i ‘Kern’ otrzymano produkt o wielkości 229 pz, wskazujący na brak genu *Lr34*. W wyniku amplifikacji markera *Xwmc44* sprzężonego z genem *Lr46* otrzymano produkty specyficzne o wielkości 242 pz w genotypach ‘Lr34’, ‘NP846’, ‘TX89D6435’, ‘Pavon F76’ i ‘Mochis 88’. Produkt markera *csGS* o wielkości 385 pz zidentyfikowano w genotypach: ‘Parula’ i ‘NP846’. Akumulację genów *Lr34* i *Lr46*, a tym samym obecność obu specyficznych dla markerów produktów, uzyskano w genotypach ‘TX89D6435’, ‘Lr34’ oraz ‘NP846’. Jednoczesną obecność genów *Lr46* i *Lr68* wykazano w genotypie ‘NP846’. Produkty dla genów *Lr34* i *Lr68* wystąpiły jednocześnie w genotypach: ‘Parula’ i ‘NP846’. Obecność wszystkich analizowanych markerów zidentyfikowano przy użyciu reakcji multipleks PCR w genotypie ‘NP846’.

#### 5.1.2 Molekularna identyfikacja genów typu *slow rusting* w pszenicy

- identyfikacja genu *Lr34* w 33 genotypach pszenicy zwyczajnej przy użyciu pojedynczej reakcji PCR (publikacja P4. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)

Genotypy pszenicy przeznaczone do wyprowadzenia roślin mieszańcowych pszenica – pszenżyto (41-73 Tab. 1) analizowano na obecność genów *Lr34* i *Lr46*. W tym celu wykorzystano markery molekularne *csLV34* (dla genu *Lr34*) oraz *Xwmc44* i *csLV46G22* (*Lr46*). W wyniku reakcji PCR z użyciem markera *csLV34* uzyskano produkty amplifikacji o wielkości 160 pz w kontroli pozytywnej (genotyp ‘Lr34’) oraz 24 genotypach pszenicy. Produkt PCR o wielkości 240 pz zidentyfikowano dla ośmiu genotypów pszenicy, co wskazuje na obecność allelu charakteryzującego podatność na infekcję. Analiza genotypów z wykorzystaniem markera *Xgwm44* dała dwa produkty:

260 i 280 pz w kontroli pozytywnej (genotyp ‘Pavon 76F’) i 17 genotypów pszenicy. Pozostałe 11 genotypów pszenicy charakteryzowało się produktami o wielkości 200 i 230 pz. W obrębie dwóch genotypów pszenicy zaobserwowano produkty o wielkości 240 i 270 pz. W genotypie ‘Toropi’ zidentyfikowano produkty 235 i 265 pz. Drugi marker *csLV46G22*, ściśle sprzężony z genem *Lr46* (Lagudah, kom. os. 2020), dał inne wyniki w porównaniu z *Xgwm44*. Allel odporny został zidentyfikowany w 16 genotypach pszenicy. Markery *Xgwm44* i *csLV46G22* zidentyfikowano jednocześnie dla 21 z 33 genotypów pszenicy. Dziesięć genotypów pszenicy zawierało wszystkie trzy markery dla analizowanych genów.

— **jednoczesna identyfikacja genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* w 40 genotypach pszenicy zwyczajnej (publikacja P2. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Wariant reakcji PCR pozwalający na jednoczesną identyfikację genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* wykorzystano do identyfikacji genów w genotypach pszenicy, które według doniesień literatury lub analizy rodowodów genotypów mogą wskazywać na obecność tych genów (1-40, Tab 1.). W wyniku analizy gen *Lr34* zidentyfikowano w 13 z 40 badanych odmian, gen *Lr46* w 17 odmianach, a gen *Lr68* w 12 odmianach. W czterech odmianach zidentyfikowano wszystkie trzy testowane geny (‘Glenlea’, ‘A99AR’, ‘NP846’, ‘363-11’), a w ośmiu odmianach wykryto obecność dwóch testowanych genów w jednej odmianie. W 14 odmianach nie zidentyfikowano żadnego z genów typu *slow rusting*.

**5.1.3 Molekularna identyfikacja genów typu *slow rusting* w mieszańcach pszenżyta × pszenicy F1 (publikacja P4. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Do badania obecności *loci* genów *Lr34* i *Lr46* w roślinach mieszańcowych F<sub>1</sub> wykorzystano zestaw trzech markerów molekularnych *csLV34*, *Xwmc44* oraz *csLV46G22*. Reakcje PCR dla markera *csLV34* dały trzy typy produktów: 160 pz pochodzący z odpornej pszenicy (chromosom 7D) oraz 250 i 300 bp z genomu R pszenżyta. Ocena elektroforogramów uzyskanych po rozdziale produktów PCR amplifikowanych przy użyciu markera *Xgwm44* była trudniejsza. Trzy produkty zostały zamplifikowane przy użyciu DNA wyizolowanego z roślin mieszańcowych F<sub>1</sub>: 150, 200 i 240 pz, które były charakterystyczne zarówno dla chromosomu 1B pochodzącego z odpornych genotypów pszenicy, jak i chromosomu 1B z pszenżyta. Odporny wariant

allelu markera *csLV46G22* zidentyfikowano w roślinach uzyskanych z czterech kombinacji krzyżowania. Co więcej, te kombinacje ('Fredro' × 'Frontana LF 321', 'Twingo' × 'Frontana LF 321', 'Twingo' × 'Frontana 3671' i 'Twingo' × 'Sparrow') zawierały wszystkie trzy odporne markery alleli powiązane z genami typu *slow rusting* *Lr34* i *Lr46*.

#### **5.1.4 Molekularna identyfikacja genów *Lr68* (niepublikowane dane) oraz *Lr46* w odmianach pszenżyta (publikacja P3. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Analizy molekularne z wykorzystaniem markera *csGS* nie potwierdziły obecności *locus* genu *Lr68* w żadnej analizowanej odmianie pszenżyta. W celu identyfikacji genu *Lr46* w 20 polskich odmianach pszenżyta wykorzystano dwa pszeniczne markery molekularne *Xwmc44* oraz *csLV46G22*. Wykazano, że wyniki identyfikacji genu przy użyciu markera *Xwmc44* nie są takie same jak wyniki analiz z wykorzystaniem bliżej sprzężonego markera *csLV46G22*. Marker *Xwmc44* zidentyfikowano w 6 odmianach ozimych pszenżyta: 'Dolindo', 'Fredro', 'Orinoko', 'Pizarro', 'Porto' i 'Trismart'. Natomiast, produkt specyficzny markera *csLV46G22* zaobserwowano w trzech innych odmianach pszenżyta: 'Kasyno' (odmiana ozima), 'Mamut' i 'Puzon' (odmiany jare).

#### **5.1.5 Porównanie użyteczności diagnostycznej markerów molekularnych do identyfikacji *locus* genu *Lr46* w genotypach pszenicy (publikacja P3. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Celem analizy było ukazanie różnic pomiędzy wynikami identyfikacji *locus* *Lr46* przy użyciu czterech markerów (*Xwmc44*, *Xgwm259*, *Xbarc80* i *csLV34G22*) zlokalizowanych w różnych odległościach od *locus* genu. Produkt specyficzny dla markera *Xwmc44* o wielkości 242 pz był obecny w 38 z 73 testowanych genotypów. W przypadku analiz z wykorzystaniem markerów *Xgwm259* oraz *Xbarc80* uzyskano dużą liczbę niespecyficznych produktów o podobnej wielkości do amplifikowanego specyficznego produktu, przez co trudno było ocenić standardową elektroforezę z użyciem 2% żelu agarozowego. Opierając się na wielokrotnych powtórzeniach identyfikacji *locus* *Lr46* przy użyciu zarówno markera *Xgwm259*, jak i *Xbarc80*, oceniono obecność markerów związanych z allelem odporności. Zidentyfikowano produkt specyficzny o wielkości 105 pz (Sommers i in. 2003) dla markera *Xgwm259* w 52 z 73 analizowanych genotypów, podczas gdy produkt markera *Xbarc80* pojawił się

w 11 genotypach. Ostatnim analizowanym markerem był *csLV46G22*. W wyniku przeprowadzonych analiz *locus* markera zidentyfikowano w 60 z 73 analizowanych genotypów.

#### **5.1.6 Identyfikacja markera morfologicznego LTN (publikacja P3. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Wyniki analiz molekularnych identyfikacji genu *Lr46* w odmianach pszenżyta porównano z obserwacją obecności nekrozy wierzchołków liści (LTN). Cechę LTN zaobserwowano tylko u pięciu odmian ozimych (Belcanto, Dolindo, Kasyno, Pizzarro i Porto).



Fotografia 1. Objawy nekrozy wierzchołków na liściu flagowym odmiany Kasyno (na górze) w porównaniu z liściem flagowym odmiany Grenado (na dole) (**publikacja P3. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej**)

#### **5.1.7 Krzyżowanie (publikacja P4. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Przeprowadzono krzyżowanie pszenżyta ozimego z pszenicą posiadającą geny typu *slow rusting* w celu oceny efektywności krzyżowania CE (ang. *Crossing Efficiency*) przez kombinację krzyżowania pszenżyta z pszenicą. Łącznie zapylono 5094 kwiaty pszenżyta ziarnami pyłku pszenicy. Ocena efektywności krzyżowania wykazała, że pszenżyto odmiany 'Twingo' wyprodukowało więcej nasion mieszańcowych (32 nasiona) niż odmiany 'Fredro' (2 nasiona). Nasiona mieszańcowe uzyskano w zaledwie

siedmiu kombinacjach krzyżowania. Całkowite CE dla obydwu odmian pszenżyta było niskie i wynosiło 0,1% dla kombinacji ‘Twingo’ × pszenica i 0,001% dla kombinacji ‘Fredro’ × pszenica. Kombinacja ‘Twingo’ × ‘Frontana 3671’ była najbardziej efektywna i dała 12 nasion (CE 21,43%).

#### **5.1.8 Analiza statystyczna danych PDO dotyczących odporności analizowanych odmian pszenżyta**

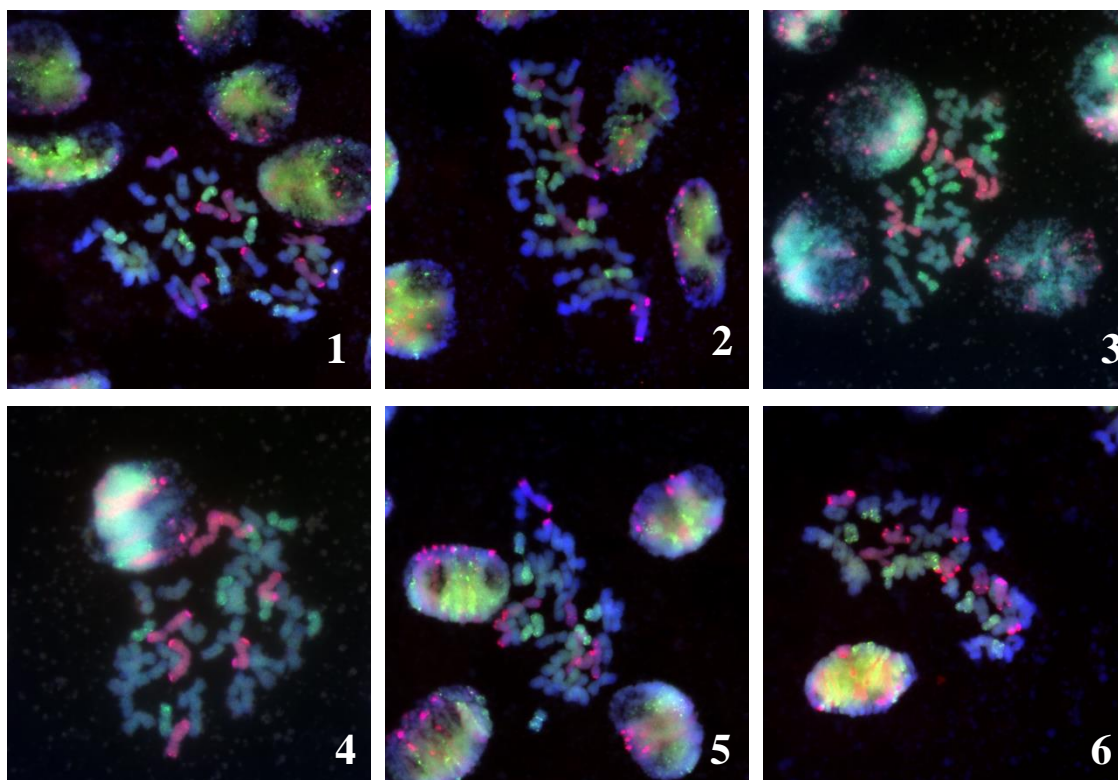
Średnia wartość oceny odporności na rdzę brunatną wahała się od 6,8 do 8,6 dla odmian ozimych oraz 7,5–8,4 dla odmian jarych analizowanych w tym badaniu. Jednocześnie średnia ocena odporności na rdzę żółtą wahała się od 6,5 do 8,8 dla odmian ozimych i 8,1–8,7 dla odmian jarych. Średnie oceny odporności na *P. triticina* Erikss. i *P. striiformis* West. dla odmian ozimych niosących allel *Xwmc44res* były niższe niż średnie oceny dla odmian *Xwmc44sus*.

#### **5.1.9 Analiza żywotności ziaren pyłku (publikacja P4. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Żywotność ziaren pyłku genotypów pszenicy przeznaczonych do krzyżowań była wysoka i wahała się od 88,29 do 99,36%. Najwyższą żywotność pyłku zaobserwowano dla genotypu ‘Chris’. Najniższą żywotność ziaren pyłku zanotowano w genotypie ‘Junco’. Średnia żywotność pyłku dla wszystkich 33 gatunków pszenicy użytych w krzyżowaniach wynosi 90,45%. Wysoką żywotność ziaren pyłku (powyżej 90%) wykazały genotypy: ‘Frontana’, ‘Frontana 3671’, ‘Toropi’, ‘Sparrow’, ‘Myna’, ‘Tanager’, ‘Rayon 89’, ‘Mochis 88’, ‘P8901-AQ’, ‘Anza’, ‘TX89D6435’ i ‘Purdue’.

#### **5.1.10 Analizy cytogenetyczne (publikacja P4. wchodząca w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej)**

Analizę GISH przeprowadzono dla wszystkich 34 nasion F1 w celu potwierdzenia ich mieszańcowego pochodzenia. Kariotyp roślin mieszańcowych pszenżyto × pszenica (F<sub>1</sub>) był zgodny z teoretycznym składem chromosomowym dla tego typu kombinacji i zawierał 14 chromosomów (7 par) genomu A, taką samą liczbę chromosomów genomu B, 7 chromosomów (monosomicznych) genomu D, które pochodziły z pszenicy rodzicielskiej i 7 (monosomicznych) chromosomów genomu R, pochodzących od rodzicielskiego pszenżyta.



Fotografia 2. Genomowa hybrydyzacja *in situ* przeprowadzona na chromosomach mitotycznych roślin pochodzących z krzyżowej hybrydyzacji pszenżyta i pszenicy: chromosomy genomu D - Atto-488, zielony; chromosomy genomu R - Atto-550, czerwony ( 1, 2 – 'Twingo' × 'TX89D643', 3 – 'Twingo' × 'Mochis', 4 – 'Twingo' × 'Rayon 89', 5, 6 – 'Twingo' × 'Frontana 3671',

## 5.2 Dyskusja

Transfer genów za pośrednictwem kontrolowanych krzyżowań pokrewnych gatunków do konwencjonalnych odmian pszenżyta jest na razie jedyną możliwością uzyskania translokacji w prowadzonych na dużą skalę komercyjnych programach hodowlanych w Unii Europejskiej. Do tej pory zidentyfikowano i zastosowano w hodowli roślin wiele genów nadających odporność na choroby zbóż, ale wiele z nich straciło swoją skuteczność z powodu pojawienia się i adaptacji (przystosowania) nowych ras patogenów (Singh i in. 2000). Niestety, wprowadzenie nowych genów odporności skutecznych przeciwko obecnie występującym rasom patogenów zajmuje kilka lat, głównie ze względu na długi proces związany z wyprowadzaniem linii homozygotycznych (Alemu 2019). Dlatego obecnie większość hodowców skłania się ku wykorzystaniu genów zapewniających trwałą tolerancję na wiele ras różnych patogenów, co z połączeniem z genami rasowo-specyficznymi może pomóc zminimalizować ilość stosowanych fungicydów w uprawach zbóż.

W pracy podjęto skuteczną próbę opracowania warunków multiplex PCR, w celu zminimalizowania kosztów, czasu i nakładu pracy przy wyborze materiałów wyjściowych do krzyżowań. Opracowano łącznie 4 różne warianty multipleks PCR, pozwalające na jednoczesną identyfikację genów *Lr34 + Lr46*, *Lr46 + Lr68*, *Lr34 + Lr68* oraz *Lr34 + Lr46 + Lr68*. Wyniki pokazały, że produkt amplifikacji *locus csLV34res* (warunkującego odporność) wynosił około 145 pz, w przeciwieństwie do wyników Lagudaha i in. (2006), którzy podali wielkość 150 pz. Różnice w wielkości produktów mogą wynikać z rodzaju zastosowanego wzorca wielkości DNA. Lagudah i in. (2006) zastosowali wzorzec markerowy o wielkości 100 pz. W przedłożonej pracy zastosowano dokładniejszy wzorzec DNA o wielkości 50 pz, który wykazał, że produkt markera *csLV34* jest mniejszy niż 150 pz.

Optymalizacja metody multipleks PCR opierała się o dobór odpowiedniej objętości startera dla wszystkich genów w obrębie każdego wariantu i dostosowaniu odpowiedniej temperatury przyłączania starterów w celu uzyskania jednorodnie intensywnych prążków na 2% żelu agarozowym. Z tego względu, w każdej próbie użyto mniejszej objętości startera *csLV34* niż w pozostałych, ponieważ starter wykazywał bardzo intensywne produkty po rozdziale elektroforetycznym. Ponadto, objętość startera *Xwmc44* została

zwiększona w każdym wariancie, ponieważ produkt markera po rozdiale elektroforetycznym był niewystarczająco wyraźny.

Opracowane warunki multipleks PCR umożliwiły identyfikację genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* w materiałach pszenicy, które według doniesień literatury i analizy rodowodów mogą posiadać geny typu *slow rust*. Odmiana ‘Glenlea’ została zarejestrowana w 1972 r. i była pierwszą odmianą niosącą gen *Lr34* w zachodniej Kanadzie (Evans i in. 1972, Dyck i in. 1985). W badaniach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wszystkie trzy geny typu *slow rusting* (*Lr34* + *Lr46* + *Lr68*) zostały zidentyfikowane w tym genotypie. Ponadto, w niektórych genotypach posiadającym w swoim rodowodzie genotyp ‘Glenlea’ również zidentyfikowano różne kombinacje alleliczne wariantów warunkujących odporność: ‘A99AR’ i ‘363-11’ (*Lr34*+*L46*+*Lr68*), ‘7531-V3D’ (*Lr34*+*Lr68*), ‘7531-AG5A’ (*Lr34*+*Lr46*), ‘7536K-51A4’ (*Lr34*), ‘P8802-C1\*3A2C16’, ‘P8802-C1\*3A2A2U’ i ‘7531-AP5A’ (*Lr46*). ‘Lerma Rojo’ to jedna z półkarłowatych odmian opracowanych w CIMMYT na cele programów rozwoju rolnictwa prowadzonych w latach 60. XX w. przez agencję ONZ określanych mianem tzw. Zielonej Rewolucji. Opracowanie odmiany przyczyniło się do przełomowego wzrostu plonów w Indiach, Pakistanie, Turcji i innych częściach świata. Odmiana ‘Lerma Rojo’ charakteryzuje się długą żywotnością ze względu na odporność na patogeny (Borlaug 1968). W pracy zidentyfikowano dwa geny typu *slow rusting* w odmianie ‘Lerma Rojo’: *Lr34* i *Lr46*. W genotypie ‘Oxley’, którego genealogia obejmuje ‘Lerma Rojo’, również zidentyfikowano *locus* genów *Lr34* i *Lr46*. Kolejnym genotypem, w którym zidentyfikowano *locus* wszystkich analizowanych genów jest indyjska odmiana ‘NP 846’, znana również jako ‘New Pusa 846’. Do tej pory dane literaturowe donosiły, że ‘NP 846’ posiada allel *Lr34res* (Kaur i in. 2000, Kolmer i in. 2008). Altieri i in. (2008) określili liczbę i charakterystykę genów odporności na rdzę liści pszenicy obecnych w argentyńskiej odmianie ‘Buck Manantial’, która wykazuje trwałą odporność na rdzę brunatną. Użyli również ściśle powiązanego markera *csLV34* z *Lr34*, aby wykryć obecność tego genu odporności w ‘Buck Manantial’, zgodnie z hipotezą Dycka (1989). W wyniku przeprowadzonych przez autorów badań nie udało się potwierdzić obecności genu w odmianie ‘Buck Manantial’ na podstawie allelu wykrytego przez ten marker molekularny. W ramach badań wchodzących w skład pracy doktorskiej również nie zidentyfikowano żadnego genu w odmianie ‘Buck Manantial’, chociaż także według

innych źródeł odmiana ta posiada gen *Lr34* (McIntosh i in. 1995, McIntosh i in. 2008, McCallum 2012).

Literatura podaje wiele przykładów udanego wykorzystania metody multipleks PCR do identyfikacji genów odporności specyficznych dla rasy. Leśniowska-Nowak i in. (2013) opracowali metodę multipleks PCR w celu zidentyfikowania dwóch genów odporności na rdzę brunatną: *Lr9* i *Lr19*. Inne główne geny odporności na *P. triticina* Erikss. *Lr29* i *Lr37* zostały zidentyfikowane w jednej reakcji PCR przez Sumikova i Hanzalova (2010). Gogoł i in. (2015) podjęli udaną próbę wykorzystania metody multipleks PCR do jednoczesnej identyfikacji genów odporności na dwie różne choroby: *Lr21* (rdza brunatna) i *Pm4b* (mączniak prawdziwy). Tomkowiak i in. (2019) zidentyfikowali geny *Pm2*, *Pm3a*, *Pm4b* i *Pm6* w genotypach pszenicy, a także opracowali warunki reakcji multipleks PCR do jednoczesnej identyfikacji genów *Pm2* i *Pm4b*.

Ponadto, istnieje wiele przykładów wykorzystania multipleks PCR do identyfikacji innych genów pszenicy. Zhang i in. (2008) opracowali dwa multipleksowe testy PCR mające na celu poprawę jakości wypieku chleba i makaronu w pszenicy zwyczajnej, które zostały zweryfikowane przy użyciu 70 odmian i linii z chińskich regionów pszenicy ozimej. Wang i in. (2010) zidentyfikowali geny w *locus Glu-A3*, opracowali markery STS i opracowali multipleks PCR z markerami STS dla *alleli Glu-A3*. System multipleks PCR został zwalidowany na 141 odmianach pszenicy CIMMYT i liniach z różnymi allelami *Glu-A3*, potwierdzając, że mogą one być skutecznie wykorzystywane w hodowli wspomaganą markerami. Moczulski i Salmanowicz (2003) zastosowali metodę multipleks PCR do identyfikacji alleli *loci Glu-1* kompleksu gluteninowego HMW (*Glu-A1*, *Glu-B1* i *Glu-D1*) w genotypach pszenicy zwyczajnej. W porównaniu z konwencjonalnymi technikami PCR, które pozwalają na identyfikację pojedynczych genów odporności, multipleks PCR jest metodą, która umożliwia jednoczesne wykrywanie wielu genów odporności w jednej reakcji z wysoką czułością i swoistością. W konsekwencji, multipleks PCR jest bardziej odpowiednią i mniej czasochłonną metodą wykrywania kilku genów odporności (Ballabio i in. 1990). Ponadto, metoda multipleksowego PCR stanowi podstawę dla przyszłego rozwoju ilościowej i bardziej czulej metody PCR z wykorzystaniem technologii PCR w czasie rzeczywistym (Côté i in. 2004). Metoda multipleks PCR jest wygodnym narzędziem do selekcji materiałów do hodowli roślin. Przedstawiona metoda może być z powodzeniem

wykorzystana do jednoczesnej identyfikacji genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr68*. Ponadto dodatkowe warianty metody pozwalające na jednoczesną identyfikację genów *Lr34* i *Lr46*, *Lr46* i *Lr68* oraz genów *Lr34* i *Lr68* mogą być również pomocnym narzędziem w hodowli roślin. Odmiany zawierające geny typu *slow rusting*, zidentyfikowane w analizie przy użyciu metody multipleks PCR, mogą dostarczyć genów odporności APR do hodowli pszenicy lub innych gatunków zbóż.

W pracy założono ponadto, że gen *Lr46* zlokalizowany na chromosomach 1B może być obecny w niektórych odmianach pszenżyta, biorąc pod uwagę różne ścieżki wyprowadzania pierwotnego i wtórnego pszenżyta. Analizowano dwadzieścia polskich odmian pszenżyta w celu identyfikacji *locus Lr46* przy użyciu dwóch najbliższych markerów molekularnych i wykazano, że marker mikrosatelitarny *Xwmc44* nie pokrywa się z analizami markera CAPS *csLV46G22*. *Locus* mikrosatelitarny markera *Xwmc44* znajduje się 5,6 cM proksymalnie od domniemanego QTL dla *Lr46* (Suenaga i in. 2003). Dla porównania, ostatnie mapy dla *Lr46* z Pavon 76 umieszczają *locus* genu pomiędzy *TraesCS1B01G453900* oraz *csLV46G22* (Lagudah, kom. osob.). Marker *Xwmc44* zidentyfikowano w 6 odmianach ozimych: ‘Dolindo’, ‘Fredro’, ‘Orinoko’, ‘Pizarro’, ‘Porto’ i ‘Trismart’. Wyniki dla allelu odporności *Xwmc44* nie pokrywały się z markerem CAPS *csLV46G22res* ściśle związanym z *Lr46*. Specyficzny produkt markera *csLV46G22* zaobserwowano w trzech innych odmianach pszenżyta: ‘Kasyno’ (odmiana ozima), ‘Mamut’ i ‘Puzon’ (odmiany jare).

Biorąc pod uwagę ekspresję genu *Lr46*, porównano wyniki analizy markerów molekularnych z oceną polową porażenia *P. triticina* Erikss. i *P. striiformis* West. powodujące odpowiednio rdze brunatną i żółtą, w odmianach pszenżytach badanych w ramach programu porejestrowego doświadczalnictwa odmianowego (PDO 2016–2018; Drażkiewicz 2019, Najewski 2019). ‘Belcanto’ i ‘Kasyno’ były najbardziej odporne na infekcje zarówno *P. triticina* Erikss., jak i *P. striiformis* West. Biorąc pod uwagę drugi marker, średnie oceny odporności na *P. triticina* Erikss. i *P. striiformis* West. dla odmian *csLV46G22res* były wyższe niż średnie oceny dla odmian *csLV46G22sus* z jednym wyjątkiem. Wyniki dotyczące porażenia rdzą żółtą były podobne w porównaniu z odmianami jarymi niosącymi *csLV46G22res* i *csLV46G22sus*. Wyniki zestawiono również z analizą nekrozy wierzchołków liści (LTN). Cechę LTN zaobserwowano tylko u pięciu odmian ozimych (‘Belcanto’, ‘Dolindo’, ‘Kasyno’, ‘Pizarro’ i ‘Porto’). W porównaniu z odmianami LTN– wyniki odporności na rdzę brunatną i rdzę żółtą były

wyższe dla odmian LTN+. Wśród ozimych odmian LTN+, 'Dolindo', 'Pizzaro' i 'Porto' nosiły allel *Xwmc44res*, podczas gdy w odmianie 'Kasyno' zidentyfikowano allel *csLV46G22res*.

Podsumowując wyniki markerów molekularnych w porównaniu z 3 letnią oceną polową porażenia rdzą brunatną i rdzy żółtej oraz identyfikacją markera LTN, można przypuszczać, że odmiana 'Kasyno' ma gen *Lr46*. Co więcej w oparciu o wysoki poziom odporności na rdzę brunatną i żółtą oraz obecność cechy LTN można przypuszczać że odmiana 'Belcanto' również posiada geny typu *slow rusting*. Wymaga to jednak dodatkowych badań markerów molekularnych. Ponadto, odmiany te mogą służyć jako materiał wyjściowy do piramidyzowania genów typu *slow rusting* w genotypach pszenżyta.

Rośliny mieszańcowe pszenica × pszenżyto uzyskane poprzez kontrolowane krzyżowanie dwóch odmian pszenżyta z 33 genotypami pszenicy, która według doniesień literaturowych była źródłem różnych genów typu *slow rusting* zostały przeanalizowane na obecność *locus* genów *Lr34* i *Lr46* przy użyciu markerów molekularnych opracowanych do identyfikacji genów w pszenicy. W wyniku analiz dla podatnych roślin mieszańcowych amplifikowano różne prążki o wielkości 250 i 350 pz. Można więc przypuszczać, że ortolog *csLV34* jest obecny na chromosomach genomu R (prawdopodobnie na chromosomie 7R), ale daje różne amplikony, które są przydatne do identyfikacji *locus Lr34* u mieszańców pszenżyta z pszenicą. Marker *Xwmc44* dał cztery różne produkty amplifikacji dla roślin mieszańcowych F<sub>1</sub>. Różnice wielkości między amplikonami były trudne do oceny za pomocą standardowej elektroforezy z użyciem 2% żelu agarozowego. Dla porównania zastosowano marker CAPS *csLV46G22*, który ponieważ jest kodominujący wydaje się być użyteczny do genotypowania na roślinach F<sub>1</sub>. Ponadto, wykazano słabą zdolność diagnostyczną markera *Xwmc44* używanego do identyfikacji genu *Lr46*. Co więcej, dla 12 z 33 analiz genotypów pszenicy wyniki między markerami *Xgwm44* i *csLV46G22* różniły się.

Analiza GISH potwierdziła obecność siedmiu monosomicznych chromosomów genomu D pochodzącego z pszenicy w większości nasion uzyskanych z krzyżowania pszenżyta i pszenicy w tym badaniu. Metoda ta ma bezpośrednie zastosowanie w badaniach podstawowych, a także w wykrywaniu wprowadzonej chromatyny (Schwarzacher i in. 1992, Kwiatek i in. 2019). Wiele doniesień wykazało przydatność

metod cytogenetycznych do określenia introgresji chromosomów genomu D pszenicy lub *Ae. tauschii* Coss. w obrębie genomu pszenżyta (Łukaszewski i in. 1987, Salmanowicz i in. 2013, Kwiatek i in. 2015). Ponieważ *locus Lr34* znajduje się na chromosomie 7D pszenicy, GISH był dodatkową metodą wykazania mieszańcowego pochodzenia roślin F1 i potwierdzenia przeniesienia chromosomów genomu D z *locus Lr34* do roślin hybrydowych. Niestety, identyfikacja *locus Lr46* nie może być poparta przez GISH, ponieważ ta metoda nie ma zastosowania do rozróżniania tożsamyh chromosomów genomu B mieszańców F1, które pochodziły zarówno z form rodzicielskich pszenicy, jak i pszenżyta.

Połączenie MAS i GISH umożliwiło wyselekcjonowanie roślin hybrydowych pszenżyto × pszenica z *loci* genów typu *slow rust*. Rośliny mieszańcowe uzyskane z kombinacji ‘Twingo’ × ‘Frontana 3671’ wydają się być najbardziej obiecującymi formami, biorąc pod uwagę akumulację alleli warunkujących odporność zarówno dla genu *Lr34*, jak i *Lr46*. Te kombinacje mogą być wykorzystane w celu rozmnażania nasion, dalszego krzyżowania wstecznego i oceny odporności. Wymagana w badaniach jest poprawa krzyżowalności odmian pszenżyta z wybranymi zapylaczami pszenicy. Co więcej, niezbędne są testy odporności polowej, aby potwierdzić, czy przeniesione geny typu *slow rusting* zapewniają odporność genotypom pszenżyta.

Ostatnim etapem pracy było ukazanie różnic pomiędzy wynikami identyfikacji *locus Lr46* przy użyciu czterech markerów (*Xwmc44*, *Xgwm259*, *Xbarc80* i *csLV34G22*) zlokalizowanych w różnych odległościach od *locus* genu. Marker mikrosatelitarny *Xgwm259* zlokalizowany jest około 20 cM dystalnie w stosunku do *Lr46*, a marker mikrosatelitarny *Xbarc80* mapuje 10–11 cm dystalnie do *Xgwm259*. Oczekiwany produkt markera według Giffey i in. (2009) wynosi 100 pz; jednak według bazy MASwheat (<https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr46>) i przedstawionego tam elektroforogramu, oczekiwany produkt dla genotypu referencyjnego jest powyżej wzorca 100 pz. Według analiz przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej, produkt zidentyfikowany w genotypie referencyjnym ‘Pavon F76’ był również nieco większy niż 100 pz. Analizowano również marker *csLVG22R*, ściśle powiązany z genem *Lr46* (Lagudah, kom. osob. 2020). Według doniesień literatury marker jest wysoce wiarygodnym i sprzężonym w 100% markerem diagnostycznym dla genu *Lr46* (Cobo i in. 2019, Ren i in. 2017). Jednak sekwencje starterów i protokoły nie są do tej pory opublikowane (Lagudah, kom. osob.), dlatego obecnie nie można brać pod uwagę markera dla MAS.

Podobnie Huerta-Espino i in. (2020) użyli dwóch markerów SNP (Viccars, Chandramohan i Lagudah, niepublikowane dane), które znajdowały się w pobliżu *Lr46*, w celu zbadania kolekcji odmian pszenicy z Meksyku. Pozostałe markery znajdują się w większej odległości od genu, a uzyskane istotne różnice w wynikach wskazują na nieprzydatność markerów do identyfikacji genu *Lr46*. Wyniki identyfikacji markera *Xwmc44* pokrywają się w 52% z markerem *csLV46G22*, w 75% z *Xgwm259*, i w zaledwie 32% z markerem *Xbarc80*. Tylko 12% genotypów uzyskało ten sam wynik dla wszystkich markerów. Aby zwalidować i potwierdzić występowanie genu *L46*, Liu i in. (2007) wykorzystali markery molekularne: *Xwmc44*, *Xgwm259* i *Xbarc80*. Kolmer i in. (2015) użyli rekombinowanych linii wsobnych F6 (RIL) „Thatcher”\*3/„CI13227” z markerem *csLV46G22*, aby zmapować region chromosomu 1BL, który był silnie związany z odpornością na wiele patogenów. Autorzy poinformowali, że przy użyciu markera *csLV46G22R* (wariant warunkujący odporność) zidentyfikowano odporność na rdzę brunatną, rdzę żółtą i mączniaka prawdziwego. Jednak w przedłożonym badaniu marker ten okazał się negatywny (wraz z trzema innymi markerami) dla genotypu nr. 31 (‘HI 617’; ‘PI 42228’3; ‘Sujata’), który został uznany za genotyp rodzicielski *Lr46* (Lan i in. 2015, Ponce-Molina i in. 2018). Według Lan i in. (2015), gen *Lr46* wykryto w populacji ‘Avocet YrA’ × ‘Sujata RIL’. Może to prowadzić do hipotezy, że powiązanie między dostępnymi markerami a *loci Lr46* może zostać zerwane.

Biorąc pod uwagę wyniki analiz molekularnych, należy stwierdzić, że marker *csLV46G22* można uznać za wiarygodny marker do identyfikacji genu *Lr46*, ale analizy powinny być poparte dodatkowym skринingiem markera *Xwmc44*. Marker *csLV46G22* ma charakter kodominujący i wydaje się być użyteczny dla MAS w programach hodowli pszenicy po opublikowaniu sekwencji starterów i protokołów. Należy wspomnieć, że ocena LTN, która jest ściśle powiązana z *loci Lr46* (Rosewarne i in. 2006), może być również uwzględniona w selekcji odpornych genotypów pszenicy.

W niniejszej pracy połączenie metod molekularnych oraz cytogenetycznych umożliwiło selekcje komponentów do krzyżowań, a następnie selekcję i analizę mieszańców uzyskanych w wyniku kontrolowanego krzyżowania pszenicy z pszenżytem. Zastosowanie reakcji multipleks PCR pozwoliło na znacznie szybszą i mniej kosztowną ocenę dużej puli genotypów pod względem obecności genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* oraz wytypowanie cennych genotypów, które mogą zostawać wykorzystane jako źródło

odporności w innych badaniach i projektach, będących kontynuacją wstępnych badań przedstawionych w pracy doktorskiej. Uzyskane wyniki wskazują na obecność *locus* genów typu *slow rusting* w uzyskanych mieszańcach F<sub>1</sub>, jednak potwierdzenie ekspresji genów i trwałej odporności roślin należałoby potwierdzić kilkuletnia oceną polową po uzyskaniu materiału roślinnego w wystarczającej ilości. Eksperyment może stanowić zbiór danych, metod i wniosków, które pozwolą na dopracowanie szczegółów badania i powtórzenie go na większą skalę co dopiero umożliwi realizację kolejnego etapu procesu hodowlanego, czyli krzyżowań wstecznych z pszenżytem.

## 6. Literatura

1. Achremowicz B., Ceglińska A., Gambuś H., Haber T., Obiedziński M. (2014). Technologiczne wykorzystanie ziarna pszenżyta. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*. 1(24): 113-120.
2. Alemu G. (2019). Wheat breeding for disease resistance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(2): 000141. <https://doi.org/10.23880/oajmb-16000143>
3. Allen R. F. (1926) A cytological study of *Puccinia triticina* physiologic form 11 on Little Club wheat. *Journal of Agricultural Research*, 33: 201– 222. <http://handle.nal.usda.gov/10113/IND43967146>
4. Altieri E., McCallum B., Somers D. J., Sacco F. (2008). Inheritance and genetic mapping of leaf rust resistance genes in the wheat cultivar Buck Manantial. In: *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium* (R. Appels, R. Eastwood, E. Lagudah, P. Langridge, M. Mackay, L. McIntyre, P. Sharp, eds.). Brisbane QLD, AU.
5. Arseniuk E. (1996). Triticale diseases – a review. In: Guedes-Pinto H, Darvey N, Carnide VP (eds) *Triticale today and tomorrow*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, ss. 499–525
6. Arseniuk E., Krzymuski J., Martyniak J., Oleksiak T. (2003). Historia hodowli i nasiennictwa na ziemiach polskich w XX wieku. Krzymuski J. (red.). *Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików*: 76–77.
7. Arseniuk E. i Oleksiak T. (2004). Triticale in Poland, in *Triticale Improvement and Production*, ed. by Mergoun M and Gomez-Macpherson H. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 131–134.
8. Arseniuk E. i Oleksiak T. (2002). Production and breeding of cereals in Poland. In *Proceedings of the 5th International Triticale Symposium, Radzików, Poland, 30 June-5 July, 2002*. Volume I: oral presentations Plant Breeding and Acclimatization Institute. ss. 11-20.
9. Audenaert K., Troch V., Landschoot S., Haesaert G. (2014). Biotic stresses in the anthropogenic hybrid triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack): current knowledge and breeding challenges. *European Journal of Plant Pathology*, 40(4): 615–630. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0498-2>

10. Ballabio A., Ranier J. E., Chamberlain J. S., Zollo M., Caskey C. T. (1990). Screening for steroid sulfatase (STS) gene deletions by multiplex DNA amplification. *Human Genetics*, 84(6): 571–573. <https://doi.org/10.1007/BF00210812>
11. Blakeslee A.F., Avery A.G. (1937). Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *Journal of Heredity*, 28: 392–411. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a104294>
12. Bolton M. D., Kolmer J. A., Garvin D. F. (2008). Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology*, 9(5): 563-575. . <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2008.00487.X>.
13. Borlaug N. E. (1968). Wheat breeding and its impact on world food supply. s. 1–36. In: *Proceedings of the 3rd International Wheat Genetics Symposium*. 5–9 August 1968, Canberra, AU
14. Chamberlain J. S., Gibbs R. A., Rainer J. E., Nguyen P. N., Thomas C. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids research*, 16(23): 11141-11156. <https://doi.org/10.1093/nar/16.23.11141>.
15. Clifford B. C. (1985): Barley leaf rust. In *Diseases, distribution, epidemiology, and control* Academic press. ss. 173-205.
16. Cobo N., Wanjugi H., Lagudah E., Dubcovsky J. (2019). A high-resolution map of wheat QYr.ucw-1BL, an adult plant stripe rust resistance locus in the same chromosomal region as Yr29. *Plant Genome*,1(12): 180055. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.08.0055>.
17. Côté M. J., Tardif M. C., Meldrum A.J. (2004). Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease*, 88 (11): 1219–1225. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.11.1219>
18. De Costa C. T, Albuquerque A. C. S., Nascimento Junior A. D., Marcelino F. C., Pereira J. F. (2007). Genetic diversity of Brazilian triticales evaluated with genomic wheat microsatellites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 1577-1586. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001100009>.
19. Dinh H. X., Singh D., Periyannan S., Park R. F., Pourkheirandish M. (2020). Molecular genetics of leaf rust resistance in wheat and barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 133(7): 2035-2050. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03570-8>.

20. Dodds P. N. I Rathjen J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8): 539-548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>.
21. Drażkiewicz K. (2019). Pszenżyto. Pszenżyto ozime. [w:] Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2019. [http://www.coboru.pl/Publikacje\\_COBORU/Listy\\_opisowe/LOORR%20-%20zbozowe%202019.pdf](http://www.coboru.pl/Publikacje_COBORU/Listy_opisowe/LOORR%20-%20zbozowe%202019.pdf). [Dostęp: 4 maj 2022]
22. Dyck P. L. (1989). The inheritance of leaf rust resistance in wheat cultivars Kenyon and Buck Manantial. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 69: 1113–1117. <https://doi.org/10.4141/cjps89-134>
23. Dyck P. L., Samborski D. J., Martens J. W. (1985). Inheritance of resistance to leaf rust and stem rust in the wheat cultivar Glenlea. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7(4): 351–354. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.505>
24. Evans L. E., Shebeski L. H., McGinnis R. C., Briggs K. G., Zuzens D. (1972). Glenlea red spring wheat. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 52(6): 1081–1082. <https://doi.org/10.4141/cjps72-184>
25. FAO <https://www.fao.org/faostat/en/> [Dostęp: 4 maj 2022]
26. Flor H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9(1): 275–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>.
27. Gogół A., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Okoń S., Kowalczyk K. (2015). Development of multiplex PCR for *Lr21* and *Pm4b* resistance genes detection in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio E. Agricultura LXX* (3): 21–30.
28. Griffey C. A., Thomason W.E., Pitman R.M., Beahm B.R., Paling J.J., Chen J. (2009). Registration of ‘USG 3555’ Wheat. *Journal of Plant Registratuib.* 3(3): 273–<http://doi.org/8.10.3198/jpr2009.05.0258crc>
29. GUS <https://stat.gov.pl/banki-i-bazy-danych/> [Dostęp 4 maja 2022].
30. Hasterok R., Dulawa J., Jenkins G., Leggett M., Langdon T. (2006). Multi-substrate chromosome preparations for high throughput comparative FISH. *BMC biotechnology*, 6(1): 1-5. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-20>.
31. Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23(3): 504-511. <https://doi.org/10.2144/97233rr01>.

32. Herrera-Foessel S. A., Singh R. P., Huerta-Espino J., Rosewarne G. M., Periyannan S. K., Viccars L., Lagudah E. S. (2012). *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(8): 1475-1486. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1802-1>
33. Hiebert C. W., Thomas J. B., McCallum B. D., Humphreys D. G., DePauw R. M., Hayden M. J., Spielmeier W. (2010). An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher\* 6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*). *Theoretical and Applied Genetics*, 121(6): 1083-1091. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1373-y>.
34. Hu G., Rijkenberg F. H. (1998). Subcellular localization of  $\beta$ -1, 3-glucanase in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*-infected wheat leaves. *Planta*, 204(3): 324-334. <https://doi.org/10.1007/s004250050263>.
35. Huerta-Espino J., Singh R., Crespo-Herrera L. A., Villaseñor-Mir H. E., Rodríguez-García M. F., Dreisigacker S., (2020) Adult plant slow rusting genes confer high levels of resistance to rusts in bread wheat cultivars from Mexico. *Frontiers in Plant Sciences*. 14(11): 824 <http://doi.org/10.3389/fpls.2020.00824>
36. Huerta-Espino J., Singh R. P., German S., McCallum B. D., Park R. F., Chen W. Q., Goyeau H. (2011). Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica*, 179(1): 143-160. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x>.
37. Index Fungorum <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> [Dostęp: 4 maj 2022]
38. Singh R. P., Herrera-Foessel S. A., Huerta-Espino J., Lan C. X., Basnet B. R., Bhavani S., Lagudah E. S. (2013). Pleiotropic gene *Lr46/Yr29/Pm39/Ltn2* confers slow rusting, adult plant resistance to wheat stem rust fungus. [w]: proceedings of the Borlaug global rust initiative technical workshop, 19–22 Aug. 2013, New Delhi, India. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. ss. 17.1
39. Kaur M., Saini R.G., Preet K. (2000). Adult plant leaf rust resistance from 111 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Euphytica*, 113(3): 235–243. <https://doi.org/10.1023/A:1003913004580>
40. Kilpatrick, R. A. (1975). New wheat cultivars and longevity of rust resistance, 1971–75. United States Department of Agriculture Economic Research Service NE. 64:1–20

41. Kolmer J. A., Singh R. P., Garvin D. F. (2008). Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Sciences*, 48 (4): 1841–1852. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.08.0474>.
42. Kolmer J. A., Lagudah E. S., Lillemo M., Lin M., Bai G. (2015) The *Lr46* gene conditions partial adult- plant resistance to stripe rust, stem rust, and powdery mildew in thatcher wheat. *Crop Sciences*, 55: 2557–65. <http://doi.org/10.2135/cropsci2015.02.0082>
43. Kolmer J. A. (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1): 435–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.435>.
44. Kolmer J. A. (2015). A QTL on chromosome 5BL in wheat enhances leaf rust resistance of *Lr46*. *Molecular Breeding*, 35(2): 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0274-9>.
45. Kolmer J. A., Bernardo A., Bai G., Hayden M. J., Chao S. (2018a). Adult plant leaf rust resistance derived from toropi wheat is conditioned by *Lr78* and three minor QTL. *Phytopathology*, 108: 246–253. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-17-0254-R>
46. Kolmer J. A., Mert Z., Akan K., Demir L., Ünsal R., Şermet C., Morgounov A. (2013). Virulence of *Puccinia triticina* in Turkey and leaf rust resistance in Turkish wheat cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4): 703-716. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0107-1>. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0107-1>.
47. Kolmer J. A., Singh R. P., Garvin D. F., Viccars L., William H. M., Huerta-Espino J., Lagudah, E. S. (2008). Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Science*, 48(5): 1841-1852. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.08.0474>.
48. Kolmer J. A., Su Z., Bernardo A., Bai G., Chao S. (2018b). Mapping and characterization of the new adult plant leaf rust resistance gene *Lr77* derived from Santa Fe winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 131: 1553–1560. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3097-3>
49. Krattinger S. G., Lagudah E. S., Spielmeier W., Singh R. P., Huerta-Espino J., McFadden H., Keller B. (2009). A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, 323(5919): 1360-1363. <https://doi.org/10.1126/science.1166453>.

50. Kuleung C., Baenziger P. S., Kachman S. D., Dweikat I. (2006). Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers. *Crop Sciences*, 46:1692–1700. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.09-0338>.
51. Kwiatek M. T., Kurasiak-Popowska D., Mikołajczyk S., Niemann J., Tomkowiak A., Weigt D., Nawracała J. (2019). Cytological markers used for identification and transfer of *Aegilops* spp. chromatin carrying valuable genes into cultivated forms of *Triticum*. *Comparative cytogenetics*, 13(1): 41-59. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v13i1.30673>.
52. Kwiatek M., Belter J., Majka M., Wiśniewska H. (2016). Allocation of the S-genome chromosomes of *Aegilops variabilis* Eig. carrying powdery mildew resistance in triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack). *Protoplasma*, 253(2): 329-343. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0813-6>
53. Lagudah E.S. (2011) Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat. *Euphytica*, 179(1): 81–91. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0336-3>
54. Lagudah E. S., Krattinger S. G., Herrera-Foessel S., Singh R. P., Huerta-Espino J., Spielmeier W., Keller B. (2009). Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(5): 889-898. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1097-z>.
55. Lagudah E. S., McFadden H., Singh R. P., Huerta-Espino J., Bariana H. S., Spielmeier W. (2006). Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(1): 21-30. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0406-z>.
56. Laibach F. (1925). Das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. *Zeitschrift für Botanik*, 17: 417–459.
57. Lan C., Zhang Y., Herrera-Foessel S. A., Basnet B. R., Huerta-Espino J., Lagudah E. S., Singh R. P. (2015). Identification and characterization of pleiotropic and co-located resistance loci to leaf rust and stripe rust in bread wheat cultivar Sujata. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(3): 549-561. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2454-8>.
58. Lelley T. (2006). Triticale: a low input cereal with untapped potential. In: Singh RJ, Jauhar PR (eds) *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement*. Taylor and Francis, Boca Baton, ss. 395–430
59. Leśniowska-Nowak J., Gradzielewska A., Majek M. (2013). Identification of the gene resistant to leaf rust in selected European wheat cultivars and multiplex PCR

- development. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio E.*, 68 (3): 20–28.
60. Lillemo M., Asalf B., Singh R.P., Huerta-Espino J., Chen X. M., He Z. H. (2008). The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 1155–1166. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0743-1>
  61. Lillemo M., Singh R. P., William M., Herrera-Foessel S., Huerta-Espino J., German S., Lagudah E. S. (2011). Multiple rust resistance and gene additivity in wheat: lessons from multi-location case studies in cultivars Parula and Saar. In Borlaug Global Rust Initiative (BGRI) 2011 Technical Workshop, 13-16 June, St Paul, Minnesota, USA. Oral Presentations (pp. 111-120). Borlaug Global Rust Initiative.
  62. Liu F., Niu Y., Deng H., Tan G. (2007). Mapping of a major stripe rust resistance gene in Chinese native wheat variety Chike using microsatellite markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(12): 1123-1130. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(07\)60128-3](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60128-3).
  63. Lombard V., Delourme R. (2001). A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 491–507. <https://doi.org/10.1007/s001220100560>.
  64. Lukaszewski A. J. (2006). Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve breadmaking quality of hexaploid triticale. *Crop Sciences*, 46: 2183–2194. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0135>
  65. Martinez F., Niks R. E., Singh R. P., Rubiales D. (2001). Characterization of *Lr46*, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas*, 135(2-3): 111-114. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00111.x>.
  66. MASwheat. Rust resistance gene *Lr46-Yr29*: <https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr46> [Dostęp: 2 maj 2022].
  67. McCallum B. D., Somers D. J., Humphreys D. G., Cloutier S. (2008). Molecular marker analysis of *Lr34* in Canada western red spring wheat cultivars. [w:] Proceedings of 11th International Genetics Symposium (R. Appels, R. Eastwood, E. Lagudah, P. Langridge, M. Mackay Lynne, eds.). Brisbane, AU. ss.137–140.
  68. McCallum B. D., Hiebert C. W., Cloutier S., Bakkeren G., Rosa S. B., Humphreys D. G., Wang, X. (2016). A review of wheat leaf rust research and the development of

- resistant cultivars in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(1): 1-18.  
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00111.x>.
69. McGoverin C. M., Snyders F., Muller N., Botes W., Fox G., Manley M. (2011). A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7): 1155-1165.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.4338>.
  70. McIntosh R. A., Wellings C. R., Park R. F. (1995). *Wheat rusts: an atlas of resistance genes*. CSIRO publishing. <https://books.google.pl/books?id=PjCpoYKCr6MC>.
  71. McIntosh R. A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. (2008). Catalogue of gene symbols for wheat: 2008. *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium*. 24–29 August 2008, Brisbane, AU
  72. McIntosh R. A., Dubcovsky J., Rogers W. J., Morris C., Appels R., Xia X. C. (2015). Catalogue of gene symbols for wheat: 2015-2016 supplement. <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2015.pdf>.
  73. McIntosh R.A., J. Dubcovsky W.J. Rogers C. Morris i Xia X. C. (2019). Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2019. <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.
  74. Mergoum M., Pfeiffer W. H., Pena R. J. i in. (2004). Triticale crop improvement: the CIMMYT programme. In: Mergoum M, Gomez-Macpherson H (eds) *Triticale improvement and production*. FAO Plant production and protection paper no. 179. FAO, Rome, s. 11–26
  75. Mergoum M., Singh P. K., Pena R. J., Lozano-del Río A. J., Cooper K. V., Salmon D. F., Gómez Macpherson H. (2009). Triticale: a “new” crop with old challenges. In *Cereals* (s. 267-287). Springer, New York, NY.
  76. Mergoum M., Sapkota S., ElDoliefy A. E. A., Naraghi S. M., Pirseyedi S., Alamri M. S., AbuHammad W. (2019). Triticale (x *Triticosecale* Wittmack) Breeding. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Cereals* (s. 405-451). Springer, Cham.
  77. Mikhailova L., Merezko A. F., Funtikova E. Y. (2009). Triticale diversity in leaf rust resistance. *Russian Agriculture Sciences*, 35: 320–323.  
<https://doi.org/10.3103/S1068367409050097>.
  78. Moczulski M., Salmanowicz B.P. (2003). Multiplex PCR identification of wheat HMW glutenin subunit genes by allele-specific markers. *Journal of Applied Genetics*, 44 (4): 459–472.

79. Mutirangura A., Greenberg F., Butler M. G., Malcolm S., Nicholls R. D., Chakravarti A., Ledbetter D. H. (1993). Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11–q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Human Molecular Genetics*, 2(2): 143–151. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.2.143>
80. Niedziela A., Orłowska R., Machczyńska J., Bednarek P. T. (2016). The genetic diversity of triticale genotypes involved in Polish breeding programs. *Springerplus*, 5: 355. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1997-8>.
81. Park R. F., Golegaonkar P. G., Derevnina L., Sandhu K. S., Karaoglu H., Elmansour H. M., Singh D. (2015). Leaf rust of cultivated barley: pathology and control. *Annual Review of Phytopathology*, 53: 565-589. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120324>.
82. Parlevliet, J. E. (1993). What is durable resistance, a general outline. In *Durability of disease resistance*. Springer, Dordrecht. (s. 23-39). [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2004-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2004-3_3).
83. Ponce-Molina L. J., Huerta-Espino J., Singh R. P., Basnet B. R., Lagudah E., Aguilar-Rincón V. H., Lan C. (2018). Characterization of adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in Indian wheat cultivar ‘New Pusa 876’. *Crop Science*, 58(2): 630-638. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0396>.
84. Rajaram S. i Van Ginkel M. (1996). Yield potential debate: Germplasm vs. methodology, or both. *Increasing yield potential in wheat: breaking the barriers*. Mexico, DF: CIMMYT, 11-18.
85. Randhawa H. S., Bona L., Graf R. J. (2015). Triticale breeding – progress and prospect. In: Eudes F (ed) *Triticale*. Springer. Cham. ss. 267–286
86. Rayburn A. L. i Gill B. S. (1985). Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *Journal of Heredity*, 76(2): 78-81. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110049>.
87. Ren Y., Singh R. P., Basnet B. R., Lan C. X., Huerta-Espino J., Lagudah E. S., Ponce-Molina L. J. (2017). Identification and mapping of adult plant resistance loci to leaf rust and stripe rust in common wheat cultivar Kundan. *Plant disease*, 101(3): 456-463. <https://doi.org/1094/PDIS-06-16-0890-RE>.
88. Risk J. M., Selter L. L., Krattinger S. G., Viccars L. A., Richardson T. M., Buesing G., Keller B. (2012). Functional variability of the *Lr34* durable resistance gene in

- transgenic wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 10(4): 477-487.  
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00683.x>.
89. Roelfs A. P. i Bushnell W. R. (1985). *The cereal rusts*. Orlando, FL: Academic Press. Vol. 2, ss. 606.
  90. Roelfs A. P. (1992). *Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. CIMMYT.
  91. Rosewarne G. M., Singh R. P., Huerta-Espino J., William H. M., Bouchet S., Cloutier S., Lagudah E. S. (2006). Leaf tip necrosis, molecular markers and  $\beta$ 1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes *Lr46/Yr29*. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(3), 500-508. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0153-6>
  92. Rubiales D., i Niks R. E. (1995). Characterization of Lr34, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust. *Plant Diseases*, 79: 1208. <https://doi.org/10.1094/PD-79-1208>
  93. Salmanowicz B. P., Langner M., Wiśniewska H., Apolinarska B., Kwiatek M., Błaszczyk L. (2013). Molecular, physicochemical and rheological characteristics of introgressive *Triticale/Triticum monococcum* ssp. *monococcum* lines with wheat 1D/1A chromosome substitution. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8): 15595-15614. <https://doi.org/10.3390/ijms140815595>
  94. Sapkota S. (2015) Identification and genomic mapping of resistance to bacterial leaf streak in wheat. MS thesis, North Dakota State University
  95. Sapkota S., Zhang Q., Chittem K., Mergoum M., Xu S. S., Liu Z. (2018). Evaluation of triticale accessions for resistance to wheat bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. *Plant Pathology*, 67(3): 595-602. <https://doi.org/10.1111/ppa.12768>.
  96. Sayre K. D., Singh R. P., Huerta-Espino J., Rajaram S. (1998). Genetic progress in reducing losses to leaf rust in CIMMYT-derived Mexican spring wheat cultivars. *Crop science*, 38(3): 654-659. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800030006x>.
  97. Schwarzacher T., Leitch A. R., Bennett M. D., Heslop-Harrison J. S. (1989). In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*, 64(3): 315-324. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087847>.
  98. Schwarzacher T., Heslop-Harrison J. S., Anamthawat-Jonsson K., Finch R. A., Bennett M. D. (1992). Parental genome separation in reconstructions of somatic and

- premeiotic metaphases of *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum*. *Journal of Cell Science*, 101(1): 13-24. <https://doi.org/10.1242/jcs.101.1.13>
99. Sempołowski A. 1902. *Hodowla i uszlachetnianie roślin gospodarskich*. Warszawa, Skład główny E. Wende i S-ka.
100. Shuber A. P., Skoletsky J., Stern R., Handelin B. L. (1993). Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Human Molecular Genetics* 2: 153–158. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.2.153>.
101. Simmonds N. (1976). *Evolution of crop plants*. Longman, New York
102. Singh R. P. (1992). Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. *Crop Sciences* 32: 874–878. <https://doi.org/10.2135/cropsci1992.0011183X003200040008x>
103. Ponce-Molina L. J., Huerta-Espino J., Singh R. P., Basnet B. R., Lagudah E., Aguilar-Rincón V. H., Lan C. (2018). Characterization of adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in Indian wheat cultivar 'New Pusa 876'. *Crop Science*, 58(2): 630-638. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0396>.
104. Singh R. P., Mujeeb-Kazi A., Huerta-Espino J. (1998) *Lr46/Yr19*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology*, 88(9): 890–894. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.9.890>
105. Singh R. P. i Rajaram S. (1992). Genetics of adult-plant resistance of leaf rust in 'Frontana' and three CIMMYT wheats. *Genome*, 35(1): 24-31. <https://doi.org/10.1139/g92-004>.
106. Singh R. P., Mujeeb-Kazi A., Huerta-Espino J. (1998). *Lr46*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology*, 88(9): 890-894. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.9.890>.
107. Singh R. P., Nelson J. C., Sorrells M. E. (2000). Mapping *Yr28* and other genes for resistance to stripe rust in wheat. *Crop Science*, 40(4): 1148-1155. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4041148x>.
108. Singla J., Lüthi L., Wicker T., Bansal U., Krattinger S. G., Keller B. (2017). Characterization of *Lr75*: a partial, broad-spectrum leaf rust resistance gene in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2784-1>.
109. Sodekiewicz W., Strzembicka A., Apolinarska B. (2008) Chromosomal location in triticale of leaf rust resistance genes introduced from *Triticum monococcum*. *Plant Breeding*, 127: 364–367. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01485.x>.

110. Somers D. J. Isaac P., Edwards K. (2004). A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1105-1114. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1740-7>
111. Suenaga K., Singh R. P., Huerta-Espino J., William H. M. (2003). Microsatellite markers for genes Lr34/Yr18 and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology*, 93(7): 881–890. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.881>.
112. Sumíková T., Hanzalova A. (2010). Multiplex PCR assay to detect rust resistance genes *Lr26* and *Lr37* in wheat. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46 (2): 85–89. <https://doi.org/10.17221/32/2010-CJGPB>
113. Świć H. (1922). Rejonizacja uprawy pszenżyta w Polsce, vol. XLVII, 10, ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA LUBLIN – POLINIA
114. Tams S. H., Bauer E., Oettler G., Melchinger A. E. (2004). Genetic diversity in European winter triticale determined with SSR markers and coancestry coefficient. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(7): 1385-1391. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1552-1>.
115. Tomkowiak A., Skowrońska R., Weigt D., Kwiatek M., Nawracała J., Kowalczewski P.Ł. Pluta M. (2019). Identification of powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* resistance genes in selected wheat varieties and development of multiplex PCR. *Open Chemistry*, 17 (1): 157–165. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0024>
116. Trebichalský A., Balážová Ž., Gálová Z., Chňapek M., Tomka M. (2021). Detection of genetic diversity of triticale by microsatellite markers. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2 (Special issue 1): 1898-1906. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1997-8>.
117. Tschermak E. (1921). Beiträge zur vervollkommnung der technik der bastardierungszucht der vier hauptgetreidearten. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 8:1-13.
118. Varughese G., Pfeiffer W. H., Pena R. J. (1996). Triticale: a successful alternative crop. 1. *Cereal Foods World*, 41: 474–482.
119. Wang L., Li G., Peña R.J., Xia X., He Z. (2010). Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for *Glu-A3* alleles in common wheat (*Triticum*

- aestivum* L.). Journal of Cereal Science, 51(3): 305–312.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.01.005>.
120. William M., Singh R. P., Huerta-Espino J., Islas S. O., Hoisington D. (2003). Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene *Lr46* and its association with stripe rust resistance gene *Yr29* in wheat. Phytopathology, 93(2): 153-159.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.2.153>.
121. Wilson S. (1873) II. Wheat and Rye hybrids. In Transactions of the Botanical Society of Edinburgh (Vol. 12, No. 1-4, ss. 286-288). Taylor & Francis Group.  
<https://doi.org/10.1080/03746607309469536>
122. Wolski T., i Tymieniecka E. (1983). The first Polish triticale variety. Cereal Research Communications, 11(2): 139-141.
123. Woś H., Maćkowiak W., Cichy H., Paizert K. (1994). Susceptibility of winter triticale, to glume blotch, leaf rust and scald. Hodowla Roślin, Aklimatyzacja I Nasiennictwo, 38: 3-4.
124. Zhang X. K., Liu L., He Z. H., Sun D. J., He X. Y., Xu Z. H, Xia X. C. (2008). Development of two multiplex PCR assays targeting improvement of bread-making and noodle qualities in common wheat. Plant Breeding, 127(2): 109–115.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01442.x>.
125. Zhang L., Dickinson M. (2001). Fluorescence from rust fungi: a simple and effective method to monitor the dynamics of fungal growth in planta. Physiological and molecular plant pathology, 59(3): 137-141.  
<https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0349>.
126. Zhang L., Meakin H., Dickinson M. (2003). Isolation of genes expressed during compatible interactions between leaf rust (*Puccinia triticina*) and wheat using cDNA-AFLP. Molecular Plant Pathology, 4(6): 469-477. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00192.x>.

## **ROZDZIAŁ II**

### **Publikacje wchodzące w skład rozprawy**

**1. Development of multiplex PCR to detect *slow rust* resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat**

**Skowrońska R., Kwiatek M., Tomkowiak A., Nawracała J.**

*Journal of Applied Genetics*, 2019, 60(3): 301-304.

<https://doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z>

**IF – 3,240; pkt wg MEiN – 140,000**



## Development of multiplex PCR to detect slow rust resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat

Roksana Skowrońska<sup>1</sup> · Michał Kwiatek<sup>1</sup> · Agnieszka Tomkowiak<sup>1</sup> · Jerzy Nawracała<sup>1</sup>

Received: 20 March 2019 / Revised: 15 July 2019 / Accepted: 3 September 2019 / Published online: 10 September 2019  
© The Author(s) 2019

### Abstract

Leaf rust caused by *Puccinia triticina* belongs to one of the most dangerous fungal diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.) and is the cause of large yield losses every year. Here we report a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay, which was developed for detection of two important wheat slow rust resistance genes *Lr34* and *Lr46*, using two molecular markers: *csLV34* and *Xwmc44*, respectively. The presence of genes was analyzed in one winter wheat variety TX89D6435 and five spring wheat varieties: Pavon F76, Parula ‘S’, Rayon 89, Kern, Mochis 88. Both *Lr34* and *Lr46* genes were identified in variety TX89D6435, gene *Lr34* was also identified in Parula ‘S’ and Kern varieties, and gene *Lr46* occurs in Pavon F76 and Mochis 88 variety. None of the resistance genes tested was detected in the Rayon 89 variety. The use of the multiplex PCR method allowed to shorten the analysis time, reduce costs of analyses, and reduce the workload.

**Keywords** Leaf rust · *Lr34* · *Lr46* · Multiplex PCR · Wheat

### Introduction

Leaf rust caused by the pathogen *Puccinia triticina* Erikss. & Henn. is one of the most destructive diseases of wheat (Kolmer et al. 2005). There are many fungicides that help control these fungal disease, but their use is expensive and can have a negative impact on the environment. The most efficient, economical, and environmentally sound method to mitigate the losses caused by pathogens is breeding for genetic resistance (Muthe et al. 2016). To date, more than 70 leaf rust resistance (*Lr*) genes have been cataloged (McIntosh et al. 2013), but many of these genes are race-specific and they have lose their effectiveness when new races of the pathogen are appearing (McCallum et al. 2007). Currently, breeding programs focus on producing cultivars with adult plant resistance (APR), also known as slow rusting or race non-specific genes. Slow rusting genes are a group of leaf rust resistance genes

that give durable resistance only in adult plant (Bošković et al. 2008). APR is characterized by less and slower pathogen growth and reproduction despite a high infection type (Tiwari et al. 2009). An important advantage of genes is their pleiotropic effect on many pathogens, for example *Blumeria graminis* causing powdery mildew (Lillemo et al. 2008). Among all, the leaf rust resistance genes in wheat only four genes are known as slow rusting: *Lr34* (Singh 1992), *Lr46* (Singh et al. 1998), *Lr67* (Dyck and Samborski 1979), and *Lr68* (Herrera-Foessel et al. 2012).

The leaf rust resistance gene *Lr34* (earlier *LrT2*) is the best known and most effective of slow rusting genes. The gene *Lr34* was first described in the wheat line PI58548 and located on short arm of wheat chromosome 7D (Dyck 1987). Lagudah et al. (2006) developed PCR-based marker *csLV34* that has been used extensively to identify the presence of *Lr34* gene. The disadvantage is that the marker is not diagnostic in some genetic backgrounds, like Canadian wheat germplasm (Lagudah et al. 2009). Leaf tip necrosis (LTN) is one of the morphological markers associated with leaf rust resistance gene *Lr34* and is also expressed in the absence of the pathogen (Lagudah et al. 2006). The *Lr46* gene was first described in wheat cultivar Pavon F76 and was localized on chromosome 1BL (Singh et al. 1998). *Lr46* shows a resistance phenotype in adult plants similar to *Lr34*, but the effects of *Lr46* are not as pronounced as *Lr34* (Martinez et al. 2001). Lillemo et al.

Communicated by: Barbara Naganowska

✉ Michał Kwiatek  
michal.kwiatek@up.poznan.pl

<sup>1</sup> Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str, 60-632 Poznań, Poland

(2008) have shown that *Lr46* has an additive effect on leaf rust resistance of *Lr34*. The gene *Lr46* was mapped distal to *Xwmc44* and proximal to *Xgwm259* (Suenaga et al. 2003).

## Material and methods

The aim of this study was to develop a multiplex PCR method for simultaneous identification of two most effective slow rust resistance genes: *Lr34* and *Lr46*. Plant material consisted of six wheat cultivars *Triticum aestivum* L. derived from the National Small Grains Collection, the Agriculture Research Station in Aberdeen, USA: TX89D6435, Pavon F76, Parula 'S', Rayon 89, Kern and Mochis 88 (Table 1).

The DNA was extracted from leaf tissue using the GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx Ltd., Poland). DNA quality and concentration was checked using the DeNovix spectrophotometer. In order to identify the *Lr34* and *Lr46* genes, two molecular markers were used: *csLv34* and *Xwmc44*. The STS marker *csLV34* maps 0.4 cM from *Lr34* and the sequence of primers (Merck) is as follows: *csLV34F* 5'- GTT GGT TAA GAC TGG TGA TGG -3'; *csLV34R* 5'- TGC TTG CTA TTG CTG AAT AGT -3' (Lagudah et al. 2006). According to the literature, the size of the amplified product is a 150 bp (base pairs) band, indicative of the presence of the gene and a 229 bp band in susceptible genotypes. Locus of SSR marker *Xwmc44* is located 0.4 cm from QTL for *Lr46*. A product of the microsatellite marker is 242 bp band for the presence of *Lr46* gene, and the sequence of marker primers is as follows: *WMC44F* 5'- GGT CTT CTG GGC TTT GAT CCT G -3', *WMC44R* 5'- GTT GCT AGG GAC CCG TAG TGG -3' (Suenaga et al. 2003). The 25  $\mu$ L mix composition of multiplex PCR volume consisted of the following: 12.5  $\mu$ L 2 $\times$  PCR TaqNovaHs PCR Master Mix (Blirt), which included 2 $\times$  concentrated PCR reaction buffer; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.6 mM dNTPs mix (0.4 mM of each dNTP); 0.8  $\mu$ L *csLv34* forward primer; 0.8  $\mu$ L *csLv34* reverse primer; 1.2  $\mu$ L *Xwmc44* forward primer; 1.2  $\mu$ L *Xwmc44* reverse primer (the concentration for each primer was 100  $\mu$ M); 2  $\mu$ L DNA template (50 ng/ $\mu$ L) and 6.5  $\mu$ L PCR grade water. PCR profile was modified with reference to standard protocol. The following annealing temperatures were tested: 55  $^{\circ}$ C,

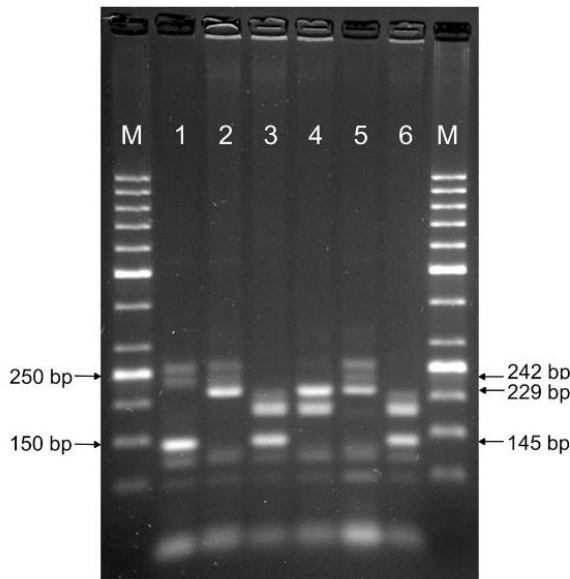
optimal for the *csLv34* primer (Lagudah et al. 2006), 61  $^{\circ}$ C recommended for the *Xwmc44* marker (Suenaga et al. 2003), and several intermediate variants. The final PCR reaction consisted of initial denaturation at 94  $^{\circ}$ C for 5 min, followed by 40 cycles (denaturation, 94  $^{\circ}$ C for 45 s; primer annealing, 60  $^{\circ}$ C for 30 s; elongation, 72  $^{\circ}$ C for 1 min), followed by the final extension for 7 min at 72  $^{\circ}$ C and final step at 4  $^{\circ}$ C. The reaction was carried out using the Labcycler thermal cyclers (SensoQuest GmbH). The products of amplification were prepared by adding 0.5 Midori Green Direct (NIPPON Genetics EUROPE) to each tube and were separated using 2% agarose (SIGMA) gel in 1 $\times$  TBE buffer (BioShop) at 100 V for two and a half hours. A Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR UV system was used with the Biorad Bio Image<sup>TM</sup> Software to visualize the PCR products.

## Results and discussion

Molecular markers can be successfully used in the identification of leaf rust resistance genes in wheat resistance breeding programs (Vida et al. 2009). The results showed that the amplification of *csLv34* marker was observed in TX89D6435, Parula 'S', and Kern varieties, but the size of the resulting *Lr34* gene linked product was approximately 145 bp, which is smaller than reported by Lagudah et al. (2006). Differences in the size of products may result from the size of the DNA ladder used. Lagudah et al. (2006) used a 100 bp ladder molecular size markers. In our experiment we have used more precise, 50 bp DNA ladder, which showed that the *csLv34* marker product is smaller than 150 bp. Considering other varieties (Pavon F76, Rayon 89, and Kern) the PCR reaction with *csLv34* marker showed a 229 bp product, indicating the lack of the *Lr34* gene. The analyses with the *Xwmc44* marker linked to the *Lr46* gene resulted in the identification of a 242 bp specific product in TX89D6435, Pavon F76, and Mochis 88 varieties. The accumulation of both *Lr34* and *Lr46* resistance genes was demonstrated by the multiplex PCR in TX89D6435 variety, so this variety can be a good source of non-race specific resistance to leaf rust (Table 1, Fig. 1).

**Table 1** Presence of genes *Lr34* and *L46* in tested wheat varieties

No.	Cultivar	Origin	Plant ID	Presence of Lr34	Presence of Lr46
1.	TX89D6435	US, Texas	PI 584759	+	+
2.	Pavon F76	Mexico	PI 520003	-	+
3.	Parula 'S'	Mexico	PI 520340	+	-
4.	Rayon 89	Mexico	PI 591784	-	-
5.	Kern	US	PI 672001	+	-
6.	Mochis 88	Mexico	PI 591791	-	+



**Fig. 1** Electrophoresis showing the presence of markers: *csLv34* (for the *Lr34*) and *Xwmc44* (for the *Lr46*) in the wheat varieties. M, GeneRuler 50 bp DNA ladder (NIPPON Genetics EUROPE GmbH); 1, TX89D6435; 2, Pavon F76; 3, Parula 'S'; 4, Rayon 89; 5, Kern; 6, Mochis 88

The literature gives many examples of successful use of the multiplex PCR method to identify race-specific resistance genes. Leśniowska-Nowak et al. (2013) developed a multiplex PCR method to identify two resistance genes for leaf rust *Lr9* and *Lr19*. Other major resistance genes for *P. triticea* *Lr29* and *Lr37* were identified with one PCR reaction by Sumikova and Hanzalova (2010). Gogól et al. (2015) made a successful attempt to use the multiplex PCR method to simultaneously identify genes of resistance to two different diseases: *Lr21* (leaf rust) and *Pm4b* (powdery mildew). Tomkowiak et al. (2019) identified the *Pm2*, *Pm3a*, *Pm4b*, and *Pm6* genes and developed multiplex PCR reaction conditions for simultaneous identification of *Pm2* and *Pm4b* genes.

Slow rusting genes *Lr34* and *Lr46* are very important for breeding because they provide durable resistance over a long period of time in different environments, and they are effective against many pathogens (Imbasy et al. 2014). The development of the multiplex PCR method allows to significantly shorten the time of analysis of these two important genes. The study demonstrated that the developed multiplex PCR conditions are effective diagnostic tool for the simultaneous identification of *Lr34* and *L46* genes using the *csLv34* and *Xwmc44* markers, respectively. The developed multiplex PCR conditions can be used in breeding programs for marker-assisted selection.

**Acknowledgments** The authors would like to acknowledge and thank Dr. Harrold Bockelman at the USDA/ARS Small Grains Laboratory, Aberdeen (ID, USA), for providing the seeds samples.

**Authors contribution statement** RS made the experiments and analyses, wrote the first draft, and incorporated all inputs from co-authors. MK initiated the project. MK, AT, and JN revised the draft and made suggestions for improving the manuscript.

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interests.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

**References**

Bošković J, Bošković M, Prijčić Ž (2008) Accumulations of genes for durable resistance to wheat leaf rust pathogen. *J Agric Sci* 53(3): 163–172. <https://doi.org/10.2298/JAS0803163B>

Dyck PL (1987) The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Genome*. 29(3):467–469. <https://doi.org/10.1139/g87-081>

Dyck PL, Samborski DJ (1979) Adult-plant leaf rust resistance in PI 250413, an introduction of common wheat. *Can J Plant Sci* 59(2): 329–332. <https://doi.org/10.4141/cjps79-053>

Gogól A, Leśniowska-Nowak J, Nowak M, Okoń S, Kowalczyk K (2015) Development of multiplex PCR for *Lr21* and *Pm4b* resistance genes detection in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann UMCS Sectio E LXX(3):21–30*

Herrera-Foessel SA, Singh RP, Huerta-Espino J, Rosewarne GM, Periyannan SK, Viccars L, Calvo-Salazar V, Lan C, Lagudah ES (2012) *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genet* 124(8):1475–1486. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1802-1>

Imbasy IA, Mahmoud MA, Hassan MEM, Abdel-aziz ARM (2014) Identification of leaf rust resistance genes in selected Egyptian wheat cultivars by molecular markers. *Sci World J* 7. <https://doi.org/10.1155/2014/574285>

Kolmer JA, Long DL, Hughes ME (2005) Physiologic specialization of *Puccinia triticea* on wheat in the United States in 2003. *Plant Dis* 89(11):1201–1206. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1201>

Lagudah ES, McFadden H, Singh RP, Huerta-Espino J, Bariana HS, Spielmeyer W (2006) Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor Appl Genet* 114(1):21–30. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0406-z>

Lagudah ES, Krattinger SG, Herrera-Foessel S, Singh RP, Huerta-Espino J, Spielmeyer W, Brown-Guedira G, Selter LL, Keller B (2009) Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theor Appl Genet* 119(5):889–898. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1097-z>

Leśniowska-Nowak J, Gradzielewska A, Majek M (2013) Identification of the gene resistant to leaf rust in selected European wheat cultivars and multiplex PCR development. *Ann UMCS Sect E* 68(3):20–28

Lillemo M, Asalf B, Singh RP, Huerta-Espino J, Chen XM, He ZH, Bjørnstad Å (2008) The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to

- powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theor Appl Genet* 116(8): 1155–1166. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0743-1>
- Martinez F, Niks RE, Singh RP, Rubiales D (2001) Characterization of Lr46, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas*. 135(23):111–114. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00111.x>
- McCallum BD, Fetch T, Chong J (2007) Cereal rust control in Canada. *Aust J Agric Res* 58:639–647. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(12\)60032-4](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(12)60032-4)
- McIntosh RA, Yamazaki Y, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Appels R, Xia XC (2013) Catalogue of gene symbols for wheat: 12th International Wheat Genetics Symposium, 8–13 September 2013, Yokohama, Japan
- Muthe ST, Kulwal PL, Gadekar DA, Jadhav AS (2016) Molecular marker based detection of leaf rust resistance gene *Lr34* in Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australas Plant Pathol* 45(4):369–376. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0423-6>
- Singh RP (1992) Expression of wheat leaf rust resistance gene *Lr34* in seedlings and adult plants. *Plant Dis* 76:489–491
- Singh RP, Mujeeb-Kazi A, Huerta-Espino J (1998) *Lr46*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology*. 88(9):890–894. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.9.890>
- Suenaga K, Singh RP, Huerta-Espino J, Williams HM (2003) Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology*. 93(7):881–890. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.881>
- Sumikova T, Hanzalova A (2010) Multiplex PCR assay to detect rust resistance genes *Lr26* and *Lr37* in wheat. *Czech J Genet Plant* 46(2):85–89. <https://doi.org/10.17221/32/2010-CJGPB>
- Tiwari R, Saharan MS, Chatrath R, Siwach P, Mishra B (2009) STS marker based tracking of slow rusting *Lr34* gene in Indian wheat genotypes. *Indian J Biotechnol* 8:207–213
- Tomkowiak A, Skowrońska R, Weigt D, Kwiatek M, Nawracała J, Kowalczewski PL, Pluta M (2019) Identification of powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* resistance genes in selected wheat varieties and development of multiplex PCR. *Open Chem* 17:157–165. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0024>
- Vida G, Gál M, Uhrin A, Veisz O, Syed NH, Flavell AJ, Wang Z, Bedo Z (2009) Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica* 170:67–74. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9945-0>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**2. Multiplex PCR assay for simultaneous identification of  
*slow rust* resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat  
(*Triticum aestivum* L.)**

**Skowrońska R.**, Tomkowiak A., Justyna Szwarc., Nawracała J.,  
Kwiatek M.

*Journal of Plant Protection Research*, 2020, 60(4) 388-398.

<https://doi.org/10.24425/jppr.2020.134914>

**pkt wg MEiN – 100,000**

ORIGINAL ARTICLE

## Multiplex PCR assay for simultaneous identification of slow rust resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat (*Triticum aestivum* L.)

Roksana Skowrońska\*, Agnieszka Tomkowiak, Justyna Szwarc, Jerzy Nawracała, Michał Kwiatek

Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland

Vol. 60, No. 4: 388–398, 2020

DOI: 10.24425/jppr.2020.134914

Received: June 30, 2020

Accepted: September 3, 2020

\*Corresponding address:

roksana.skowronska@up.poznan.pl

### Abstract

Currently, production of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) that show durable field resistance against fungal pathogens is a priority of many breeding programs. This type of resistance involves race-nonspecific mechanisms and can be identified at adult-plant stages. Until now, seven genes (*Lr34/Yr18*, *Lr46/Yr29*, *Lr67/Yr46*, *Lr68*, *Lr75*, *Lr77* and *Lr78*) conferring durable types of resistance against multiple fungal pathogens have been identified in the wheat gene pool. In this study we showed a multiplex Polymerase Chain Reaction (multiplex PCR) assay, which was developed for detection of slow rusting resistance genes *Lr34*, *Lr46*, *Lr68*, using molecular markers: *csLV34*, *Xwmc44* and *csGS*, respectively. Identification of molecular markers was performed on 40 selected wheat genotypes which are the sources of slow rusting genes according to literature reports. Multiplex PCR is an important tool to reduce the time and cost of analysis. This multiplex PCR protocol can be applicable for genotyping processes and marker assisted resistance breeding of wheat.

**Keywords:** leaf rust, *Lr34*, *Lr46*, *Lr68*, multiplex PCR

## Introduction

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is currently one of the most significant cereal foods in the world, not only in terms of food production, but most of all for providing the total amount of food calories and protein in human diet (Gupta *et al.* 2008). Diseases and pests cause at least 10% of global plant production losses (Chakraborty and Newton 2011). The three fungal pathogens: *Puccinia triticina*, *P. striiformis* f. sp. *tritici*, and *P. graminis* f. sp. *tritici*, causing rust diseases of wheat are the most important biotic constraints to wheat production. Yield losses caused by infection of *P. triticina* may reach 40% in susceptible cultivars, and are the result of lower kernel weight and a decreased number of kernels per head (Knott 1989). The aim of modern wheat resistance breeding is to obtain sufficient resistance to all major diseases to reduce the use

of plant protection products. Breeding for multiple resistance to disease, which can be achieved by introducing slow rusting genes to plants, is a promising strategy.

Presently, more than 80 leaf rust resistance (*Lr*) genes have been identified and described in wheat and its derivatives (McIntosh *et al.* 2017). Gene pyramiding can increase the durability of plant resistance to pathogens. New breeds of pathogens are rapidly emerging, and resistance conferred by racially specific genes becomes ineffective. Therefore, new solutions in plant breeding are desirable and one of them is the introduction of slow rusting genes into varieties (Singh *et al.* 2000). Up to now, seven genes conferring a partial type of resistance in adult plants have been identified in the wheat gene pool. These genes were named *Lr34*

(=Yr18/Sr57/Pm18) (Singh 1992a), *Lr46* (=Yr29/Sr58/Pm39) (Singh *et al.* 1998), *Lr67* (=Yr46/Sr55/Pm46) (Dyck and Samborski 1979), *Lr68* (Herrera-Foessel *et al.* 2012); *Lr75* (Singla *et al.* 2017), *Lr77* (Kolmer *et al.* 2018a) and *Lr78* (Kolmer *et al.* 2018b). Slow rusting genes provide durable resistance against all races of various pathogens including *Puccinia triticina*, *P. striiformis* f. sp. *tritici*, *P. graminis* f. sp. *tritici*, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* that cause leaf rust, stripe rust and powdery mildew, respectively. Slow rusting is a type of resistance characterized by durable resistant of adult plants which is not associated with a mechanism of hypersensitivity reaction as in the case of race specific genes (Bariana *et al.* 2001). The mechanism of slow rusting genes is still not well understood. It has been shown that *Lr34* and *Lr67* encode an ATP-binding cassette transporter and hexose transporter, respectively (Krattinger *et al.* 2009; Moore *et al.* 2015; Dodds and Lagudah 2016). Slow rusting genes ensure plant protection for a long period of growing in an environment favorable to the development of the disease (Johnson and Law 1975). The durable resistance, also known as racially nonspecific immunity, results from an additive effect of minor genes, usually polygenic. Cultivars possessing slow rusting genes show almost the same level of resistance over space and time and the same level of reaction against different races. For example, the 'Frontana' variety, which was registered about half a century ago, still has effective rust resistance in almost all parts of the world (Khan *et al.* 2013). It has been shown that retarded disease progress in plants results from a longer latent period, smaller pustule size, lower receptivity, and slower spore production than a susceptible check (Ohm and Shaner 1976; Wilcoxson 1981; Das *et al.* 1993). Singh *et al.* (2000b) estimated that dozens of slow rusting genes for leaf rust resistance are present in CIMMYT bread wheat germplasm.

Gene *Lr34* was first described in cultivar 'Frontana' by Dyck and Samborski (1966) on the short arm of chromosome 7D. The level of immunity associated with the presence of the *Lr34* gene in plants is best manifested at low average daily temperatures (0–20°C) under field conditions, which allows a significant reduction in disease progression (McIntosh *et al.* 1995). The *Lr34* gene is the most frequently used disease resistance gene in wheat breeding because of its durability and broadspectrum specificity. The *Lr34res* increase the latency period, the percentage of early aborted colonies not associated with cell necrosis and decrease colony size (Rubiales and Niks 1995). Lagudah *et al.* (2006) developed a molecular genetic marker *csLV34* that maps 0.4 cM from *Lr34*. The sequence-tagged-site (STS) marker is widely used for

detection of gene locus in wheat varieties in many countries of the world (Singh *et al.* 2007; Kolmer *et al.* 2008; McCallum *et al.* 2008; Priyamvada *et al.* 2009), but this marker is not diagnostic for some wheat genotypes derived from the Canadian line 'RL4137' (McCallum *et al.* 2008; Lagudah *et al.* 2009).

The second gene involved in slow rusting, *Lr46* was identified in the cultivar 'Pavon' and located on chromosome 1B. To locate the gene, crosses were carried out with a monosomic series of adult plant leaf rust susceptible cultivar 'Lal Bahadur' (Singh *et al.* 1998). The effect of expression of *Lr46* gene is smaller than that of *Lr34* and it also does not provide complete immunity to plants. The presence of the gene is revealed in infected adult plants as a longer disease latency period than the control without this gene (Martinez *et al.* 2001). Lagudah (2011) showed that *Lr46* is more effective in a cooler environment than in higher temperature environments. To date, several markers have been developed to identify the *Lr46* gene in wheat: *Xbarc80* (Lowe *et al.* 2011), *Xgwm259* (Roder 1998), *Xwmc44* (Somers and Isaac 2004) and *csLV46G22* (Lagudah, personal communication 2020). *Lr46* was mapped distal to the microsatellite locus *Xwmc44*, approximately 5–15 cM, and proximal to *Xgwm259*, approximately 20 cM (<https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr46>). Whereas, microsatellite locus *Xbarc80* maps 10–11 cM distal to *Xgwm259* (Lowe *et al.* 2011). The CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) marker *csLV46G22* is the closest linked to *Lr46* gene (Lillemo *et al.* 2013; Ren *et al.* 2017; Cobo *et al.* 2019), among all the above markers.

Herrera-Foessel *et al.* (2012) identified the following slow rusting adult plant resistance (APR) gene, *Lr68* in wheat cultivar 'Parula'. The gene was mapped to a specific gene-rich area on chromosome 7BL between the locus *Psy1-1* (yellow endosperm) and molecular marker *xgwm146*. The origin of the gene is likely to be Brazilian wheat cultivar 'Frontana', which is known for its APR to leaf rust due to the presence of gene *Lr34* and 2–3 additional unidentified slow rusting genes (Singh and Rajaram 1992). Lillemo *et al.* (2011) revealed that the effect of *Lr68* at sites in Uruguay and Argentina was stronger than *Lr34*. Herrera-Foessel *et al.* (2012) recommended two molecular markers for marker-assisted selection of *Lr68*: co-dominant marker *cs7BLNLRR* positioned at 0.8 cM from the gene and the dominant marker *csGs* at 1.2 cM from the gene. The *csGS* marker was used in a bread wheat breeding program of CIMMYT for diagnosing *L68* in the crossing block.

Pinto da Silva *et al.* (2018) reported that pyramiding of slow rusting genes in different combinations in one genotype confers a high or sustainable level of durable resistance to *P. triticina*. Singh *et al.* (2014)

observed that the presence of single APR genes do not confer adequate resistance under high disease pressure, but combinations of four or five such genes usually result in “near immunity”. For this reason, the task of resistance breeding wheat should be to look for sources (genotypes) having more than one slow rust gene. The traditional PCR method which can detect one gene in one reaction is time consuming and expensive. An alternative method may be to use the multiplex Polymerase Chain Reaction (multiplex PCR). Multiplex PCR is a variant of PCR in which two or more loci are simultaneously amplified in one reaction. Multiplex PCR is used to increase the amount of information generated in one assay, and to reduce consumables and labor costs (Henegariu *et al.* 1997). The method was first used in 1988 (Chamberlain *et al.* 1988) and since then has been successfully applied in many areas of DNA testing, including analyses of deletions (Henegariu *et al.* 1994), mutations (Shuber *et al.* 1993) and polymorphisms (Mutirangura *et al.* 1993). The studies reported that the result of multiplex analysis is influenced by some factors (e.g., primer concentration, cycling profile) (Chamberlain *et al.* 1990; Vandenvelde *et al.* 1990). Also, there are specific problems associated with multiplex PCR, including uneven or lack of amplification of some loci and difficulties in reproducing some results (Henegariu *et al.* 1997). Moreover, the development of multiplex PCR assays on plants is difficult due to the large genome sizes and polyploidy. Bread wheat, one of the world’s most important cereal crops (Donini *et al.* 1998), is an allohexaploid with a large and complex genome, comprised of paralogous gene families and about 75% repetitive DNA (Bennett and Smith 1975). For this plant, extensive optimization is required for the multiplex PCR reaction. Therefore, the aim of this study was to develop and optimize a multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three slow rust genes (*Lr34*, *Lr46* and *Lr68*) and use a method to identify these genes in 40 genotypes which according to the literature are carriers of various APR genes.

## Materials and Methods

### Plant material

Plant material consisted of 40 spring wheat *T. aestivum* L. cultivars (Table 1) which had been reported as sources of slow-rusting genes and three reference materials for *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* genes [‘Lr34’ (GSTR 433), ‘Pavon F76’ (PI 520003) and ‘Parula’, respectively], derived from the National Small Grains Collection, the Agriculture Research Station in Aberdeen. Seeds were germinated on Petri dishes and DNA was extracted from the leaf tissue of 10-day-old seedlings with the use of GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx Ltd., Poland). DNA concentration and quality were checked using a DeNovix spectrophotometer (DeNovix Inc., USA) and the samples were diluted with Tris buffer (EURx Ltd., Poland) to a concentration of 50 ng · µl<sup>-1</sup>.

### Development of multiplex PCR and identification of *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* genes

The following molecular markers were used to simultaneously identify the *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* genes: *csLV34*, *Xwmc44* and *csGs*, respectively. In this experiment, we could not use the closer linked *csLV46G22* marker for the *Lr46* gene, because the methodology of using the marker makes it impossible to combine it with the other selected markers (Lagudah, personal communication). Primer sequences, size of expected product and recommended annealing temperature for each molecular marker are presented in Table 2.

In this study, we attempted to create three different multiplex PCR variants for the simultaneous identification of the *Lr34* + *Lr46* + *Lr68* (I variant), *Lr46* + *Lr68* (II variant) and *Lr34* + *Lr68* genes (III variant). Skowrońska *et al.* (2019) developed the multiplex PCR reaction for the *Lr34* + *Lr46* variant. Various options of mix composition and PCR profile of multiplex PCR were tested. The final 27 µl mix composition of

**Table 1.** Primer sequences, size of expected product and recommended annealing temperature for each molecular marker which was used for multiplex PCR

Markers	Primer sequences	Size of products	Annealing temperatures*	Sources
<i>csLV34</i>	csLV34F 5'-GTTGGTTAAGACTGGTGATGG-3';	150 bp (+)	55°C	Lagudah <i>et al.</i> 2006
	csLV34R 5'-TGCTTGCTATTGCTGAATAGT-3'	229 bp (-)		
<i>Xwmc44</i>	WMC44F 5'-GGTCTTCTGGGCTTTGATCCTG-3';	242 bp (+)	61°C	Suenaga <i>et al.</i> 2003
	WMC44R 5'-GTTGCTAGGGACCCGTAGTGG-3'			
<i>csGs</i>	csGS-F 5'-AAGATTGTTACAGATCCATGTCA-3';	385 bp (+)	60°C	Herrera-Foessel <i>et al.</i> 2012
	csGS-R 5'-GAGTATCCGGCTCAAAAAGG-3'			

(+) – size of product indicative of the presence of the gene, (-) – size of band in susceptible genotypes

\*recommended primer annealing temperature according to literature references

**Table 2.** Presence of *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* gene in tested wheat varieties

No.	Cultivar/Genotype	Plant ID	Origin	Pedigree ( <a href="https://npgswebears-grin.gov/gringlobal/search.aspx">https://npgswebears-grin.gov/gringlobal/search.aspx</a> )	linked to <i>Lr34</i>	linked to <i>Lr46</i>	linked to <i>Lr68</i>
1		3	4	5	6	7	8
1	Ceruga-4	PI 560118	United States, Georgia	Coker 916//Tyler/Buck Manantial	-	+	-
2	San Martin	PI 116314	Argentina, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	-	-	-
3	H 51	PI 191925	Argentina, Buenos Aires	Americano 25e/Favorito//Universal	-	-	-
4	Artigas	PI 192535	Uruguay	Americano 25E/Americano 26N	-	-	+
5	Larranaga	PI 191713	Uruguay	Americano 25e/Pelon 33c	-	-	+
6	ProLINTA Imperial NIL Glu-B3i_BuckManant.	PI 674008	United States, California	Buck Manantial//ProLINTA Imperial//*6 ProLINTA Imperial	+	-	-
7	NP 818	PI 422294	India, Delhi	Democrat/C 518//Spaldings Prolific/NP 114/3/E 220 (Kenya C10854)	-	-	-
8	Buck Manantial	PI 344455	Argentina, Buenos Aires	Rafaela MAG/Buck Quequen	-	-	-
9	Janz	PI 591910	Australia, Queensland	3AG3/4*Condor//Cook	+	+	-
10	7536K-51A4	PI 553001	Canada, Saskatchewan	Willet/McMurachy//Glenlea	+	-	-
11	7531-V3D	PI 552994	Canada, Saskatchewan	Glenlea/NB313	+	-	+
12	Jacui	PI 520498	Brazil, Rio Grande do Su	S 8/Toropi	+	+	-
13	P8802-C1*3A2C16	PI 596351	Canada, Saskatchewan	Benito*6/Glenlea//Benito	-	+	-
14	P8802-C1*3A2A2U	PI 596350	Canada, Saskatchewan	Benito*6/Glenlea//Benito	-	+	-
15	HD 2329	PI 648391	India, Delhi	HD 1962/E 4870//K 65/3/HD 1553//UP 262	-	+	-
16	K494	PI 250413	Pakistan	-	-	-	-
17	Glenlea	Cltr 17272	Canada, Manitoba	Pembina*2/Bage//CB 100 CB 100 = Sonora 64/Tezanos Pintos Precoz//Nainari 60	+	+	+
18	Artigas	PI 73046	Uruguay	Americano 25E/Americano 26N	-	-	-
19	Amurskaya 90	PI 592036	Russian Federation, Amurskaja oblast'	Glenlea/Altair 12	-	-	-
20	Jerma Rojo	Cltr 13651	Ciudad de México Mexico	Jerma 50/Yaqui 48//Mario Escobar*2/Supremo 211	+	+	-

**Table 2.** Presence of *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* gene in tested wheat varieties – continuation

1	2	3	4	5	6	78
21	363-11	PI 527696	Canada, Saskatchewan	PI 191320/Glenlea	+	+
22	256-3	PI 527695	Canada, Saskatchewan	PI 191320/Glenlea	-	-
23	NP 846	PI 322263	Delhi India	Rio Negro/NP 760	+	+
24	75M-505-001-001	PI 556464	Canada, Alberta	Bluebird sib/Tobari 66/4/Toropi//Ciano 67/Inia 66 sib/3/Ciano 67/Inia 66 sib	-	-
25	7531-AP5A	PI 552997	Canada, Saskatchewan	Glenlea/NB313	-	+
26	7531-AG5B	PI 552996	Canada, Saskatchewan	Glenlea/NB313	-	-
27	7531-AG5A	PI 552995	Canada, Saskatchewan	Glenlea/NB313	+	+
28	CM 46725-3P-1P-3P-2P	PI 520562	Mexico, Ciudad de México	Zopilote sib/4/Toropi//Ciano/Noroeste 66/3/Bluebird/Ciano/5/Ciano sib/3/ Penjamo 62//Gallo/Bluetit/6/Pavon sib	-	+
29	Cook	PI 442900	Australia, Queensland	Timgalen/Condor sib//Condor	+	+
30	PAT 7219	PI 422416	Brazil, Rio Grande do Sul	512//9280-67//Nobre/Toropi	-	+
31	HI 617	PI 422283	India	selection from C306	-	-
32	Oxley	PI 386167	Australia, Queensland	Penjamo 62/4*Gabo 56//Tezanos Pintos Precoz/Nainari 60/4/2* Lerma Rojo// Norin 10/Brevor 14/3/3*Andes; sister line of Condor; "Norin 10/Brevor 14" = Citr 13253, Norin 10/Brevor, Sel. 14	+	+
33	NP 718	PI 322236	India, Delhi	NP 52/NP 165	-	-
34	San Martin	PI 104137	Argentina, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	-	+
35	A99AR	PI 600923	United States, Minnesota	Glenlea/Zaragoza	+	+
36	Klein San Martin	PI 191884	Argentina, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	-	+
37	H 51	PI 184512	Argentina, Buenos Aires	Americano 25e/Favorito//Universal	-	-
38	San Martin	PI 117500	Argentina, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	-	-
39	San Martin	Citr 8437	Argentina, Buenos Aires	Americano 25E/Pelon 33C	-	+
40	Record	Citr 8399	Argentina, Buenos Aires	Americano 26N/Americano 25E	-	+

multiplex PCR volume in variant I consisted of the following: 12.5  $\mu\text{L}$   $2 \times$  PCR TaqNovaHs PCR Master Mix (Blirt), which included  $2 \times$  concentrated PCR reaction buffer, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1.6 mM dNTPs mix (0.4 mM of each dNTP); 0.8  $\mu\text{L}$  *csLV34* forward primer; 0.8  $\mu\text{L}$  *csLV34* reverse primer; 1.2  $\mu\text{L}$  *Xwmc44* forward primer; 1.2  $\mu\text{L}$  *Xwmc44* reverse primer, 1  $\mu\text{L}$  *csGs* forward primer; 1  $\mu\text{L}$  *csGs* reverse primer (the concentration for each primer was 100  $\mu\text{M}$ ); 2  $\mu\text{L}$  DNA template (50 ng  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) and 6.5  $\mu\text{L}$  PCR grade water. For the II variant, the total volume of the multiplex PCR mix composition was 25.4  $\mu\text{L}$  and consisted of 12.5  $\mu\text{L}$   $2 \times$  PCR TaqNovaHs PCR Master Mix (Blirt), 1.2  $\mu\text{L}$  *Xwmc44* forward primer; 1.2  $\mu\text{L}$  *Xwmc44* reverse primer, 1  $\mu\text{L}$  *csGs* forward primer; 1  $\mu\text{L}$  *csGs* reverse primer, 2  $\mu\text{L}$  DNA template (50 ng  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) and 6.5  $\mu\text{L}$  PCR grade water. For the last, the third variant of the PCR multiplex mixture with a total volume of 24.3  $\mu\text{L}$  contained 12.5  $\mu\text{L}$   $2 \times$  PCR TaqNovaHs PCR Master Mix (Blirt), 0.8  $\mu\text{L}$  *csLV34* forward primer; 0.8  $\mu\text{L}$  *csLV34* reverse primer, 1  $\mu\text{L}$  *csGs* forward primer; 1  $\mu\text{L}$  *csGs* reverse primer, 2  $\mu\text{L}$  DNA template (50 ng  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) and 6.5  $\mu\text{L}$  PCR grade water. The PCR profile was modified with reference to standard protocol and various temperatures recommended for primer annealing were tested (Table 2). The final PCR reaction consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles (denaturation, 94°C for 45 s; primer annealing, 60°C for 30 s; elongation, 72°C for 1 min), followed by the final extension for 7 min at 72°C and storage at 4°C. The multiplex PCR was carried out using Labcycler thermal cyclers (SensQuest GmbH). Amplifications were prepared by adding 1  $\mu\text{L}$  Midori Green Direct (NIPPON Genetics EUROPE) to each tube. The reaction products were separated using 2% agarose (SIGMA) gel in  $1 \times$  TBE buffer (BioShop) at 100 V for 2 h.

In order to simultaneously identify all genes in 40 wheat varieties originating from the National Small Grain Collection, the first variant and the methodology described above were used. Cooling during electrophoretic separation of products was used to obtain clearer results.

## Results and Discussion

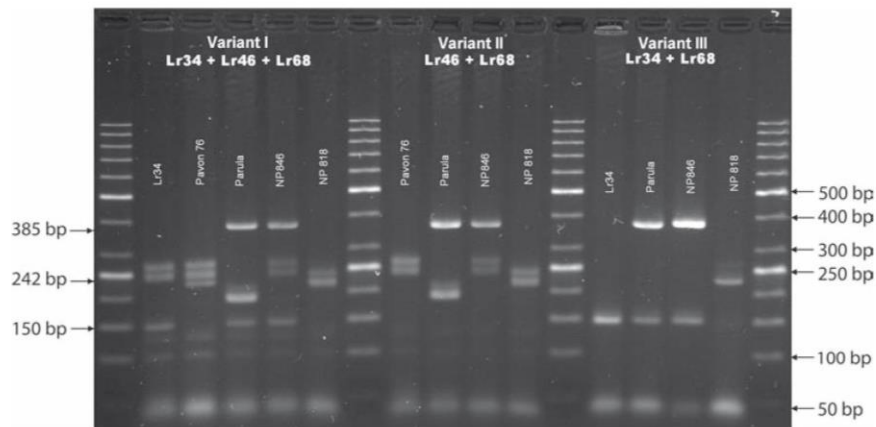
Breeding programs have successfully used molecular markers to assist in the development of varieties with leaf, yellow and stripe rust resistance genes (Alemu 2019). Numerous genes conferring disease resistance to wheat have been identified and used in breeding, but many of these genes have lost their effectiveness due to the emergence of new virulent breeds (Singh *et al.* 2000). Unfortunately, it takes several years to introduce new resistance genes that are effective for new

breeds of the pathogen, mainly due to the long process involved in the establishment of pure breeding wheat lines (Alemu 2019). The solution may be to introduce genes that give durable tolerance to many pathogens to varieties, which, in combination with racial-specific genes, can help minimize the use of fungicides in wheat cultivation.

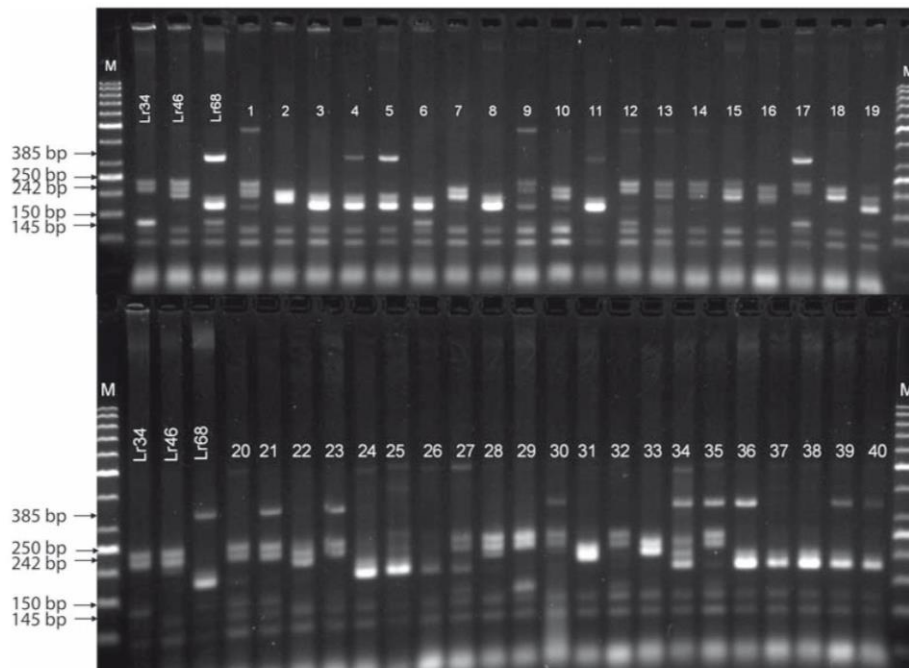
In this experiment, we developed a multiplex PCR method for the simultaneous identification of various combinations of slow rust genes: *Lr34 + Lr46 + Lr68* (variant I), *Lr46 + Lr68* (variant II) and *Lr34 + Lr68* (variant III). Optimization of the method consisted of selecting the appropriate primer volume for all genes in each variant and adjusting the appropriate primer annealing temperature in order to obtain uniformly intense bands on the gel. For this purpose, a smaller volume of the *csLV34* primer was used for each sample than the others, because the primer showed very distinct bands and dominated the others. In addition, the volume of the *Xwmc44* primer in each sample and variant was increased because the bands on the gel were not sufficiently visible when the same volume of all primers was used. There was no effect of changes in the *csGS* primer volume for the *Lr68* gene, at different volumes. The products of all markers were equally visible and readable.

In variant I, in the reference variety 'Lr34', a 145 bp product specific for the *Lr34* gene and a 242 bp product associated with the *Lr46* gene were obtained. In our study, the size of the *Lr34* gene-specific product differed from the size of 150 bp reported by Lagudah *et al.* (2006). Differences in the size of products may result from the size of the DNA ladder used, which was also noted by Skowronska *et al.* (2019). In 'Pavon 76', two products were identified: a 242 bp band, indicating the presence of the *Lr46* gene, and 229 bp band indicating the absence of the *Lr34* gene. In the 'Parula' variety, which is the reference material for the *Lr68* gene, a specific product of the 385 bp *csGS* marker and a 145 bp product indicating the presence of the *Lr34* gene were identified. In variant II (*Lr46 + Lr68*) and variant III (*Lr34 + Lr68*) the above-described results have been confirmed, which indicates that all developed multiplex PCR variants can be used in the selection of materials in the wheat breeding process.

Variant I of the multiplex PCR method that we developed allowed for the identification of the *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* genes in wheat materials that are reported as having slow rust genes. They are characterized by durable resistance, indicating the presence of slow rust genes. For example, the 'Glenlea' variety was registered in 1972 and was the first major variety bearing the *Lr34* gene in western Canada (Evans *et al.* 1972; Dyck *et al.* 1985). In this work, all three slow rust genes (*Lr34 + Lr46 + Lr68*) were identified in the 'Glenlea' variety. In addition, some varieties possessing 'Glenlea' in their



**Fig. 1.** Electropherogram showing the presence of molecular markers *csLV34* (for *Lr34*), *Xwmc44* (for *Lr46*) and *csGS* (for *Lr68*) in wheat varieties. M – GeneRuler 50 bp DNA ladder (Nippon Genetic Europe, Germany)



**Fig. 2.** Electropherogram showing the presence of molecular markers *csLV34* (for *Lr34*), *Xwmc44* (for *Lr46*) and *csGS* (for *Lr68*) in wheat varieties. M – GeneRuler 50 bp DNA ladder (Nippon Genetic Europe, Germany), 1–40 – wheat varieties

pedigree also carry various combinations of genes: ‘A99AR’ and ‘363-11’ (*Lr34* + *L46* + *Lr68*), ‘7531-V3D’ (*Lr34* + *Lr68*), ‘7531-AG5A’ (*Lr34* + *Lr46*), ‘7536K-51A4’ (*Lr34*), ‘P8802-C1\*3A2C16’, ‘P8802-C1\*3A2A2U’ and ‘7531-AP5A’ (*Lr46*) (Table 2, Fig. 2). ‘Lerma Rojo’ is one of the semi dwarf varieties developed at CIMMYT during the green revolution and contributed to yield breakthroughs in India,

Pakistan, Turkey and other parts of the world. ‘Lerma Rojo’ is characterized by a long life span due to its resistance to pathogens (Borlaug 1968). We identified two slow rust genes in the ‘Lerma Rojo’ variety: *Lr34* and *Lr46* (Table 2, Fig. 2). The Oxley variety, whose genealogy includes ‘Lerma Rojo’, also has the *Lr34* and *Lr46* genes (Table 2, Fig. 2). The next variety in which the three slow rust genes have been

identified is the Indian variety 'NP 846', also known as 'New Pusa 846'. So far, NP 846 was known to have gene *Lr34* (Kaur *et al.* 2000; Kolmer *et al.* 2008). In summary, the *Lr34* gene was identified in 13 of the 40 varieties tested, the *Lr46* gene in 17 varieties, and the *Lr68* gene in 12 varieties. In four varieties all three tested genes were identified, and in eight varieties the presence of two tested genes in one variety was detected. In 14 varieties none of the slow rust genes were identified (Table 2, Fig. 2). Altieri *et al.* (2008) determined the number and characterization of resistance genes to wheat leaf rust present in 'Buck Manantial', an Argentinian cultivar that shows durable resistance. They also used closely linked marker *csLV34* to *Lr34* to detect the presence of this resistance gene in 'Buck Manantial' as hypothesized by Dyck (1989). As a result of the study conducted by the authors, the presence of the gene could not be confirmed in Buck Manantial based on the allele detected by this molecular marker. In our study, we also did not identify any slow rust gene in the 'Buck Manantial' variety, although, according to other sources, the cultivar has the *Lr34* gene (McIntosh *et al.* 1995; McIntosh *et al.* 2008; McCallum 2012) (Table 2, Fig. 2).

In the literature one can find many examples of the development the multiplex PCR method to identify resistance genes. Leśniowska-Nowak *et al.* (2013) developed a multiplex PCR method to identify two resistance genes for leaf rust *Lr9* and *Lr19*. Other race specific resistance genes for *P. triticina*, *Lr29* and *Lr37* were identified simultaneously by Sumikova and Hanzalova (2010). Gogól *et al.* (2015) used the multiplex PCR method to simultaneously identify genes of resistance to two different diseases: *Lr21* (leaf rust) and *Pm4b* (powdery mildew). Tomkowiak *et al.* (2019a) identified the *Pm2*, *Pm3a*, *Pm4b*, and *Pm6* genes and developed multiplex PCR reaction conditions for simultaneous identification of *Pm2* and *Pm4b* genes. The multiplex PCR conditions have been developed for the simultaneous identification of the *Lr11 + Lr16* and *Lr11 + Lr26* gene pairs by Tomkowiak *et al.* (2019b). The method of simultaneous identification for slow rusting genes *Lr34* and *Lr46* was developed by Skowrońska *et al.* (2019). The authors also used a smaller volume of the *csLv34* primer and a larger volume of the *Xwmc44* primer, and their method may complement the results of the above work.

Moreover, there are many examples of the use of multiplex to identify other genes in wheat. Zhang *et al.* (2008) developed two multiplex PCR assays targeting improvement of bread-making and noodle qualities in common wheat that validated using 70 cultivars and advanced lines from Chinese autumn-sown

wheat regions. Wang *et al.* (2010) identified genes at Glu-A3 locus, developed the STS markers, and established multiplex PCR with the STS markers for Glu-A3 alleles. The multiplex PCR system was validated on 141 CIMMYT wheat varieties and advanced lines with different Glu-A3 alleles, confirming that they can be efficiently used in marker-assisted breeding. Moczulski and Salmanowicz (2003) used the multiplex PCR method to identify the allele composition of HMW glutenin complex Glu-1 loci (Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1) in common wheat genotypes. Compared to conventional PCR techniques that allow the identification of single resistance genes, multiplex PCR is a method that can simultaneously detect multiple resistance genes in one system with high sensitivity and specificity. Consequently, multiplex PCR is a more appropriate and less time-consuming method of detecting several resistance genes (Ballabio *et al.* 1990). In addition, the multiplex PCR method provides the basis for the future development of a quantitative and more sensitive PCR method using real-time PCR technology (Côté *et al.* 2004). The multiplex PCR method is a convenient tool for selecting materials in plant breeding. The method presented in this article can be successfully used to simultaneously identify the *L34*, *Lr46* and *Lr68* genes. Moreover, additional variants of the method allowing for the simultaneous identification of the *Lr46* and *Lr68* genes as well as the *Lr34* and *Lr68* genes can also be a helpful tool in plant breeding. Varieties containing slow rust type genes, identified in the test using the multiplex PCR method can provide APR resistance genes for breeding wheat or other cereal species.

## Conclusions

In summary, a multiplex PCR method was developed for the simultaneous identification of different combinations of slow rusting genes: *Lr34 + L46 + Lr68*, *Lr34 + Lr68* and *Lr46 + Lr68*. This method can be applicable for the genotyping process and marker assisted selection for breeding programs of wheat.

## Acknowledgements

The authors would like to acknowledge and thank Dr. Harrold Bockelman at the USDA/ARS Small Grains Laboratory, Aberdeen (ID, USA) for providing the seeds of wheat accessions. In addition, we would like to thank all of the reviewers and manuscript editor for their careful review of the manuscript and for their excellent suggestions for improving our initial work.

## References

- Alemu G. 2019. Wheat breeding for disease resistance. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 4 (2): 000141. DOI: <https://doi.org/110.23880/oajmb-16000142>
- Altieri E., McCallum B., Somers D.J., Sacco F. 2008. Inheritance and genetic mapping of leaf rust resistance genes in the wheat cultivar Buck Manantial. In: *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium* (R. Appels, R. Eastwood, E. Lagudah, P. Langridge, M. Mackay, L. McIntyre, P. Sharp, eds.). Brisbane QLD, AU.
- Ballabio A., Ranier J.E., Chamberlain J.S., Zollo M., Caskey C.T. 1990. Screening for steroid sulfatase (STS) gene deletions by multiplex DNA amplification. *Human Genetics* 84 (6): 571–573. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00210812>
- Bariana H.S., Hayden M.J., Ahmad N.U., Bell J.A., Sharp P.J., McIntosh R.A. 2001. Mapping of durable adult plant and seedling resistance to stripe and stem rust disease in wheat. *Australian Journal of Agriculture Research* 52 (12): 1247–1255. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0240-x>
- Bennett M.D., Smith J.B. 1975. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 274 (933): 227–274. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.1976.0044>
- Borlaug N.E. 1968. Wheat breeding and its impact on world food supply. s. 1–36. In: *Proceedings of the 3rd International Wheat Genetics Symposium*. 5–9 August 1968, Canberra, AU
- Chakraborty S., Newton A.C. 2011. Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology* 60 (1): 2–14. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02411.x>
- Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Nguyen P.N., Caskey C.T. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* 16: 11141–11156. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/16.23.11141>
- Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Caskey J.E. 1990. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. p. 272–281. In: *“PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications”* (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds.). Academic Press, San Diego, USA.
- Cobo N., Wanjugi H., Lagudah E., Dubcovsky J. 2019. A high-resolution map of wheat QYr.ucw-1BL, an adult plant stripe rust resistance locus in the same chromosomal region as Yr29. *Plant Genome* 12: 180055. DOI: <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.08.0055>
- Côté M.J., Tardif M.C., Meldrum A.J. 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease* 88 (11): 1219–1225. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.11.1219>
- Das M.K., Rajaram S., Kronstad W.E., Mundt C.C., Singh R.P. 1993. Associations and genetics of three components of slow rusting in leaf rust of wheat. *Euphytica* 68 (1–2): 99–109. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00024159>
- Dodds P.N., Lagudah E.S. 2016. Starving the enemy. *Science* 354: 1377–1378. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aal4273>
- Donini P., Stephenson P., Bryan G.J., Koebner R.M.D. 1998. The potential of microsatellites for high throughput genetic diversity assessment in wheat and barley. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 415–421. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008612917967>
- Dyck P.L. 1989. The inheritance of leaf rust resistance in wheat cultivars Kenyon and Buck Manantial. *Canadian Journal of Plant Sciences* 69: 1113–1117. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjps89-134%20AGR:%20IND90021723>
- Dyck P.L., Samborski D.J. 1979. Adult-plant leaf rust resistance in PI 250413, an introduction of common wheat. *Canadian Journal of Plant Sciences* 59 (2): 329–332. <https://doi.org/10.4141/cjps79-053>
- Dyck P.L., Samborski D.J., Martens J.W. 1985. Inheritance of resistance to leaf rust and stem rust in the wheat cultivar Glenlea. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7 (4): 351–354. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.505>
- Evans L.E., Shebeski L.H., McGinnis R.C., Briggs K.G., Zuzens D. 1972. Glenlea red spring wheat. *Canadian Journal of Plant Sciences* 52 (6): 1081–1082. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjps72-184>
- Gogól A., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Okoń S., Kowalczyk K. 2015. Development of multiplex PCR for *Lr21* and *Pm4b* resistance genes detection in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio E. Agricultura LXX* (3): 21–30.
- Gupta P.K., Mir R.R., Mohan A., Kumar J. 2008. Wheat genomics: present status and future prospects. *International Journal of Plant Genomics* 2008: 1–37. DOI: <https://doi.org/10.1155/2008/896451>
- Henegariu O., Hirschmann P., Kilian K., Kirsch S., Lengauer C., Maiwald R., Mielke K., Vogt P. 1994. Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia* 26: 97–106. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1994.tb00765.x>
- Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23: 504–511. DOI: <https://doi.org/10.2144/97233rr01>
- Herrera-Foessel S.A., Singh R.P., Huerta-Espino J., Rosewarne G.M., Periyannan S.K., Viccars L., Calvo-Salazar V., Lan C., Lagudah E.S. 2012. *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 124 (8): 1475–1486. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1802-1>
- Johnson R., Law C.N. 1975. Genetic control of durable resistance to yellow rust (*Puccinia striiformis*) in the wheat cultivar Hybride de Bersee. *Annals of Applied Biology* 81: 385–391. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1975.tb01654.x>
- Kaur M., Saini R.G., Preet K. 2000. Adult plant leaf rust resistance from 111 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Euphytica* 113 (3): 235–243. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1003913004580>
- Khan M.H., Bukhari A., Dar Z.A., Rizvi S.M. 2013. Status and strategies in breeding for rust resistance in wheat. *Agricultural Sciences* 4 (06): 292. DOI: <https://doi.org/10.4236/as.2013.46042>
- Knott D.R. 1989. The wheat rust – breeding for resistance. In: *“Monographs on Theoretical and Applied Genetics”*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 201 pp. DOI: 10.1007/978-3-642-83641-1
- Kolmer J.A., Bernardo A., Bai G., Hayden M.J., Chao S. 2018b. Adult plant leaf rust resistance derived from Toropi wheat is conditioned by *Lr78* and three minor QTL. *Phytopathology* 108 (2): 246–253. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHTO-07-17-0254-R>
- Kolmer J.A., Singh R.P., Garvin D.F. 2008. Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Sciences* 48 (4): 1841–1852. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.08.0474>
- Kolmer J.A., Su Z., Bernardo A., Bai G., Chao S. 2018a. Mapping and characterization of the new adult plant leaf rust resistance gene *Lr77* derived from Santa Fe winter wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 131 (7): 1553–1560. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3097-3>
- Krattinger S.G., Lagudah E.S., Spielmeier W., Singh R.P., Huerta-Espino J., McFadden H. 2009. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323: 1360–1363. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1166453>
- Lagudah E.S. 2011. Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat. *Euphytica* 179 (1): 81–91. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0336-3>
- Lagudah E.S., Krattinger S.G., Herrera-Foessel S. 2009. Gene specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which

- confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics* 19: 889–898. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1097-z>
- Lagudah E.S., McFadden H., Singh R.P., Huerta-Espino J., Bariana H.S., Spielmeier W. 2006. Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 21–30. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0406-z>
- Leśniowska-Nowak J., Gradzielewska A., Majek M. 2013. Identification of the gene resistant to leaf rust in selected European wheat cultivars and multiplex PCR development. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio E.* 68 (3): 20–28.
- Lillemo M., Joshi A.K., Prasad R., Chand R., Singh R.P. 2013. QTL for spot blotch resistance in bread wheat line Saar co-locate to the biotrophic disease resistance loci *Lr34* and *Lr46*. *Theoretical and Applied Genetic* 126 (3): 711–719. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-012-2012-6>
- Lillemo M., Singh R.P., William M., Herrera-Foessel S., Huerta-Espino J., German S., Campos P., Chaves M., Madriaga R., Xia X.C., Liang S.S. 2011. Multiple rust resistance and gene additivity in wheat: lessons from multi-location case studies in cultivars Parula and Saar. p. 111–120. In: “Borlaug Global Rust Initiative (BGRI) 2011 Technical Workshop”. 13–16 June 2011, St. Paul, Minnesota, USA.
- Lowe I., Jankuloski L., Chao S., Chen X., See D., Dubcovsky J. 2011. Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly virulent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 123: 143–157. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1573-0>
- Martinez F., Niks R.E., Singh R.P., Rubiales D. 2001. Characterization of *Lr46*, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas* 135 (2–3): 111–114. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00111.x>
- McCallum B.D., Humphreys D.G., Somers D.J. 2012. Allelic variation for the rust resistance gene *Lr34/Yr18* in Canadian wheat cultivars. *Euphytica* 183 (2): 261–274. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0519-6>
- McCallum B.D., Somers D.J., Humphreys D.G., Cloutier S. 2008. Molecular marker analysis of *Lr34* in Canada western red spring wheat cultivars. p. 137–140. In: *Proceedings of 11th International Genetics Symposium* (R. Appels, R. Eastwood, E. Lagudah, P. Langridge, M. Mackay Lynne, eds.). Brisbane, AU.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Xia X.C. 2017. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 supplement. Available on: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf>
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. (eds.) 1995. *Wheat Rust. An Atlas of Resistance Genes*. Springer Netherlands, AU, 200 pp.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. 2008. Catalogue of gene symbols for wheat: 2008. *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium*. 24–29 August 2008, Brisbane, AU.
- Moczulski M., Salmanowicz B.P. 2003. Multiplex PCR identification of wheat HMW glutenin subunit genes by allele-specific markers. *Journal of Applied Genetics* 44 (4): 459–472.
- Moore J.W., Herrera-Foessel S., Lan C., Schnippenkoetter W., Ayliffe M., Huerta-Espino J., Lillemo M., Viccars L., Milne R., Periyannan S., Kong X., Spielmeier W., Talbot M., Bariana H., Patrick J.W., Dodds P., Singh R. and Lagudah E. 2015. A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* 47: 1494–1498. DOI: <https://www.doi.org/10.1038/ng.3439>
- Mutirangura A., Greenberg F., Butler M.G., Malcolm S., Nicholls R.D., Chakravarti A., Ledbetter D.H. 1993. Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11–q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Human Molecular Genetics* 2 (2): 143–151. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/2.2.143>
- Ohm H.W., Shaner G.E. 1976. Three components of slow-rusting at different growth stages in wheat. *Phytopathology* 66: 1356–136. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-66-1356>
- Pinto da Silva G.B., Zanella C.M., Martinelli J.A., Chaves M.S., Hiebert C.W., McCallum B.D., Boyd L.A. 2018. Quantitative trait loci conferring leaf rust resistance in hexaploid wheat. *Phytopathology* 108 (12): 1344–1354. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-18-0208-RVW>
- Priyamvada T.R., Saharan M.S., Chatrath R. 2009. STS marker based tracking of slow rusting *Lr34* gene in Indian wheat genotypes. *Indian Journal of Biotechnology* 8: 207–213.
- Ren Y., Singh R.P., Basnet B.R., Lan C.X., Huerta-Espino J., Lagudah E.S., Ponce-Molina L.J. 2017. Identification and mapping of adult plant resistance loci to leaf rust and stripe rust in common wheat cultivar Kundan. *Plant Disease* 101: 456–463. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0890-RE7>
- Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007–2023.
- Rubiales D., Niks R.E. 1995. Characterization of *Lr34*, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust. *Plant Disease* 79: 1208–1212. DOI: <https://www.doi.org/10.1094/PD-79-1208>
- Shuber A.P., Skoletsky J., Stern R., Handelin B.L. 1993. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Human Molecular Genetics* 2: 153–158.
- Singh D., Park R.F., McIntosh R.A. 2007. Characterisation of wheat leaf rust resistance gene *Lr34* in Australian wheats using components of partial resistance and molecular markers. *Australian Journal of Agriculture Research* 58: 1106–1114. DOI: <https://doi.org/10.1071/AR07002>
- Singh R.P. 1992. Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat. *Phytopathology* 82 (8): 835–838. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-835>
- Singh R.P., Rajaram S. 1992. Genetics of adult-plant resistance of leaf rust in ‘Frontana’ and three CIMMYT wheats. *Genome* 35 (1): 24–31. DOI: <https://doi.org/10.1139/g92-004>
- Singh R.P., Herrera-Foessel S., Huerta-Espino J., Singh S., Bhavani S., Lan C., Basnet B.R. 2014. Progress towards genetics and breeding for minor genes based resistance to Ug99 and other rusts in CIMMYT high-yielding spring wheat. *Journal of Integrative Agriculture* 13 (2): 255–261. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60649-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60649-8)
- Singh R.P., Mujeeb-Kazi A., Huerta-Espino J. 1998. *Lr46*: A gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88: 890–894. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.9.890>
- Singh R.P., Nelson J.C., Sorrells M.E. 2000. Mapping *Yr28* and other genes for resistance to stripe rust in wheat. *Crop Science* 40 (4): 1148–1155. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4041148x>
- Singla J., Lüthi L., Wicker T., Bansal U., Krattinger S.G., Keller B. 2017. Characterization of *Lr75*: a partial, broad-spectrum leaf rust resistance gene in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 130 (1): 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2784-1>
- Skowrońska R., Kwiatek M., Tomkowiak A., Nawracała J. 2019. Development of multiplex PCR to detect slow rust resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *Journal of Applied Genetics* 60 (3–4): 301–304. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z>
- Somers D.J., Isaac P. 2004. SSRs from the Wheat Microsatellite Consortium. Available on: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSR/WMC/>
- Suenaga K., Singh R.P., Huerta-Espino J., William H.M. 2003. Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quan-

- titative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology* 93 (7): 881–890. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.881>
- Sumíková T., Hanzalova A. 2010. Multiplex PCR assay to detect rust resistance genes *Lr26* and *Lr37* in wheat. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 46 (2): 85–89. DOI: <https://doi.org/10.17221/32/2010-CJGPB>
- Tomkowiak A., Skowrońska R., Buda A., Kurasiak-Popowska D., Nawracała J., Kowalczewski P.Ł., Pluta M., Radzikowska D. 2019b. Identification of leaf rust resistance genes in selected wheat cultivars and development of multiplex PCR. *Open Life Sciences* 14 (1): 327–334. DOI: <https://doi.org/10.1515/biol-2019-0036>
- Tomkowiak A., Skowrońska R., Weigt D., Kwiatek M., Nawracała J., Kowalczewski P.Ł., Pluta M. 2019a. Identification of powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* resistance genes in selected wheat varieties and development of multiplex PCR. *Open Chemistry* 17 (1): 157–165. DOI: <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0024>
- Vandenvelde C., Verstraete M., Van Beers D. 1990. Fast multiplex polymerase chain reaction on boiled clinical samples for rapid viral diagnosis. *Journal of Virology* 30: 215–227.
- Wang L., Li G., Peña R.J., Xia X., He Z. 2010. Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for Glu-A3 alleles in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science* 51 (3): 305–312.
- Wilcoxson R.D. 1981. Genetics of slow rusting in cereals. *Phytopathology* 71 (9): 989–993. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-71-989>.
- Zhang X.K., Liu L., He Z.H., Sun D.J., He X.Y., Xu Z.H., Xia X.C. 2008. Development of two multiplex PCR assays targeting improvement of bread-making and noodle qualities in common wheat. *Plant Breeding* 127 (2): 109–115.

**3. Molecular identification of *slow rusting* resistance  
*Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale ( $\times$  *Triticosecale*  
Wittmack) cultivars**

**Skowrońska R., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M.**

*Journal of Applied Genetics*, 2020, 61, 359-366.

<https://doi.org/10.1007/s13353-020-00562-8>

**IF – 3,240; pkt wg MEiN – 140,000**



## Molecular identification of slow rusting resistance *Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale ( $\times$ *Triticosecale* Wittmack) cultivars

Roksana Skowrońska<sup>1</sup> · Agnieszka Tomkowiak<sup>1</sup> · Jerzy Nawracała<sup>1</sup> · Michał T. Kwiatek<sup>1</sup>

Received: 12 March 2020 / Revised: 4 May 2020 / Accepted: 12 May 2020 / Published online: 18 May 2020  
© The Author(s) 2020

### Abstract

Recently, leaf rust and yellow rust caused by the fungi *Puccinia triticina* Erikss. and *P. striiformis* Westend f. sp. *tritici* Eriks and Henn are diseases of increasing threat in triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack, AABBRR,  $2n = 6x = 42$ ) growing areas. The use of genetic resistance is considered the most economical, effective and environmentally friendly method to control the disease and minimize the use of fungicides. Currently, breeding programs mainly relied on race-specific *Lr* and *Yr* genes (*R*), but new races of the rust fungi frequently defeat resistance. There is a small group of genes that causes partial type of resistance (*PR*) that are characterized by a slow epidemic build up despite a high infection type. In wheat slow rusting resistance genes displayed longer latent periods, low infection frequencies, smaller pustule size and less spore production. Slow rusting *Lr46/Yr29* gene, located on chromosome 1B, is being exploited in many wheat breeding programs. So far, there is no information about slow rusting genes in triticale. This paper showed significant differences between the results of identification of wheat molecular markers *Xwmc44* and *csLV46G22* associated with *Lr46/Yr29* in twenty triticale cultivars, which were characterized by high levels of field resistance to leaf and yellow rust. The *csLV46G22res* marker has been identified in the following cultivars: Kasyno, Mamut and Puzon. Belcanto and Kasyno showed the highest resistance levels in three-year (2016–2018), leaf and yellow rust severity tests under post-registration variety testing program (PDO). Leaf tip necrosis, a phenotypic trait associated with *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* was observed, among others, to Belcanto and Kasyno, which showed the highest resistance for leaf rust and yellow rust. Kasyno could be considered to have *Lr46/Yr29* and can be used as a source of slow rust resistance in breeding and importantly as a component of gene pyramiding in triticale.

**Keywords** *csLV46G22* · Molecular markers · *Lr46* · Leaf tip necrosis · Slow rusting · Triticale · *Xwmc44*

### Introduction

Triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack,  $2n = 6x = 42$ , AABBRR genomes) is a man-made amphiploid hybrid produced from the crossing of female parent hexaploid or tetraploid wheat (*Triticum* sp.) and male parent rye (*Secale cereale* L.) (Ammar et al. 2004). It is mostly used in animal feed and biofuel production (Feuillet et al. 2008; McGoverin et al. 2011; Martinek et al. 2008). Triticale, since its commercialization, has shown good resistance to a wide spectrum of

pathogens, especially to rusts (Mergoum et al. 2004). As the triticale area harvested has increased, new races of pathogens have adapted to this host (Oettler 2005) and have led to the rapid erosion of effective resistance genes. Leaf rust is one of the most important diseases of wheat (Kolmer 2005), but the pathogen has also been reported on triticale crops (Sodekiewicz and Strzembicka 2004). Leaf rust on triticale is caused by pathotypes of the wheat leaf rust pathogen *Puccinia triticina* that have become virulent to triticale genotypes (Sodekiewicz et al. 2008; Mikhailova et al. 2009). Triticale is annually infected by the same spectrum of pathogens as its parents—wheat and rye (Audenaert et al. 2014). To minimize the use of plant protection products, it is necessary to search for and introduce new sources of resistance to varieties. The genetic origin of leaf rust resistance genes in triticale has been studied by several authors. Singh and McIntosh (1990) showed that leaf rust resistance in five triticale varieties was controlled by a single gene designated

Communicated by: Izabela Pawłowicz

✉ Michał T. Kwiatek  
michal.kwiatek@up.poznan.pl

<sup>1</sup> Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str, 60-632 Poznań, Poland

*LrSatu*. Wilson and Shaner (1989) studied the inheritance of resistance to culture 7434–1-1 T of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in four triticales that were selected as potential sources of resistance genes for wheat and described genes for hypersensitive resistance and slow rusting genes in triticale. In Poland, Grzesik and Strzembicka (2003) analyzed leaf rust resistance in three triticale cultivars and showed that the resistance of these cultivars was controlled by the hypersensitive resistance genes described by Wilson and Shaner (1989). Singh and Saari (1991) identified four resistance genes in three genotypes and two additional genes in triticale in Mexico. Stuchlíková and Bartos (1980) analyzed the genetics of resistance to leaf rust in five varieties of triticale in F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> and postulated five different genes for resistance to leaf rust. Mikhailova et al. (2009) tested 416 triticale from the Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry and identified 17 leaf rust resistant cultivar. Hanzalová and Bartoš (2011) studied resistance of triticale to wheat leaf rust and analyzed whether specific differences in virulence exist between wheat leaf rust isolates attacking wheat and isolates attacking triticale. They found that leaf rust isolates from triticale were virulent to a higher number of triticale cultivars than isolates collected from wheat.

One of the most effective and environmentally sound method to control disease is breeding resistant varieties (Dinh et al. 2020). To date, more than 80 genes and alleles of leaf rust resistance (*Lr*) have been identified and described (McIntosh et al. 2017), but most of this genes are race-specific for hypersensitive resistance (HR). HR genes are very effective in reducing the epidemic build up and easy to introduce in breeding programs because of their monogenic nature, but the resistance provided by these genes can be short-lived as new races of pathogen continue to evolve (Martinez et al. 2001). Kroupin et al. (2019) analyzed the collection of spring triticale accessions for the presence of genes *Lr9*, *Lr12*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29* and *Lr47* with the use of molecular markers and isogenic lines carrying target genes. They showed that the gene pool of spring triticale is extremely depleted in leaf rust resistance genes and therefore necessitating work on the introgression of new resistance genes both from the known donor lines of triticale and from bread wheat. It is necessary to search for new sources of resistance or improving intrinsically resistance by gene pyramiding or by use of multilines (McCallum et al. 2007). Another possibility is to incorporate genes that provide partial type of resistance (PR), also known as slow rusting genes or adult plant resistance (APR). PR is a polygenic trait (Parlevliet 1979; Qi et al. 1998) characterized by slow disease progress in the field despite a compatible host reaction (Caldwell 1968). Adult plant resistance (APR) have historically been more durable than race-specific genes (Boyd 2006; Krattinger et al. 2009; Lowe et al. 2011). Slow rusting resistance genes have small to intermediate effects when present alone, so a higher level of resistance is obtained by

combining several genes (Singh et al. 2000). In wheat at least seven leaf rust resistance genes are known as slow rusting genes: *Lr34/Yr18* (Singh 1992), *Lr46/Yr29* (Singh et al. 1998), *Lr67/Yr46* (Dyck and Samborski 1979), *Lr68* (Herrera-Foessel et al. 2012), *Lr75* (Singla et al. 2017), *Lr77* (Kolmer et al. 2018a) and *Lr78* (Kolmer et al. 2018b). *Lr34/Yr18* is the leaf rust APR gene with the longest history of resistance, because it has remained effective for almost 100 years (Ellis et al. 2014). *Lr34/Yr18* is the best known slow rusting gene so far. It encodes a modified ATP-binding cassette transporter (Krattinger et al. 2009), and it has been reported to cause an increase in latency period, in percentage of early aborted colonies not associated with cell necrosis and a decrease of colony size (Rubiales and Niks 1995).

*Lr46/Yr29* is the second named gene involved in slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Lr46/Yr29* has provided partial APR to leaf and stripe rust for more than 60 years (Kolmer et al. 2015). It was first described in cultivar Pavon 76 and located on long arm of chromosome 1B (Singh et al. 1998). The effect of *Lr46/Yr29* is similar, but smaller than that of *Lr34/Yr18* in adult plants (Martinez et al. 2001). Lagudah (2011) indicated that *Lr46/Yr29* is more effective in cooler environments and the presence of other *Lr* genes may influence expression of *Lr46/Yr29*. William et al. (2003) found that *Lr46* is linked or pleiotropic to *Yr29* stripe rust resistance gene. Similarly, the close linkage of *Lr34* slow rusting gene to *Yr18* stripe rust resistance gene was identified as well. Wheat genotypes with gene *Lr46/Yr29* were also determined to have stem rust *Sr58* resistance gene (Singh et al. 2013) and powdery mildew (*Pm39*) resistance gene (Lillemo et al. 2008).

Both genes (*Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29*) are associated with a specific phenotypic trait, leaf tip necrosis (LTN) (Singh 1992; Rosewarne et al. 2006). The symptoms could be described as a dying back of the flag leaf from the tip of the leaf (Fig. 1). Leaf tip necrosis is observed to some extent in all wheat varieties containing the leaf rust gene resistance gene *Lr34*. The LTN trait was described by Singh (1992) to be associated with *Lr34/Yr18* locus by investigating a number of crosses between *Lr34/Yr18*/LTN positive lines and *Lr34/*



**Fig. 1** Symptoms of leaf tip necrosis on the flag leaf of Kasyno (up) compared with flag leaf of Grenado (down)

*Yr18/LTN* negative lines. It was confirmed by Schnurbusch et al. (2004) in winter bread wheat cv. “Forno,” which has a *Lr34* locus associated with LTN. Rosewarne et al. (2006) used field assays to score for both leaf and yellow rust in an Avocet-*YrA* × Attila population that segregates for several slow rusting leaf and yellow rust resistance genes. What is interesting, the offspring population segregated for LTN, which was interpreted as pleiotropic or closely linked to the *Lr46/Yr29* locus, and *Ltn2* gene was suggested designation to this locus (Rosewarne et al. 2006).

So far, there is no information about slow rusting genes in triticale. Wheat cultivars with slow rusting resistance genes displayed longer latent periods, low infection frequencies, smaller pustule size and less spore production. Considering the location of slow rust genes on wheat chromosomes, there is a presumption that it is possible to identify the *Lr46/Yr29*, *Lr68*, *Lr75* and *Lr77* genes (located on 1BL; 7BL; 1BS and 3BL chromosomes, respectively) in the triticale varieties. Other slow rusting genes—*Lr34/Yr18*, *Lr67/Yr46* and *Lr78* are located on the D genome (7DS, 4DL and 5DS, respectively), which is not present in the triticale genotype. It is entirely possible, that wheat donors of *Lr46/Yr29* gene were used in triticale breeding programs. The cross of the hexaploid triticale with and hexaploid bread wheat carrying *Lr46* (e.g., Pavon 76), followed by further backcross to triticale could explain its presence in triticale cultivars. It is reported that various wheat-rye translocation lines have been developed to increase genetic variation in wheat and triticale genomes, especially to transfer disease resistance genes and to improve grain yield (Kwiatkiewicz and Nawracala 2018). For example, Pavon IRS near isogenic lines, such as “Pavon 76,” “Pavon IRS<sub>(K)</sub>.1AL,” “Pavon IRS<sub>(K)</sub>.1BL” and “Pavon IRS<sub>(K)</sub>.1DL” developed by Lukaszewski (1993, 2000) are widely used in breeding programs of wheat and triticale (Waines and Ehdai 2007). The second alternative is the presence of *Lr46* in the tetraploid parent used to develop primary triticale (Herrera-Foessel et al. 2012, Li et al. 2020).

Several molecular markers have been developed for *Lr46/Yr29* identification. At first, this locus was mapped on the long arm of 1B chromosome using AFLP markers (Wilson and Shaner 1989). Suenaga et al. (2003) revealed that the microsatellite locus *Xwmc44* is located 5.6 cm proximal to the putative QTL for *Lr46/Yr29*. Moreover, it is reported that *Lr46/Yr29* locus was mapped distal to *Xwmc44*, approximately 5–15 cm, and proximal to *Xgwm259*, approximately 20 cm (<https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr46>). Microsatellite locus *Xbarc80* is located 10–11 cm distal to *Xgwm259* and is recommended as an alternative distal marker (Lowe et al. 2011). Lagudah et al. (2009, personal communication) developed a cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) *csLV46G22* marker which is reported as the closest marker for the *Lr46/Yr29* gene, so far (Cobo et al. 2019, Lillemo et al. 2008, Ren et al. 2017). Among all

markers available, two closest markers (*Xwmc44* and *csLV46G22*) linked to *Lr46/Yr29* were chosen in this study to postulate the presence of *Lr46/Yr29* gene in fourteen winter and six spring Polish cultivars of triticale.

## Materials and methods

This study was performed on twenty Polish triticale cultivars derived from Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o. breeding company (Table 1). Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. “Pavon F76” (PI 520003) derived from the National Small Grains Collection, the Agriculture Research Station in Aberdeen, was the reference material.

DNA was isolated from the leaves of 10-day-old seedlings with the use of GeneMATRIX Plant and Fungi DNA Purification Kit (EURx Ltd., Poland). DNA concentration and quality was determined using the DeNovix spectrophotometer (DeNovix Inc., USA). The samples were diluted with Tris buffer (EURx Ltd., Poland) to obtain a uniform concentration of 50 ng/μL. To identify the *Lr46/Yr29* gene, the molecular markers *Xwmc44* and *csLV46G22* was used. The sequences of primers are as follows: *Xwmc44F* 5'-GGT CTT CTG GGC TTT GAT CCT G-3' and *Xwmc44R* 5'-GTT GCT AGG GAC CCG TAG TGG-3'. The CAPS marker *csLV46G22* tightly linked to *Lr46/Yr29* was kindly provided by Dr. Evans Lagudah, CSIRO Plant Industry, Canberra, Australia (personal communication, 2020). The 25 μL polymerase chain reaction (PCR) mixture for *Xwmc44* and *csLV46G22* consisted of the following: 12.5 μL 2x PCR TaqNovaHs PCR Master Mix (Bliert, Poland), which included 2x concentrated PCR reaction buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.6 mM dNTPs mix (0.4 mM of each dNTP); 1 μL *Xwmc44* forward primer; 1 μL *Xwmc44* reverse primer (the concentration for each primer was 100 μM); 2 μL DNA template; and 6.5 μL PCR grade water. The PCR was modified on the basis of a standard protocol. The primer annealing temperature of the marker primers was 61 °C for *Xwmc44* (Suenaga et al. 2003). The final PCR reaction consisted of initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles (denaturation, 94 °C for 45 s; primer annealing, 61 or 64 °C for 30 s; elongation, 72 °C for 1 min), followed by the final extension for 7 min at 72 °C and storage at 4 °C. The *csLV46G22* PCR amplification products were digested with the restriction enzyme BspEI in thermocycler at 37 °C for 1 h (Lagudah, pers. comm. 2020; Ponce-Molina et al. 2018). PCR and digestion was carried out using the Labcycler thermal cyclers (SensoQuest, Germany). The products of amplification were prepared by adding 0.5 Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe, Germany) to each tube. The products were separated for one and a half hour using 2% agarose (Sigma-Aldrich, Poland) gel in 1x TBE buffer (BioShop, Canada) at 100 V. To visualize the PCR products, a Molecular Imager Gel Doc™ XR UV system was used with the Biorad Bio Image™ Software (Biorad, USA).

**Table 1** Presence of *Lr46/Yr29* gene in tested triticale winter varieties

No.	Cultivar	Molecular markers		Leaf tip necrosis (LTN)	Leaf rust resistance (scale 1–9)*	Yellow rust resistance (scale 1–9)*
		<i>Xwmc44</i>	<i>csLV46G22</i>			
1.	Avocado	–	–	–	8.3	8.2
2.	Belcanto	–	–	+	8.6	8.7
3.	Dolindo	+	–	+	8.5	8.0
4.	Fredro	+	–	–	7.5	7.5
5.	Kasyno	–	+	+	8.5	8.8
6.	Maestozo	–	–	–	8.3	7.3
7.	Orinoko	+	–	–	8.2	7.8
8.	Pizarro	+	–	+	8.0	8.4
9.	Porto	+	–	+	8.5	8.3
10.	Rotondo	–	–	–	8.0	6.5
11.	Subito	–	–	–	8.1	7.5
12.	Trapero	–	–	–	8.3	8.4
13.	Trismart	+	–	–	6.8	6.8
14.	Twingo	–	–	–	8.0	8.3
Total resistance (scale 1–9)* mean					8.1	7.9
Resistance (scale 1–9)* mean for <i>Xwmc44res</i>					7.9	7.8
Resistance (scale 1–9)* mean for <i>Xwmc44sus</i>					8.3	8.0
Resistance (scale 1–9)* mean for <i>csLV46G22res</i>					8.5	8.8
Resistance (scale 1–9)* mean for <i>csLV46G22sus</i>					8.1	7.8
Resistance (scale 1–9)* mean for LTN+					8.4	8.4
Resistance (scale 1–9)* mean for LTN–					7.9	7.6

\*Scale of the Research Centre for Cultivar Testing (COBORU) in Słupia Wielka (Poland). 9—most resistant; 1—most susceptible. Mean data collected by post-registration variety testing (PDO) in 2016–2018 (Drażkiewicz 2019)

The mean scores of leaf and yellow rust severity were adapted from post-registration variety testing program (PDO) for winter (Drażkiewicz 2019) and spring triticale cultivars (Najewski 2019). This program was performed by the Research Centre for Cultivar Testing (COBORU) and included 3 years (2016–2018) of field scoring of natural infection of *P. triticina* and *P. striiformis* in fifty localizations in Poland (Zych 2019).

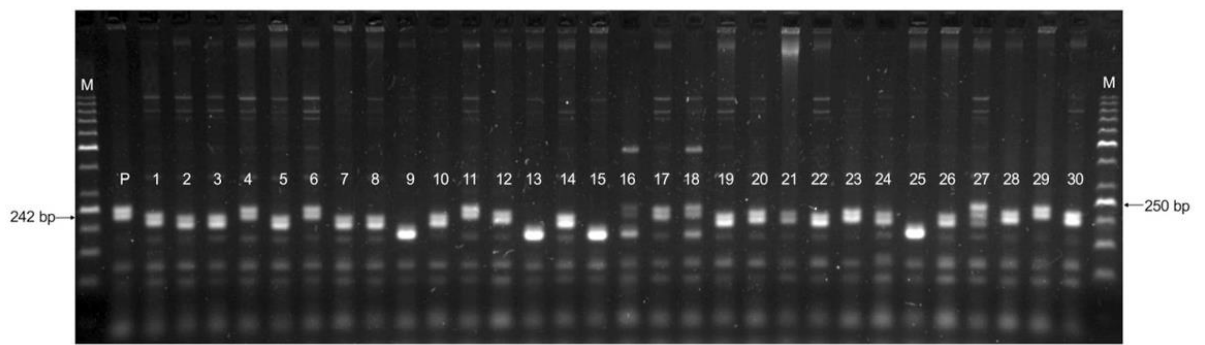
Leaf tip necrosis was scored for twenty triticale accessions in field trial at the Poznan University of Life Sciences. Ten randomly chosen flag leaves were observed and evaluated using positive/negative (LTN+/LTN–) scores (Fig. 1).

## Results and discussion

Most leaf rust resistance genes are race specific (R) and effective during all of the host life cycle, being called seedling genes. Seedling resistance is usually manifested by hypersensitive resistance response (Bolton et al. 2008). Leaf rust resistance conditioned by adult plant genes (APR) can be expressed only at adult plant stage. Some adult plant resistance genes are characterized by conferring partial resistance, which is associated with a slow rusting development instead

of a rapid hypersensitive response. Slow rusting genes result in fewer and smaller uredinia and longer latent periods (Lagudah et al. 2009). The partial resistance genes condition longstanding effectiveness. *Lr46* is located on long arm of 1B chromosome and confers a comparable non-hypersensitive type of defense to infection of *P. triticina* as *Lr34* (7DS), but its effect is smaller than that of *Lr34* (Martinez et al. 2001).

In this study, we assumed that *Lr46* gene located on 1B chromosomes could be present in some of triticale cultivars, considering different breeding pathways of primary and secondary triticale. We screened twenty Polish triticale cultivars for *Lr46* using two closest molecular markers and showed that the microsatellite marker *Xwmc44* do not line up with the CAPS marker *csLV46G22* analyses. Microsatellite locus of *Xwmc44* marker is located 5.6 cm proximal to the putative QTL for *Lr46/Yr19* (Suenaga et al. 2003). For comparison, recent maps for *Lr46/Yr19* from Pavon 76 place this locus between *TraesCS1B01G453900* and *csLV46G22* (Lagudah, personal comm.). *Xwmc44* marker was identified in 6 winter cultivars: Dolindo, Fredro, Orinoko, Pizarro, Porto and Trismart (Fig. 2, Tables 1 and 2). Results for *Xwmc44* resistance allele do not coincided with the CAPS marker *csLV46G22res* tightly linked to *Lr46/Yr19*. A specific product



**Fig. 2** Electropherogram showing the presence of *Xwmc44* marker in the triticale varieties. *M*, GeneRuler 50 bp DNA ladder (Nippon Genetic Europe, Germany); *P*, Pavon F76; 1–30, triticale varieties

of *csLV46G22* marker was observed in three other triticale cultivars: Kasyno (winter cultivar), Mamut and Puzon (spring cultivars) (Tables 1 and 2). Considering the durability of *Lr46* expression, the results of molecular marker analysis were compared with leaf and yellow rust severity in these triticales tested in the field under post-registration variety testing program (PDO 2016–2018; Drazkiewicz 2019, Najewski 2019). Belcanto and Kasyno were the most resistant for infections of both *P. titicina* and *P. stiiiformis* causing leaf and yellow rust, respectively. The mean score for leaf rust resistance ranged between 6.8 and 8.6 for winter cultivars (Table 1) and 7.5–8.4 for spring cultivars screened in this study (Table 1). Simultaneously, the mean score for yellow rust resistance ranged between 6.5 and 8.8 for winter cultivars (Table 1) and 8.1–8.7 for spring cultivars (Table 2). What is interesting is that the mean scores for leaf and yellow rust resistance for

winter cultivars carrying *Xwmm44res* allele were lower than the mean scores for *Xwmc44sus* cultivars (Table 1). Considering the second marker, the mean scores for leaf and yellow rust resistance for *csLV46G22res* cultivars were higher than mean scores for *csLV46G22sus* cultivars (Tables 1 and 2) with one exception. The scores of yellow rust severity were comparable comparing spring cultivars carrying *csLV46G22res* and *csLV46G22sus* (Table 2). The results were also compared with leaf tip necrosis (LTN) analysis. This trait is associated with the *Lr34* and *Lr46* genes and is a useful phenotypic marker to identify the presence of those genes in wheat lines (Rosewarne et al. 2006). LTN trait was observed only in five winter cultivars (Belcanto, Dolindo, Kasyno, Pizzaro and Porto). The leaf and yellow resistance scores for LTN+ cultivars were higher comparing to LTN– cultivars. Among LTN+ winter cultivars, Dolindo, Pizzaro and Porto

**Table 2** Presence of *Lr46/Yr29* gene in tested triticale spring varieties

No.	Cultivar	Molecular markers		Leaf tip necrosis (LTN)	Leaf rust resistance (scale 1–9)*	Yellow rust resistance (scale 1–9)*
		<i>Xwmc44</i>	<i>csLV46G22</i>			
1.	Dublet	–	–	–	7.5	8.5
2.	Mamut	–	+	–	8.3	8.7
3.	Mazur	–	–	–	8.2	8.5
4.	Puzon	–	+	–	8.3	8.1
5.	Santos	–	–	–	8.4	8.5
6.	Sopot	–	–	–	8.0	8.4
Total resistance (scale 1–9)* mean					8.1	8.5
Resistance (scale 1–9)* mean for <i>Xwmc44res</i>					n/a	n/a
Resistance (scale 1–9)* mean for <i>Xwmc44sus</i>					8.1	8.5
Resistance (scale 1–9)* mean for <i>csLV46G22res</i>					8.3	8.4
Resistance (scale 1–9)* mean for <i>csLV46G22sus</i>					8.0	8.5
Resistance (scale 1–9)* mean for LTN+					n/a	n/a
Resistance (scale 1–9)* mean for LTN–					8.1	8.5

\*Scale of the Research Centre for Cultivar Testing (COBORU) in Słupia Wielka (Poland). 9, most resistant; 1, most susceptible. Mean data collected by post-registration variety testing (PDO) in 2016–2018 (Najewski 2019)

carried *Xwmc44res* allele, when Kasyno was identified to have *csLV46G22res* allele.

Considering the results of molecular markers compared with 3 years of leaf and yellow rust severity tests and LTN trait scoring, it could be assumed that triticale cv. Kasyno could be considered to have *Lr46/Yr29* gene. What is more basing on high levels of leaf and yellow rust resistance and the presence of LTN trait is that triticale cv. Belcanto could be suspected to have *Lr34/Yr18* gene. However, this requires additional molecular marker investigation, which falls outside the scope of this study. In addition, these cultivars may serve as the starting material for pyramiding slow rusting resistance genes in triticale genotypes.

**Acknowledgments** The authors would like to acknowledge and thank Prof. Evans Lagudah for providing protocol instructions and primer sequences for *csLV46G22* marker and his invaluable help with data interpretation. We thank Dr. Harrold Bockelman at the USDA/ARS Small Grains Laboratory, Aberdeen (ID, USA) for providing the seeds of wheat accessions. The authors would like to thank Dr. Zofia Banaszak at the Danko Breeding Station, for providing seeds of triticale cultivars. In addition, we would like to thank all of the reviewers and manuscript editor for their careful review of the manuscript and for their excellent suggestions for improving our initial work.

**Authors' contributions** MK initiated the project. RS made the experiments and analyses, wrote the first draft and incorporated all inputs from co-authors. MK, AT and JN revised the draft and made suggestions for improving the manuscript.

**Funding information** This publication is being co-financed by the framework of the Ministry of Science and Higher Education program as "Regional Initiative Excellence" in years 2019–2022, project no. 005/RID/2018/19.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Ammar K, Mergoum M, Rajaram S (2004) The history and evolution of triticale. In: Mergoum M, Gomez-Macpherson H (eds) Triticale improvement and production. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp 1–10
- Audenaert K, Troch V, Landschoot S, Haesaert G (2014) Biotic stresses in the anthropogenic hybrid triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack): current knowledge and breeding challenges. *Eur J Plant Pathol* 40(4):615–630. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0498-2>
- Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF (2008) Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Mol Plant Pathol* 9(5):563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x>
- Boyd LA (2006) Can the durability of resistance be predicted? *J Sci Food Agric* 86:2523–2526. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2648>
- Caldwell RM (1968) Breeding for general and/or specific plant disease resistance. In: Proceedings of the third international wheat genetics symposium, Canberra, Australia. Australian Academy of Sciences, Canberra, pp 236–272
- Cobo N, Wanjugi H, Lagudah E, Dubcovsky J (2019) A high-resolution map of wheat QYr.Ucw-1BL, an adult plant stripe rust resistance locus in the same chromosomal region as Yr29. *Plant Genome* 12:180055. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.08.0055>
- Dinh HX, Singh D, Periyannan S, Park RF, Pourkheirandish M (2020) Molecular genetics of leaf rust resistance in wheat and barley. *Theor Appl Genet*. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03570-8>
- Drażkiewicz K. (2019) Pszenżyto. Pszenżyto ozime. [in:] Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2019. [http://www.coboru.pl/Publikacje\\_COBORU/Listy\\_opisowe/LOORR%20-%20zbozowe%202019.pdf](http://www.coboru.pl/Publikacje_COBORU/Listy_opisowe/LOORR%20-%20zbozowe%202019.pdf). Accessed 4 May 2020
- Dyck PL, Samborski DJ (1979) Adult-plant leaf rust resistance in PI 250413, an introduction of common wheat. *Can J Plant Sci* 59(2):329–332. <https://doi.org/10.4141/cjps79-053>
- Ellis JG, Lagudah ES, Spielmeier W, Dodds PN (2014) The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Front Plant Sci* 5:641. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00641>
- Feuillet C, Langridge P, Waugh R (2008) Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet* 24:24–32. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.11.001>
- Grzesik H, Strzembicka A (2003) Resistance of some winter triticale varieties to leaf rust [*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*]. *Biul Inst Hod i Aklim Roślin* 230:171–175
- Hanzalová A, Bartoš P (2011) Resistance of triticale to wheat leaf rust (*Puccinia triticina*). *Czech J Genet Plant Breed* 47(1):10–16. <https://doi.org/10.17221/100/2010-cjgpb>
- Herrera-Foessel SA, Singh RP, Huerta-Espino J, Rosewarne GM, Periyannan SK, Viccars L, Calvo-Salazar V, Lan C, Lagudah ES (2012) *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genet* 124(8):1475–1486. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1802-1>
- Kolmer JA (2005) Tracking wheat rust on a continental scale. *Curr Opin Plant Biol* 8(4):441–449. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.001>
- Kolmer JA, Lagudah ES, Lillemo M, Lin M, Bai G (2015) The *Lr46* gene conditions partial adult-plant resistance to stripe rust, stem rust, and powdery mildew in Thatcher wheat. *Crop Sci* 55:2557–2565. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.02.0082>
- Kolmer JA, Su Z, Bernardo A, Bai G, Chao S (2018a) Mapping and characterization of the new adult plant leaf rust resistance gene *Lr77* derived from Santa Fe winter wheat. *Theor Appl Genet* 131(7):1553–1560. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3097-3>
- Kolmer JA, Bernardo A, Bai G, Hayden MJ, Chao S (2018b) Adult plant leaf rust resistance derived from Toropi wheat is conditioned by *Lr78* and three minor QTL. *Phytopathology* 108(2):246–253.

- <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-17-0254-R>
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H et al (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323: 1360–1363. <https://doi.org/10.1126/science.1166453>
- Kroupin PY, Gruzdev IV, Divashuk MG, Bazhenov MS, Kocheshkova AA, Chernook AG et al (2019) Analysis of spring triticale collection for leaf rust resistance genes with PCR markers. *Russ J Genet* 55(8): 945–954. <https://doi.org/10.1134/S1022795419080088>
- Kwiatk MT, Nawracała J (2018) Chromosome manipulations for progress of triticale (*×Triticosecale* Wittmack) breeding. *Plant Breed* 137:823–831. <https://doi.org/10.1111/pbr.12652>
- Lagudah ES (2011) Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat. *Euphytica* 179(1):81–91. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0336-3>
- Lagudah ES, Krattinger SG, Herrera-Foessel S, Singh RP, Huerta-Espino J, Spielmeier W, Keller B (2009) Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theor Appl Genet* 119(5):889–898. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1097-z>
- Li C, Lu X, Zhang Y, Liu N, Li C, Zheng W (2020) The complete mitochondrial genomes of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Mitochondrial DNA Part B* 5(1): 29–30. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1674744>
- Lillemo M, Asalf B, Singh RP, Huerta-Espino J, Chen XM, He ZH et al (2008) The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line. *Saar Theor Appl Genet* 116:1155–1166. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0743-1>
- Lowe I, Jankuloski L, Chao S, Chen X, See D, Dubcovsky J (2011) Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly virulent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 123:143–157. <https://doi.org/10.1007/s00122011-1573-0>
- Lukaszewski AJ (1993) Reconstruction in wheat of complete chromosome 1B and 1R from IRS.1BL translocation of Kavkaz origin. *Genome* 36:821–824. <https://doi.org/10.1139/g93-109>
- Lukaszewski AJ (2000) Manipulation of the IRS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. *Crop Sci* 40: 216–225. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.401216x>
- Martinek P, Vinterová M, Burešová I, Vyhnanek T (2008) Agronomic and quality characteristics of triticale (*×Triticosecale* Wittmack) with HMW glutenin subunits 5+10. *J Cereal Sci* 47:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.02.003>
- Martinez F, Niks RE, Singh RP, Rubiales D (2001) Characterization of *Lr46*, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas* 135(2–3):111–114. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00111.x>
- McCallum BD, Fetc T, Chong J (2007) Cereal rust control in Canada. *Aust J Agric Res* 58(6):639–647. <https://doi.org/10.1071/AR06145>
- McGoverin CM, Snyder F, Muller N, Botes W, Fox G, Manley M (2011) A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *J Sci Food Agric* 91:1155–1165. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4338>
- McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Xia XC (2017) Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 supplement. <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf>. Accessed 4 May 2020
- Mergoum M, Pfeiffer WH, Pena RJ, Ammar K, Rajaram S (2004) Triticale crop improvement: the CIMMYT programme. In: Mergoum M, Gomez-Maxpherson H (eds) *Triticale improvement and production*. FAO plant production and protection paper 179. FAO, Rome, pp 11–27
- Mikhailova L, Merezhko AF, Funtikova EY (2009) Triticale diversity in leaf rust resistance. *Russ Agric Sci* 35:320–323. <https://doi.org/10.3103/s1068367409050097>
- Najewski (2019) Pszenżyto. Pszenżyto jare. [in:] *Lista opisowa odmian roślin rolniczych* 2019. [http://www.coboru.pl/Publikacje\\_COBORU/Listy\\_opisowe/LOORR%20-%20zbozowe%202019.pdf](http://www.coboru.pl/Publikacje_COBORU/Listy_opisowe/LOORR%20-%20zbozowe%202019.pdf). Accessed 4 May 2020
- Oettler G (2005) The fortune of a botanical curiosity – triticale: past, present and future. *J Agric Sci* 143:329–346. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005290>
- Parlevliet JE (1979) Further evidences of polygenic inheritance of partial resistance in barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. *Euphytica* 27: 369–379. <https://doi.org/10.1007/BF00043161>
- Ponce-Molina LJ, Huerta-Espino J, Singh RP, Basnet BR, Lagudah E, Aguilar-Rincón VH et al (2018) Characterization of adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in Indian wheat cultivar ‘New Pusa 876’. *Crop Sci* 58(2):630–638. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0396>
- Qi X, Niks RE, Stam P, Lindhout P (1998) Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theor Appl Genet* 96:1205–1215. <https://doi.org/10.1007/s001220050858>
- Ren Y, Singh RP, Basnet BR, Lan CX, Huerta-Espino J, Lagudah ES et al (2017) Identification and mapping of adult plant resistance loci to leaf rust and stripe rust in common wheat cultivar Kundan. *Plant Dis* 101:456–463. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0890-RE7>
- Rosewarne GM, Singh RP, Huerta-Espino J, William HM, Bouchet S, Cloutier S, Lagudah ES (2006) Leaf tip necrosis, molecular markers and  $\beta$ 1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes *Lr46/Yr29*. *Theor Appl Genet* 112(3):500–508. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0153-6>
- Rubiales D, Niks RE (1995) Characterization of *Lr34*, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust. *Plant Dis* 79:1208–1212. <https://doi.org/10.1094/PD-79-1208>
- Schnurbusch T, Bossolini E, Messmer M, Keller B (2004) Tagging and validation of a major quantitative trait locus for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in winter wheat cultivar Fomo. *Phytopathology* 94(10):1036–1041. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.10.1036>
- Singh RP (1992) Expression of wheat leaf rust resistance gene *Lr34* in seedlings and adult plants. *Plant Dis* 76:489–491. <https://doi.org/10.1094/pd-76-0489>
- Singh SJ, McIntosh RA (1990) Linkage and expression of genes for resistance to leaf rust and stem rust in triticale. *Genome* 33:115–118. <https://doi.org/10.1139/g90-018>
- Singh RP, Saari EE (1991) Biotic stresses in triticale. In: 2. Proceedings of the International Triticale Symposium. Passo Fundo (Brazil). 1–5 Oct 1990
- Singh RP, Mujeeb-Kazi A, Huerta-Espino J (1998) *Lr46/Yr19*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88(9):890–894. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.9.890>
- Singh RP, Huerta-Espino J, Rajaram S (2000) Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathol Entomol Hunga* 35(1/4):133–139
- Singh RP, Herrera-Foessel SA, Huerta-Espino J, Lan CX, Basnet BR, Bhavani S et al (2013) Pleiotropic gene *Lr46/Yr29/Pm39/Ltn2* confers slow rusting, adult plant resistance to wheat stem rust fungus. In: proceedings of the Borlaug global rust initiative technical workshop, 19–22 Aug. 2013, New Delhi, India. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. p. 17.1
- Singla J, Lüthi L, Wicker T, Bansal U, Krattinger SG, Keller B (2017) Characterization of *Lr75*: a partial, broad-spectrum leaf rust resistance gene in wheat. *Theor Appl Genet* 130(1):1–12. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2784-1>

- Sodekiewicz W, Strzembicka A (2004) Application of *Triticum monococcum* for the improvement of triticale resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*). *Plant Breed* 123:39–42. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00949.x>
- Sodekiewicz W, Strzembicka A, Apolinarska B (2008) Chromosomal location in triticale of leaf rust resistance genes introduced from *Triticum monococcum*. *Plant Breed* 127:364–367. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01485.x>
- Stuchlíková E, Bartos P (1980) Genetic analysis of resistance to brown rust in triticale. *Genetika a Slechteni* 16(3):171–180
- Suenaga K, Singh RP, Huerta-Espino J, Williams HM (2003) Microsatellite markers for genes Lr34/Yr18 and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology*. 93(7):881–890. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.881>
- Waines JG, Ehdaie B (2007) Domestication and crop physiology: roots of green-revolution wheat. *Ann Bot* 100(5):991–998. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm180>
- William M, Singh RP, Huerta-Espino J, Islas SO, Hoisington D (2003) Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene Lr46 and its association with stripe rust resistance gene Yr29 in wheat. *Phytopathology* 93(2):153–159. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.2.153>
- Wilson J, Shaner G (1989) Inheritance of the leaf rust resistance in four triticale cultivars. *Phytopathology* 79:731–736. <https://doi.org/10.1094/phyto-79-731>
- Zych J (2019) Wprowadzenie [in:] Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2019. [http://www.coboru.pl/Publikacje\\_COBORU/Listy\\_opisowe/LOORR%20-%20zbozowe%202019.pdf](http://www.coboru.pl/Publikacje_COBORU/Listy_opisowe/LOORR%20-%20zbozowe%202019.pdf). Accessed 4 May 2020

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### **4. Development of Triticale × Wheat Prebreeding Germplasm With *Loci* for Slow-Rusting Resistance**

**Skowrońska R.**, Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M.

*Frontiers in Plant Science*, 11, 447.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00447>

**IF – 5,753; pkt wg MEiN – 100,000**



# Development of Triticale × Wheat Prebreeding Germplasm With Loci for Slow-Rusting Resistance

Roksana Skowrońska<sup>1</sup>, Monika Mariańska<sup>1</sup>, Waldemar Ulaszewski<sup>2</sup>, Agnieszka Tomkowiak<sup>1</sup>, Jerzy Nawracała<sup>1</sup> and Michał T. Kwiatek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland, <sup>2</sup> Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Jose Luis Gonzalez Hernandez,  
South Dakota State University,  
United States

### Reviewed by:

George Fedak,  
Agriculture and Agri-Food Canada  
(AAFC), Canada  
Morten Lillemo,  
Norwegian University of Life Sciences,  
Norway

### \*Correspondence:

Michał T. Kwiatek  
michal.kwiatek@up.poznan.pl

### Specialty section:

This article was submitted to  
Plant Breeding,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

Received: 12 September 2019

Accepted: 26 March 2020

Published: 07 May 2020

### Citation:

Skowrońska R, Mariańska M,  
Ulaszewski W, Tomkowiak A,  
Nawracała J and Kwiatek MT (2020)  
Development of Triticale × Wheat  
Prebreeding Germplasm With Loci  
for Slow-Rusting Resistance.  
*Front. Plant Sci.* 11:447.  
doi: 10.3389/fpls.2020.00447

There is a growing interest in breeding and production of hexaploid triticale (× *Triticosecale* Wittmack ex A. Camus) in European Union and in the world. It is reported that triticale can be an alternative to wheat (*Triticum aestivum* L.) for livestock feed production and has a potential to become preferred industrial energy crop. Fungal diseases, mainly leaf and stripe rusts, are the limiting factors of triticale growth and yield. Geneticists and breeders are now focusing on accumulation of the major genes for durability of rust resistance. Slow-rusting genes *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr19* are being exploited in many wheat breeding programs. This type of horizontal resistance is reported to be effective over space and time. Classical breeding techniques supported by marker-assisted selection (MAS) are the main tools in breeding programs. The aim of this study was to assess the possibility of transfer of slow-rusting genes from resistant genotypes of wheat into hexaploid triticale through cross-hybridizations. A total of 5,094 manual pollinations were conducted between two triticale cultivars Fredro and Twingo and 33 accessions of common wheat, which were reported as sources of slow-rusting resistance genes. The investigation of the slow-rusting gene transmission was performed using both molecular markers analyses and genomic *in situ* hybridization (GISH). In total, 34 F<sub>1</sub> hybrid plants were obtained, and 29 of them carried both slow-rusting loci. Therefore, these hybrids may be used for triticale prebreeding program.

**Keywords:** genomic *in situ* hybridization, molecular markers, resistance genes, slow rust, triticale, wheat

## INTRODUCTION

Triticale (× *Triticosecale* Wittmack ex A. Camus) is an artificial manmade grain, created through hybridization of wheat derivatives (*Triticum* sp.) with rye (*Secale cereale* L.). Initially, triticale was expected to combine the high robustness of rye with the great yield potential (Kwiatek and Nawracała, 2018). At present, this crop is widely used as an alternative for other cereals, mostly for wheat, as a valuable source of livestock feed (Ayalew et al., 2018). In recent years, the interest in triticale production has increased because of its potential to become an industrial energy crop (Sanaei and Stuart, 2018). The economic importance of triticale is reflected by a significant acreage in Europe, which accounts for 90% of the world production (FAO, 2018). Triticale, as an artificial crop, is characterized by low genetic variation. Moreover, the increasing harvesting area of this crop

is associated with the rapid development of fungal pathogens, which are continuously adapting to triticale. Hence, the need to develop more basic and applied research on this crop connected with resistance breeding.

Leaf rust caused by *Puccinia triticina* Eriks. and stripe rust caused by *Puccinia striiformis* Westend f. sp. *tritici* are the most important foliar diseases of triticale, as well as other major cereal species. It is reported that rye genome in triticale improves the resistance for leaf rust (Mikhailova et al., 2009). Genetic resistance is the most economical and preferable method of reducing yield losses due to leaf rust (Kolmer, 1996). More than 70 leaf rust resistance genes (*Lr*) have been mapped to specific chromosomes and described in the Catalog of Gene Symbols for Wheat (McIntosh, 1995; McIntosh et al., 2016). Many of the leaf and stripe rust resistance genes are race specific and have been overcome by the new races of *Puccinia* spp. (Periyannan et al., 2017). However, in the wheat gene pool, three genes were identified that confer durable adult plant resistance against multiple fungal diseases (Ellis et al., 2014). These genes were named *Lr34* (= *Yr18/Sr57/Pm38*; chromosome 7D), *Lr46* (= *Yr29/Sr58/Pm39*; 1B), and *Lr67* (= *Yr46/Sr55/Pm46*; 4D) (Dyck, 1977; Dyck and Samborski, 1979; Singh et al., 1998). Their expression results in partial resistance against all races of the fungal wheat pathogens causing leaf rust, stripe rust, and powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*).

New plant-breeding techniques (NPBTs) developed over the past two decades have provided comprehensive opportunities for efficient trait development in crops (Eriksson et al., 2018). For example, transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) lines expressing slow-rusting allele *Ta-Lr34res* of wheat showed enhanced resistance against leaf rust and powdery mildew of barley (Boni et al., 2018). Unfortunately, diverging opinions and politically motivated arguments are hampering the political progress to decide on the regulation of NPBTs in the European Union. Hence, classical breeding techniques, such as wide cross-hybridization supported by marker-assisted selection (MAS), are still the main tool for breeding programs.

The aim of this work was to assess the possibility of transfer of two main slow-rusting genes *Lr34* and *Lr46* from wheat-resistant genotypes derived from the United States Department of Agriculture (USDA)/Agricultural Research Service (ARS) Small Grains Laboratory, Aberdeen (ID, United States) gene bank into two elite cultivars of hexaploid triticale through cross-hybridizations. The evaluation of the chromosome transmission was performed using both molecular marker analyses and genomic *in situ* hybridization (GISH). This initial study is to obtain the starting pool triticale-wheat hybrids, carrying slow-rusting genes, which will be applied in the triticale breeding programs.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

Seeds of 33 accessions of wheat, which were reported as sources of slow-rusting genes (Table 1), and two cultivars of winter triticale were germinated on Petri dishes. The plantlets were transferred

to soil and cultivated for 6–8 weeks under short-day conditions (8 h light/16 h dark, 20/18°C). Finally, the winter genotypes were transferred for 6 weeks to vernalizing conditions (10 h light/14 h dark, 4°C) and then returned to long-day conditions (13 h light/11 h dark, 20/16°C).

### Pollen Viability Evaluation and Cross-Hybridizations

F<sub>1</sub> hybrid plants were obtained through cross-hybridization between triticale (female parent) and wheat (pollinator) performed in the glasshouse chambers of the Department of Genetics and Plant Breeding at the Poznań University of Life Sciences (PULS), Poland. In this purpose, 10 seeds from each accession were sown in plastic pots in three replications. Evaluation of pollen vitality was made on the wheat genotypes. Pollen grains were stained with 2% aceto-carmine in glycerine (vol. 1:1) for the presence of cytoplasm. The evaluation of pollen vitality was made using a Delta Genetic Pro microscope (Delta Optical, Poland).

Florets of maternal components (triticale plants) were emasculated to avoid self-fertilization in order to cross with the pollen of wheat. The emasculated florets were counted and pollinated with freshly collected pollen of wheat within a period of 3 months (April–June 2019). The percentage ratio of the total amount of seeds from each plant with the total amount of pollinated flowers of each plant was calculated [crossing efficiency (CE)].

### Identification of Molecular Markers Linked to *Lr34* and *Lr46* Genes

The following molecular markers *csLV34* (Lagudah et al., 2006) linked to *Lr34* and *Xgwm44* (William et al., 2003) and *csLV46G22* (Lagudah pers. comm.) linked to *Lr46* were used to confirm the presence of alleles connected with slow-rusting resistance in wheat genotypes and F<sub>1</sub> hybrids. Genomic DNA was extracted from seedling leaves using the Plant and Fungi DNA Purification Kit (EURx, Poland). The PCR reaction volume was 20 µl, consisting of 100 nM each of the two primers, 2 × TaqNova-DNA hot-start polymerase buffer (Blirt, Poland), and 50 ng of genomic DNA as template. A typical PCR procedure was as follows: 5 min at 95°C, then 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50–60°C (Skowrońska et al., 2019), 1 min at 72°C, and 5 min at 72°C. PCR products were run on 2% agarose gel (Lab Empire, Poland) with 1% Tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid (TBE) buffer. DNA was visualized via Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe, Germany) that was added to the samples.

### Genomic *in situ* Hybridization

Chromosome sets of F<sub>1</sub> hybrids were analyzed using GISH. This approach was to calculate the cross-hybridization efficiency (CE). It was performed on mitotic chromosomes of root meristem cells collected from hybrid plants. Mitotic metaphase accumulation and fixation procedures were carried out according to Kwiatek et al. (2016). Total genomic DNA was isolated using the DNeasy Plant Maxi Kit 24 (Qiagen, Germany). DNA of *Aegilops tauschii*

**TABLE 1** | Pollen viability of wheat accessions and seed production ability of triticale after pollination with pollen grains from wheat components.

No.	Pollinators ( <i>Triticum aestivum</i> L.)										Maternal components (x <i>Triticosecale</i> Wittmack)						
	Cultivar/genotype	Plant ID	Growth habit	Source	csLV34 linked to Lr34	Xgwm44 linked to Lr46	csLV46G22 linked to Lr46	Pollen viability (%)	Number of pollinated flowers	Crossing efficiency (%)	Number of hybrid seeds	Triticale cv. "Fredro" (Danko Breeding Company, Poland)	Number of pollinated flowers	Crossing efficiency (%)	Number of hybrid seeds	Triticale cv. "Twingo" (Danko Breeding Company, Poland)	Crossing efficiency (%)
1.	Frontana	Citr 12470	Spring	USDA	+	+	+	90.29	62	0.00	0	Triticale cv. "Fredro" (Danko Breeding Company, Poland)	124	0.00	0	Triticale cv. "Twingo" (Danko Breeding Company, Poland)	0.00
2.	Chis	Citr 13751	Spring	USDA	+	+	-	99.36	68	0.00	0		350	0.00	5		2.86
3.	H_N_ROD6_13751	PI 191772	Spring	USDA	-	-	-	89.33			not crossed				not crossed		
4.	Frontana 3671	PI 193932	Spring	USDA	+	+	+	92.23	56	0.00	0		56	0.00	12		21.43
5.	Frontana LF 320	PI 193933	Spring	USDA	+	+	+	88.29	58	0.00	0		116	0.00	0		0.00
6.	Frontana LF 321	PI 193934	Spring	USDA	+	+	+	88.74	52	3.85	2		100	3.85	2		2.00
7.	Frontatch-1	PI 290745	Spring	USDA	+	+	+	89.36	60	0.00	0		64	0.00	0		0.00
8.	Frontatch-2	PI 297014	Spring	USDA	+	+	+	89.09	56	0.00	0		66	0.00	0		0.00
9.	Frontatch-3	PI 299419	Spring	USDA	+	+	+	88.92	62	0.00	0		58	0.00	0		0.00
10.	Toropi	PI 344200	Spring	USDA	-	-	+	90.34			not crossed				not crossed		
11.	Fortaleza	PI 351779	Spring	USDA	+	+	-	89.74	64	0.00	0		56	0.00	0		0.00
12.	Sparrow	PI 519725	Spring	USDA	+	+	+	91.24	62	0.00	0		58	0.00	1		1.72
13.	Pavon F76	PI 519847	Spring	USDA	+	+	+	89.60	88	0.00	0		100	0.00	0		0.00
14.	Pavon 76	PI 520003	Spring	USDA	-	-	-	89.36	64	0.00	0		64	0.00	0		0.00
15.	Pavon-1	PI 520054	Spring	USDA	+	+	+	89.81	68	0.00	0		48	0.00	0		0.00
16.	Pavon-2	PI 520172	Spring	USDA	-	-	+	88.24	62	0.00	0		64	0.00	0		0.00
17.	Myna	PI 520340	Spring	USDA	+	+	+	90.46	58	0.00	0		68	0.00	0		0.00
18.	Junco	PI 519947	Spring	USDA	-	-	-	88.10			not crossed				not crossed		
19.	Tanager	PI 519878	Spring	USDA	+	+	+	90.13	62	0.00	0		56	0.00	0		0.00
20.	Parula	PI 520340	Spring	USDA	+	-	-	89.36	68	0.00	0		170	0.00	0		0.00
21.	Rayon 89	PI 591786	Spring	USDA	-	-	-	95.81			not crossed				not crossed		
22.	Cumpas 88	PI 591786	Spring	USDA	+	+	+	91.20	58	0.00	0		62	0.00	0		0.00
23.	Mochis 88	PI 591791	Spring	USDA	+	-	-	94.83	54	0.00	0		160	0.00	9		13.13
24.	P8901-AP	PI 613175	Spring	USDA	+	-	-	89.19	56	0.00	0		64	0.00	0		0.00
25.	P8901-AQ	PI 613176	Spring	USDA	+	-	-	91.08	64	0.00	0		64	0.00	0		0.00
26.	Tlaxcala F2000	PI 619634	Spring	USDA	+	+	+	89.34	54	0.00	0		68	0.00	0		0.00
27.	Lr34	GSTR 433	Spring	USDA	+	-	-	89.41	62	0.00	0		58	0.00	0		0.00
28.	IWA8608696	PI 624623	Spring	USDA	+	+	+	88.34	58	0.00	0		56	0.00	0		0.00
29.	Anza	PI 638742	Spring	USDA	+	+	+	90.91	56	0.00	0		62	0.00	0		0.00
30.	UC1110	PI 671999	Spring	USDA	+	+	+	89.63	64	0.00	0		128	0.00	0		0.00
31.	Kern	PI 672001	Spring	USDA	+	+	+	88.59	68	0.00	0		164	0.00	0		0.61
32.	TX89D6435	PI 584759	Winter	USDA	+	+	+	93.70	62	0.00	0		658	0.00	3		0.46
33.	Purdue	Citr 13227	Winter	USDA	+	+	+	91.13	68	0.00	0		138	0.00	0		0.00
	Mean		90.46	61.86	0.07	0.001	113.79	1.10	0.01								
	Total		n/a	1,794	2	n/a	3,300	32	n/a								

Coss. ( $2n = 2x = 14$  chromosomes; DD; PI 603226; US National Plant Germplasm System), a progenitor of the D-genome of wheat, was labeled by nick translation with Atto-488 dye (Atto-488NT kit; Jena Bioscience, Germany) for the investigation of D-genome chromosomes. Total genomic DNA of rye (Imperial; PI 323382; US National Plant Germplasm System) was labeled in the same way by Atto-550 dye. Blocking DNA from *T. durum* Desf. ( $2n = 4x = 28$  chromosomes; AABB; Ceres; HR Smolice; Poland) was sheared by boiling for 30–45 min and used at a ratio of 1:50 (probe/block). GISH was performed according to Kwiatek et al. (2016). Slides were analyzed with the use of an Axio Observer 7 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) fluorescence microscope. Image processing was done using ZEN Pro software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Each plant was evaluated by an analysis of chromosome sets of 10 cells.

## RESULTS

### Identification of Molecular Markers Linked to Loci of Slow-Rusting Genes in Wheat Accessions

The molecular identification of *Lr34* and *Lr46* alleles was performed in all wheat and triticale cultivars and genotypes using *csLV34* and *Xgwm44* markers, respectively. The Thatcher near-isogenic line *Lr34* (*Lr34*; GSTR 433; USDA) and Pavon 76 (*Lr46*; PI 520003; USDA) lines were used as a positive control (R; Figures 1A,B). The PCR reactions using *csLV34* resulted in the amplification products of 160 bp in size and were found in DNA extracts of *Lr34*-positive control (GSTR 433) and 24 wheat cultivars and genotypes (Table 1). A PCR product of 240 bp in size was identified for eight wheat genotypes, indicating susceptible (S) allele (Figure 1A and Table 1). PCR reaction with *Xgwm44* marker yielded two amplicons: 260 and 280 bp for a product for Pavon76 and 17 wheat accessions (Figure 1B). Eleven wheat genotypes were characterized by 200 and 230 bp bands. Two wheat accessions showed 240- and 270-bp bands. “Toropi” wheat showed 235- and 265-bp band pattern (S-allele). The second *Lr46* marker, *csLV46G22*, gave different results, compared to *Xgwm44*. R-allele was identified in 16 wheat accessions. The results of *Xgwm44* and *csLV46G22* markers were similar for 21 of 33 wheat accessions. Ten wheat accessions carried all three resistant allele markers for *Lr34* (*csLV34*) and *Lr46* (both *Xgwm44* and *csLV46G22*) (Table 1).

### Pollen Viability of Wheat Accessions With Slow-Rusting Genes

The viability of pollen grains of wheat accessions was high and ranged between 88.29 and 99.36% (Table 1). The highest pollen viability was observed for “Chris” wheat cultivar. The lowest viability of pollen grains was evaluated in “Junco” cultivar. The mean pollen viability evaluated for all 33 wheat accession used for this experiment amounts to 90.45%. Following wheat accessions: Frontana, Frontana 3671, Toropi, Sparrow, Myna, Tanager, Rayon 89, Mochis 88, P8901-AQ, Anza, TX89D6435, and Purdue showed high viability of pollen grains (in excess of 90%).

### Evaluation of Triticale × Wheat Cross-Hybridizations

Cross-hybridization of winter triticale with wheat slow-rusting pollinators was performed in order to evaluate the CE through triticale × wheat crossing combinations (Table 1). Total amount of 5,094 flowers of triticale were pollinated with wheat pollen grains. The crossing evaluation showed, that in general, triticale cv. Twingo produced more hybrid seeds (32 seeds) than cv. Fredro (two seeds). Overall, hybrid seeds were provided by only seven crossing combinations. The total CE for both triticale cultivars was surprisingly low and amounts to 0.1% for Twingo × wheat combinations and 0.001% for Fredro × wheat combinations. Twingo × Frontana 3671 cross-hybridization was the most effective and yielded 12 seeds (CE, 21.43%).

### Identification of Molecular Markers Linked to Loci of Slow-Rusting Genes in Triticale × Wheat F<sub>1</sub> Hybrids

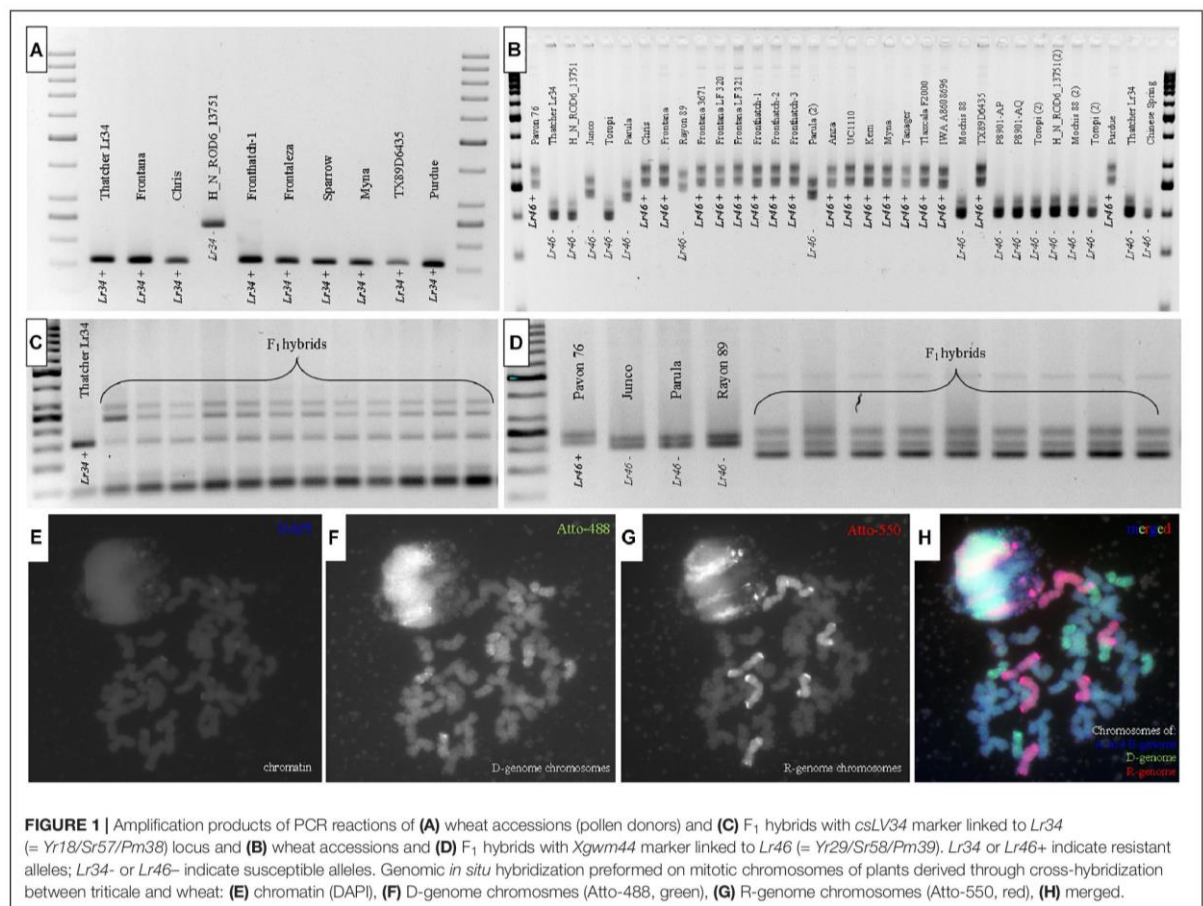
Similar set of three molecular markers, *csLV34*, *Xgwm44*, and *csLV46G22* was used to screen the presence of *Lr34* and *Lr46* loci in F<sub>1</sub> hybrids (H) (Figure 1C and Table 2). The PCR reactions for *csLV34* marker yielded three types of amplicons: 160 bp from resistant wheat (chromosome 7D) and 250 and 300 bp from R-genome of triticale (Figure 1C). The evaluation of electropherograms generated after separation of PCR products, which were amplified using *Xgwm44* marker, was more difficult. Three products were amplified using DNA samples from F<sub>1</sub> hybrids (H): 150, 200, and 240 bp, which were characteristics for both 1B chromosome that originated from resistant wheat accessions and 1B chromosome from triticale (Figure 1D). The resistant allele of *csLV46G22* marker was identified in plants of four crossing combinations. Moreover, those combinations (Fredro × Frontana LF 321, Twingo × Frontana LF 321, Twingo × Frontana 3671, and Twingo × Sparrow) carried all three resistant allele markers linked to *Lr34* and *Lr46* slow-rusting genes (Table 2).

### Chromosome Constitution of F<sub>1</sub> Hybrids Revealed by Genomic *in situ* Hybridization

Evaluation of chromosome constitution was made for all 34 F<sub>1</sub> seeds in order to confirm their hybrid origin (Figures 1E–H and Table 2). The karyotype for triticale × wheat F<sub>1</sub> hybrid contained 14 chromosomes (seven pairs) of A-genome, the same amount of B-genome chromosomes, seven chromosomes (monosomic) belonging to D-genome (Figure 1F), which were derived from wheat parent, and seven monosomic chromosomes of R-genome derived from triticale parent (Figure 1G).

## DISCUSSION

Development of transgenic triticale as a source of bioindustrial products is currently one of the main challenges for breeders. For now, pollen-mediated gene flow from related species into conventional triticale varieties is the only pathway for transgene



**FIGURE 1** | Amplification products of PCR reactions of (A) wheat accessions (pollen donors) and (C) F<sub>1</sub> hybrids with *csLV34* marker linked to *Lr34* (= *Yr18/Sr57/Pm38*) locus and (B) wheat accessions and (D) F<sub>1</sub> hybrids with *Xgwm44* marker linked to *Lr46* (= *Yr29/Sr58/Pm39*), *Lr34* or *Lr46+* indicate resistant alleles; *Lr34-* or *Lr46-* indicate susceptible alleles. Genomic *in situ* hybridization performed on mitotic chromosomes of plants derived through cross-hybridization between triticale and wheat: (E) chromatin (DAPI), (F) D-genome chromosomes (Atto-488, green), (G) R-genome chromosomes (Atto-550, red), (H) merged.

movement in large-scale breeding programs leading in the European Union. Currently, most breeders lean toward the use of slow-rusting genes for durable and race non-specific resistance of cereals. The main aim of this study was to obtain the starting pool triticale–wheat hybrids, which will be further used for backcrossing program, evaluation of slow-rusting gene expression, and inoculation tests.

The *Lr34* gene has been widely used in breeding of wheat cultivars worldwide, and its resistance has remained effective over many years despite large-scale agricultural use. The gene was identified in several distinct groups of genetic material, e.g., CIMMYT lines, Chinese landraces, and European winter wheat germplasm, for example Frontana, which was developed in Brazil or the Italian wheat Mentana (Kolmer et al., 2013). Lagudah et al. (2009) developed a sequence-tagged site (STS) marker, *csLV34*, that maps 0.4 cM from *Lr34* locus and was validated in many lines and cultivars from different breeding programs worldwide. The *Lr34* allele yielded a 150-bp product, and a 229-bp band was amplified in non-*Lr34* germplasm (Lagudah et al., 2009). In this study, the product for resistant genotypes of wheat was the same. A 230-bp band was amplified for wheat accessions with the lack

of *Lr34* allele (Rod, Toropi, Junco, etc.). However, different bands were amplified for susceptible triticale cultivars and F<sub>1</sub> hybrids (250 and 350 bp). Hence, it could be assumed that the *csLV34* ortholog is placed on R-genome chromosomes (probably on 7R chromosome) but yields different amplicons, which are useful for identification of *Lr34* locus in triticale × wheat hybrids.

The second major slow-rusting gene, *Lr46*, was first described in 1998 by Singh et al. (1998) in Mexican cultivar Pavon 76 and located on chromosome 1B (William et al., 2003). Suenaga et al. (2003) determined that the microsatellite locus *Xwmc44* is located 5.6 cM proximal to the putative quantitative trait locus (QTL) for *Lr46*. However, it is reported that the *Xwmc44* resistance allele in some cases is not diagnostic of *Lr46*, since numerous varieties without *Lr46* have *Xwmc44* products of similar sizes (Dubcovsky and Soria, 2017). In this study, *Xwmc44* marker yielded four different amplification products for F<sub>1</sub> hybrids. The size differences between amplicons were difficult to evaluate by standard electrophoresis using 2% agarose gel. In comparison, we have used *csLV46G22* marker (primer sequences and protocols were kindly provided by Prof. E. Lagudah, CSIRO, Australia), which is highly reliable and close to 100% diagnostic marker for

**TABLE 2 |** Chromosome sets of triticale × wheat hybrids and the identification of marker loci linked to slow-rusting genes.

No.	Crossing combination	F <sub>1</sub> plant ID	Number of chromosomes	Number of A- and B-genome chromosomes	Number of R-genome chromosomes	Number of D-genome chromosomes	csLV34 linked to Lr34	Xgwm44 linked to Lr46	csLV46G22 linked to Lr46
1.	Fredro × Frontana LF 321	1	42	28	7	7	+	+	+
2.		2	42	28	7	7	+	+	+
3.	Twingo × Chris	1	42	28	7	7	+	+	-
4.		2	42	28	7	7	+	+	-
5.		3	42	28	7	7	+	+	-
6.		4	42	28	7	7	+	+	-
7.		5	42	28	7	7	+	+	-
8.	Twingo × Frontana 3671	1	42	28	7	7	+	+	+
9.		2	42	28	7	7	+	+	+
10.		3	42	28	7	7	+	+	+
11.		4	42	28	7	7	+	+	+
12.		5	42	28	7	7	+	+	+
13.		6	42	28	7	7	+	+	+
14.		7	42	28	7	7	+	+	+
15.		8	42	28	7	7	+	+	+
16.		9	42	28	7	7	+	+	+
17.		10	42	28	7	7	+	+	+
18.		11	42	28	7	7	+	+	+
19.		12	42	28	7	7	+	+	+
20.	Twingo × Frontana LF 321	1	42	28	7	7	+	+	+
21.		2	42	28	7	7	+	+	+
22.	Twingo × Sparrow	1	42	28	7	7	+	+	+
23.	Twingo × Mochis 88	1	42	28	7	7	+	-	-
24.		2	42	28	7	7	+	-	-
25.		3	42	28	7	7	+	-	-
26.		4	42	28	7	7	+	-	-
27.		5	42	28	7	7	+	-	-
28.		6	42	28	7	7	+	-	-
29.		7	42	28	7	7	+	-	-
30.		8	42	28	7	7	+	-	-
31.		9	42	28	7	7	+	-	-
32.	Twingo × TX89D6435	1	42	28	7	7	+	+	-
33.		2	42	28	7	7	+	+	-
34.		3	42	28	7	7	+	+	-

the *Lr46* gene (Lagudah, personal communication). This cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker is codominant and appeared to be useful for genotyping on the  $F_1$  hybrids. Moreover, we showed the poor diagnostic ability of the *Xwmc44* marker used to trace the *Lr46* gene. Moreover, we identified mismatch results between *Xgwm44* and *csLV46G22* in 12 of 33 wheat accessions.

The GISH experiment confirmed the presence of seven monosomic chromosomes of D-genome derived from wheat accessions in most of the seeds obtained from cross-hybridizations of triticale and wheat in this study. This method has direct applications on the fundamental research, as well as in detecting the amount of introgressed chromatin during the production of prebreeding germplasm (Schwarzacher et al., 1992; Kwiatek et al., 2019). A number of reports showed the ability of cytogenetic methods to determine the introgression of D-genome chromosomes of wheat or *A. tauschii* Coss. into triticale genetic background (Lukaszewski et al., 1987; Salmanowicz et al., 2013; Kwiatek et al., 2015). The *Lr34* locus is located on 7D chromosome of slow-rusting wheat accessions; hence, GISH was an additional method to prove the hybrid origin of  $F_1$  plants and to confirm the transfer of D-genome chromosomes with *Lr34* locus into hybrid plants, *per se*. Unfortunately, *Lr46* locus identification cannot be supported by GISH because this method is not applicable to discriminate B-genome chromosomes of  $F_1$  hybrids, which were originated from both wheat and triticale parental forms.

A combination of MAS and GISH enabled to select triticale  $\times$  wheat hybrid plants with loci slow-rusting genes. Twingo  $\times$  Frontana 3671 hybrids seems to be the most promising prebreeding forms, considering the accumulation of both *Lr34*- and *Lr46*-resistant alleles. Those combinations will be used for seed propagation, further backcrossing, and resistance evaluation. The crucial approach for this research is to improve the crossability of triticale cultivars with chosen wheat pollinators. What is more, field and greenhouse resistance tests will be essential to confirm whether the transferred slow-rusting genes will provide resistance in the triticale background.

## REFERENCES

- Ayalew, H., Kumssa, T. T., Butler, T. J., and Ma, X.-F. (2018). Triticale improvement for forage and cover crop uses in the southern great plains of the United States. *Front. Plant Sci.* 9:1130. doi: 10.3389/fpls.2018.01130
- Boni, R., Chauhan, H., Hensel, G., Roulin, A., Sucher, J., Kumlehn, J., et al. (2018). Pathogen-inducible *Ta-Lr34res* expression in heterologous barley confers disease resistance without negative pleiotropic effects. *Plant Biotechnol. J.* 16, 245–253. doi: 10.1111/pbi.12765
- Dubcovsky, J., and Soria, M. A. (2017). *MAS Wheat*. Univ. California, Davis. Available online at: <https://maswheat.ucdavis.edu/> (accessed 2019).
- Dyck, P. L. (1977). Genetics of leaf rust reaction in three introductions of common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 19, 711–716. doi: 10.1139/g77-077
- Dyck, P. L., and Samborski, D. J. (1979). Ault-plant leaf rust resistance in PI 250413, an introduction of common wheat. *Can. J. Plant Sci.* 59, 329–332. doi: 10.4141/cjps79-053
- Ellis, J. G., Lagudah, E. S., Spielmeier, W., and Dodds, P. N. (2014). The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Front. Plant Sci.* 5:641. doi: 10.3389/fpls.2014.00641

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MK initiated the project and designed the study. MK and MM obtained the hybrid plants. RS and MM performed the identification of molecular markers and made the mitotic chromosome preparations. RS performed the GISH analysis. RS and WU analyzed the microscope images. MK and RS wrote the manuscript. AT supervised the methodology of molecular marker analyses. JN supervised the manuscript.

## FUNDING

This publication is being cofinanced by the framework of Ministry of Science and Higher Education program as “Regional Initiative Excellence” in years 2019–2022, project No. 005/RID/2018/19.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge and thank Prof. Evans Lagudah for providing protocol instructions and primer sequences for *csLV46G22* marker and his invaluable help with data interpretation, Dr. Harrold Bockelman at the USDA/ARS Small Grains Laboratory, Aberdeen (ID, United States) for providing the seeds of wheat accessions, Dr. Zofia Banaszak at the Danko Breeding Station, for providing seeds of triticale cultivars. In addition, we would also like to thank all of the reviewers and manuscript editor for their careful review of the manuscript and for their excellent suggestions for improving our initial work.

- Eriksson, D., Harwood, W., Hofvander, P., Jones, H., Rogowsky, P., Stöger, E., et al. (2018). A welcome proposal to amend the GMO legislation of the EU. *Trends Biotechnol.* 36, 1100–1103. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.001
- FAO (2018). *The State of Food and Agriculture 2018. Migration, Agriculture and Rural Development*. Rome: FAO.
- Kolmer, J. A. (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 435–455. doi: 10.1146/annurev.phyto.34.1.435
- Kolmer, J. A., Hanzalova, A., Goyeau, H., Bayles, R., and Morgounov, A. (2013). Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe. *Plant Pathol.* 62, 21–31. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02626.x
- Kwiatek, M., Belter, J., Majka, M., and Wiśniewska, H. (2016). Allocation of the S-genome chromosomes of *Aegilops variabilis* Eig. carrying powdery mildew resistance in triticale ( $\times$  Triticosecale Wittmack). *Protoplasma* 253, 329–343. doi: 10.1007/s00709-015-0813-6
- Kwiatek, M., Majka, M., Wiśniewska, H., Apolinarska, B., and Belter, J. (2015). Effective transfer of chromosomes carrying leaf rust resistance genes from *Aegilops tauschii* Coss. into hexaploid triticale ( $\times$  Triticosecale Witt.) using *Ae. tauschii*  $\times$  *Secale cereale* amphiploid forms. *J. Appl. Genet.* 56, 163–168. doi: 10.1007/s13353-014-0264-263

- Kwiatkiewicz, M. T., Kurasiak-Popowska, D., Mikołajczyk, S., Niemann, J., Tomkowiak, A., Weigt, D., et al. (2019). Cytological markers used for identification and transfer of *Aegilops* spp. chromatin carrying valuable genes into cultivated forms of *Triticum*. *Comp. Cytogenet.* 13, 2–19. doi: 10.3897/CompCytogen.v13i1.30673
- Kwiatkiewicz, M. T., and Nawracala, J. (2018). Chromosome manipulations for progress of triticale (*×Triticosecale*) breeding. *Plant Breed.* 137, 823–831. doi: 10.1111/pbr.12652
- Lagudah, E. S., Krattinger, S. G., Herrera-Foessel, S., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Spielmeyer, W., et al. (2009). Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theor. Appl. Genet.* 119, 889–898. doi: 10.1007/s00122-009-1097-z
- Lagudah, E. S., McFadden, H., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Bariana, H. S., and Spielmeyer, W. (2006). Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 114, 21–30. doi: 10.1007/s00122-006-0406-z
- Lukaszewski, A. J., Apolinar, B., and Gustafson, J. P. (1987). Introduction of the D-genome chromosomes from bread wheat into hexaploid triticale with a complete rye genome. *Genome* 29, 425–430. doi: 10.1139/g87-074
- McIntosh, R., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Appels, R., and Xia, X. (2016). *Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2015-2016 Supplement*. Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2015.pdf> (accessed April 2, 2019).
- McIntosh, R. A. (1995). "Catalogue of gene symbols for wheat," in *Proc. 8th Int. Wheat Genet. Symp.* eds Z. S. Li, and Z. Y. Xin (Beijing: China Agricultural Science).
- Mikhailova, L. A., Merezko, A. F., and Funtikova, E. Y. (2009). Triticale diversity in leaf rust resistance. *Russ. Agric. Sci.* 35:320. doi: 10.3103/S1068367409050097
- Periyannan, S., Milne, R. J., Figueroa, M., Lagudah, E. S., and Dodds, P. N. (2017). An overview of genetic rust resistance: from broad to specific mechanisms. *PLoS Pathog.* 13:e1006380. doi: 10.1371/journal.ppat.1006380
- Salmanowicz, B. P., Langner, M., Wiśniewska, H., Apolinar, B., Kwiatek, M., and Błaszczyk, L. (2013). Molecular, physicochemical and rheological characteristics of introgressive *Triticale/Triticum monococcum* ssp. *monococcum* lines with wheat 1D/1A chromosome substitution. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 15595–15614. doi: 10.3390/ijms140815595
- Sanaei, S., and Stuart, P. (2018). Systematic assessment of triticale-based biorefinery strategies: techno-economic analysis to identify investment opportunities. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 12, S46–S59. doi: 10.1002/bbb.1499
- Schwarzacher, T., Anamthawat-Jónsson, K., Harrison, G. E., Islam, A. K., Jia, J. Z., King, I. P., et al. (1992). Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84, 778–786. doi: 10.1007/BF00227384
- Singh, R. P., Mujeeb-Kazi, A., and Huerta-Espino, J. (1998). Lr46: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88, 890–894. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.9.890
- Skowrońska, R., Kwiatek, M., Tomkowiak, A., and Nawracala, J. (2019). Development of multiplex PCR to detect slow rust resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *J. Appl. Genetics* 60, 301–304. doi: 10.1007/s13353-019-00520-z
- Suenaga, K., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., and Williams, H. M. (2003). Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology* 93, 881–890. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.7.881
- Williams, M., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Islas, S. O., and Hoisington, D. (2003). Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene *Lr46* and its association with stripe rust resistance gene *Yr29* in wheat. *Phytopathology* 93, 153–159. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.2.153

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Skowrońska, Mariańska, Ulaszewski, Tomkowiak, Nawracala and Kwiatek. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**5. Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* "slow rusting" locus in wheat ( *Triticum aestivum* L.)**

**Bobrowska R.**, Noweiska A., Spychała J., Tomkowiak A.,  
Nawracała J., Kwiatek M.

*Biomolecular Concepts*, 13(1):1-9

<https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>

**pkt wg MEiN – 70,000**

## Research Article

Roksana Bobrowska, Aleksandra Noweiska, Julia Sychała, Agnieszka Tomkowiak, Jerzy Nawracała, Michał T. Kwiatek\*

## Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* “slow rusting” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.)

<https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>

received December 14, 2021; accepted February 3, 2022

**Abstract:** Wheat leaf rust, caused by fungal pathogen *Puccinia triticina* Erikss, annually contributes to production losses as high as 40% in susceptible varieties and remains as one of the most damaging diseases of wheat worldwide. Currently, one of the major challenges of wheat geneticists and breeders is to accumulate major genes for durability of rust resistance called “slow rusting” genes using marker-assisted selection (MAS). Until now, eight genes (*Lr34/Yr18*, *Lr46/Yr29*, *Lr67/Yr46*, *Lr68*, *Lr74*, *Lr75*, *Lr77*, and *Lr78*) conferring resistance against multiple fungal pathogens have been identified in wheat gene pool and the molecular markers were developed for them. In MAS practice, it is a common problem that cultivars exhibiting desirable marker genotypes may not necessarily have

the targeted genes or alleles and vice versa, which is known as “false positives.” The aim of this study was to compare the available four markers: *Xwmc44*, *Xgwm259*, *Xbarc80*, and *csLV46G22* markers (not published yet), for the identification of the *Lr46/Yr29* loci in 73 genotypes of wheat, which were reported as sources of various “slow rusting” genes, including 60 with confirmed *Lr46/Yr29* gene, reported in the literature. This research revealed that *csLV46G22* together with *Xwmc44* is most suitable for the identification of resistance allele of the *Lr46/Yr29* gene; however, there is a need to clone the *Lr46/Yr29* loci to identify and verify the allelic variation of the gene and the function.

**Keywords:** *csLV46G22*, molecular markers, *Puccinia triticina*, wheat, *Xbarc80*, *Xgwm259*, *Xwmc44*

\* **Corresponding author: Michał T. Kwiatek**, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str, 60-632 Poznań, Poland, e-mail: [michal.kwiatek@up.poznan.pl](mailto:michal.kwiatek@up.poznan.pl)

**Roksana Bobrowska:** Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str, 60-632 Poznań, Poland, e-mail: [roksana.bobrowska@up.poznan.pl](mailto:roksana.bobrowska@up.poznan.pl)

**Aleksandra Noweiska:** Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str, 60-632 Poznań, Poland, e-mail: [aleksandra.noweiska@up.poznan.pl](mailto:aleksandra.noweiska@up.poznan.pl)

**Julia Sychała:** Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str, 60-632 Poznań, Poland, e-mail: [julia.sychala@up.poznan.pl](mailto:julia.sychala@up.poznan.pl)

**Agnieszka Tomkowiak:** Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str, 60-632 Poznań, Poland, e-mail: [agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl](mailto:agnieszka.tomkowiak@up.poznan.pl)

**Jerzy Nawracała:** Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd Str, 60-632 Poznań, Poland, e-mail: [jerzy.nawracala@up.poznan.pl](mailto:jerzy.nawracala@up.poznan.pl)

## Introduction

Genetic mapping is used for the identification of the locus of a gene as well as for the determination of the distance between two genes or between a gene and a marker. Gene mapping is considered as the common breeding tool in which molecular markers are used. The principle of genetic mapping is chromosomal recombination during meiosis, which results in the segregation of loci. DNA sequences present close to the gene of interest on the same chromosome are known as linked markers. A marker without recombination to the locus of gene of interest, ideally drawn directly from the gene sequence, is described as a perfect marker [1]. Moreover, markers that could be used in multiple genetic backgrounds, ideally the marker–trait association that is valid in all germplasm, can be considered as diagnostic markers [1]. Since the 1980s, several types of molecular markers have been used in plant breeding, including random amplified polymorphic DNA, restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism, microsatellite or simple sequence repeats,

and cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) [2]. Molecular markers have great potential to improve the efficiency and precision of conventional plant breeding via marker-assisted selection (MAS). This approach has been successfully practiced all over the world to supplement conventional breeding programs of plants such as wheat [3], maize [4], barley [1], and soybean [5]. Mackill and Ni (2000) and Mohler and Singrun (2004) delineated five main considerations for the use of DNA markers in MAS: reliability, quantity and quality of DNA required, technical procedure for marker assay, level of polymorphism, and cost. One of the most challenging issues is to examine the utility of molecular markers in various genetic backgrounds [6], especially breeding lines or cultivars.

Leaf rust is one of the major foliar diseases in majority of wheat-growing zones of the world. The disease is caused by obligate biotrophic fungus *Puccinia triticina* Erikss. & Henn. (*Pt*), which causes serious losses in crops every year in all wheat-growing areas of the world [7–11]. However, the incidence of leaf rust epidemics can be controlled through the surveillance of resistant pathogens, the development and distribution of resistant cultivars, and the judicious use of fungicides [12]. The population of *Puccinia triticina* consists of many physiological races with varying levels of virulence due to the airborne nature of the fungus and frequent mutation/selection. Therefore, a pathogen can rapidly develop virulence against varieties with one or more resistance genes that have been effective against the races of the pathogen found in the region [13]. It is reported that vertical resistance caused by a specific leaf rust resistance (*Lr*) gene does not last longer than 5–7 years [14], so new sources of resistance should be constantly searched for and introduced into wheat breeding programs.

More than 80 *Lr* genes have been identified and most of them were already mapped on specific wheat chromosomes using DNA markers [15]. Some of them are known as slow rust resistance genes, which are race nonspecific and confer durable adult plant resistance against multiple fungal disease in wheat [16]. The most important genes belonging to the category of “slow rusting” or APR include *Lr34/Yr18/Sr57/Ltn1* [17], *Lr46/Yr29/Sr58/Ltn2* [18], and *Lr67/Yr46/Sr55/Ltn3* [19], which confer partial resistance to leaf rust, yellow rust, and stem rust. These genes are associated with flag leaf tip necrosis (LTN), a post-flowering morphological trait [20,21].

Singh *et al.* [18] first identified APR gene *Lr46* on chromosome 1B in the wheat cultivar Pavon76. The *Lr46* cosegregates with stripe rust resistance (*Yr29*) [18], stem rust resistance (*Sr58*) [22], powdery mildew resistance (*Pm39*) [23], and LTN (*Ltn2*) [24]. The effect of expression of *Lr46*

gene is smaller than of *Lr34*, but *Lr46* gene is more effective at cooler temperatures [25]. The mechanism of slow rusting genes is still not well understood. Preliminary studies by CSIRO Plant Industry, Australia reported that the molecular mechanisms of *Lr34* and *Lr46* are different, and that *Lr46* gene does not encode an ABC transporter protein like *Lr34* [26]. So far, the sequence of the *Lr46* gene has not been published, despite very intensive work in this area. Lagudah (personal communication 2020) identified several candidate genes that confer resistance to mature wheat plants. To date, several markers have been used in the research to identify the *Lr46* gene in wheat: *Xwmc44* [27], *Xgwm259* [28], *Xbarc80* [29], and *csLV46G22* (E. Lagudah, unpublished data), but there are no data available of comparative efficacy markers in correlation to the distance of the marker locus from the gene on the chromosome and to field observations.

The objective of the present study was to compare four molecular markers for the identification of the *Lr46* gene. The study was carried out on the wheat accessions, which were described by National Small Grain Collection (Agricultural Research Station in Aberdeen, WA, USA) as the source of slow rusting genes.

## Materials and methods

### Plant material

The plant material consisted of 73 wheat *T. aestivum* L. genotypes (Table 1), which are reported as sources of “slow rusting” genes and “Pavon 76” wheat cultivar considered as the reference for the presence of *Lr46* locus. Based on the literature data and genotype pedigrees, the *Lr46* gene locus is postulated in 60 out of 73 analyzed genotypes. The cultivars were derived from the National Small Grain Collection located at the Agricultural Research Station in Aberdeen, WA, USA.

### Identification of molecular markers linked *Lr46/Yr29* locus

To confirm the presence of molecular markers in tested wheat cultivars, genomic DNA was isolated from the leaves of 10-day-old seedlings using the GeneMATRIX Plant and Fungi DNA Purification Kit (EURx Ltd, Poland), according to the attached procedure. DNA concentration and quality were determined using the DeNovix spectrophotometer

Table 1: Presence of *Xwmc44*, *Xgwm259*, *Xbarc80*, and *csLV46G22* markers linked to *Lr46/Yr29* locus in tested wheat genotypes with reported *Lr46/Yr29* resistance allele

No	Cultivar/ genotype	Plant ID	Postulated "slow rusting" loci*	<i>Xwmc44</i> ( <i>Lr46</i> / <i>Yr29</i> )	<i>Xgwm259</i> ( <i>Lr46</i> / <i>Yr29</i> )	<i>Xbarc80</i> ( <i>Lr46</i> / <i>Yr29</i> )	<i>csLV46G22</i> ( <i>Lr46</i> / <i>Yr29</i> )	No	Cultivar/ Genotype	Plant ID	Postulated "slow rusting" loci*	<i>Xwmc44</i> ( <i>Lr46</i> / <i>Yr29</i> )	<i>Xgwm259</i> ( <i>Lr46</i> / <i>Yr29</i> )	<i>Xbarc80</i> ( <i>Lr46</i> / <i>Yr29</i> )	<i>csLV46G22</i> ( <i>Lr46</i> / <i>Yr29</i> )
1	Cenuga-4	PI 560118	<i>Lr46</i>	+	-	-	+	38	San Martin	PI 117500	<i>Lr46</i>	-	+	-	+
2	San Martin	PI 116314	<i>Lr46</i>	-	+	-	+	39	San Martin	Cltr 8437	<i>Lr46</i>	-	+	-	+
3	H 51	PI 191925	<i>Lr46</i>	-	+	-	+	40	Record	Cltr 8399	<i>Lr46</i>	-	+	-	+
4	Artigas	PI 192535	<i>Lr46</i>	-	+	-	+	41	Frontana	Cltr 12470	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
5	Larranaga	PI 191713	<i>Lr46</i>	-	+	-	+	42	Chris	Cltr 13751	<i>Lr34</i>	+	-	-	-
6	ProINTA Imperial	PI 674008	<i>Lr46</i>	-	-	-	+	43	ROD	PI 191772	<i>Lr34</i>	+	-	+	+
7	NP 818	PI 422294	<i>Lr46</i>	-	+	-	+	44	Frontana	PI 193932	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
8	Buck Manantial	PI 344455	<i>Lr46</i>	-	-	-	+	45	3671 Frontana	PI 193933	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
9	Janz	PI 591910	<i>Lr34</i>	+	-	-	-	46	Frontana	PI 193934	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
10	7536K-51A4	PI 553001	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	+	+	47	Fronthatch-1	PI 290745	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
11	7531-V3D	PI 552994	<i>Lr34, Lr46</i>	-	+	+	+	48	Fronthatch-2	PI 297014	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
12	Jacul	PI 520498	<i>Lr34, Lr46</i>	-	-	-	+	49	Fronthatch-3	PI 299419	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
13	P8802- CI*3A2C16	PI 596351	<i>Lr34</i>	+	-	-	-	50	Toropi	PI 344200	<i>Lr34, Lr46</i>	-	-	-	+
14	P8802- CI*3A2A2U	PI 596350	<i>Lr34</i>	+	-	-	-	51	Frontaleza	PI 351779	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
15	HD 2329	PI 648391	<i>Lr34, Lr46</i>	-	+	-	+	52	Sparrow	PI 519725	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
16	K494	PI 250413	<i>Lr67</i>	-	+	-	-	53	Pavon F76	PI 519847	<i>Lr46</i>	+	+	+	+
17	Glenlea	Cltr 17272	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+	54	Pavon 76	PI 520003	<i>Lr46</i>	+	+	+	+
18	Artigas	PI 73046	<i>Lr46</i>	-	-	-	-	55	Pavon	PI 520054	<i>Lr46</i>	+	+	-	+
19	Amurskaya 90	PI 592036	<i>Lr34, Lr46</i>	-	+	-	+	56	Pavon	PI 520172	<i>Lr46</i>	+	+	-	+
20	Lerma Rojo	Cltr 13651	<i>Lr34, Lr46</i>	+	-	-	+	57	Myna	PI 520334	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	-	+
21	363-11	PI 527696	<i>Lr46</i>	+	+	-	+	58	Junco	PI 519947	<i>Lr46</i>	-	+	-	+
22	256-3	PI 527695	<i>Lr46</i>	+	+	-	+	59	Tanager	PI 519878	<i>Lr46</i>	+	+	-	+
23	NP 846	PI 322263	<i>Lr46, Lr67</i>	-	+	-	+	60	Parula	PI 520340	<i>Lr34, Lr46, Lr68</i>	-	+	-	+
24	75M-505- 001-001	PI 556464	<i>Lr34, Lr46</i>	-	+	+	+	61	Rayon 89	PI 591786	<i>Lr34, Lr46, Lr68</i>	-	+	+	+
25	7531-AP5A	PI 552997	<i>Lr34, Lr46</i>	+	+	+	+	62	Cumpas 88	PI 591786	<i>Lr34, Lr46, Lr68</i>	-	+	-	+
26	7531-A65B	PI 552996	<i>Lr34, Lr46</i>	-	+	-	+	63	Mochis 88	PI 591791	<i>Lr34, Lr46, Lr68</i>	-	+	-	+

(Continued)

Table 1: Continued

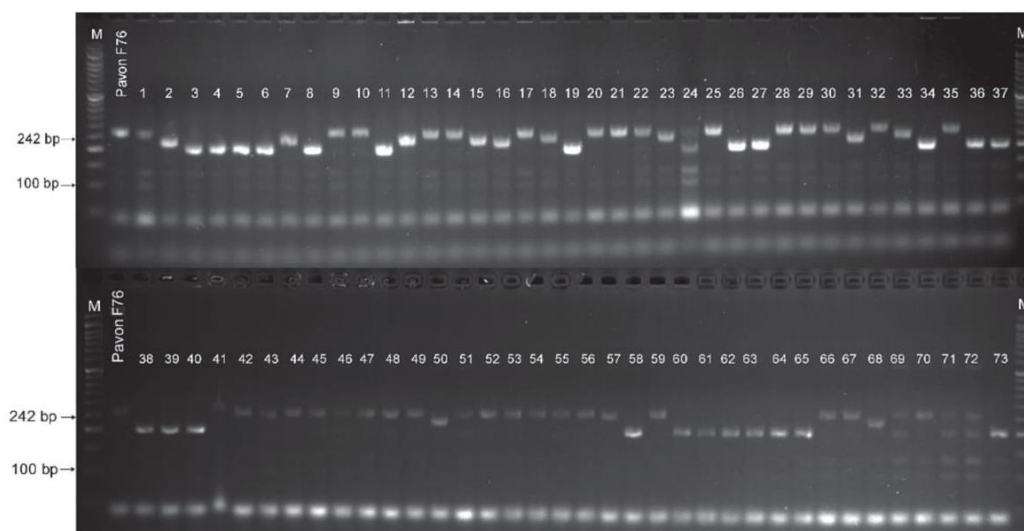
No	Cultivar/ genotype	Plant ID	Postulated "slow rusting" loci*	Xwmc44 (Lr46/ Yr29)	Xgwm259 (Lr46/ Yr29)	Xbarc80 (Lr46/ Yr29)	csLV46G22 (Lr46/Yr29)	No	Cultivar/ Genotype	Plant ID	Postulated "slow rusting" loci*	Xwmc44 (Lr46/ Yr29)	Xgwm259 (Lr46/ Yr29)	Xbarc80 (Lr46/ Yr29)	csLV46G22 (Lr46/Yr29)
27	7531-AG5A	PI 552995	Lr34, Lr46	-	+	-	+	64	P8901-AP	PI 613175	-	-	+	-	-
28	CM 46725- 3P-1P- 3P-2P	PI 520562	Lr34, Lr46	+	+	+	+	65	P8901-AQ	PI 613176	-	-	+	-	-
29	Cook	PI 442900	Lr34	+	+	-	+	66	Tlaxcala F2000	PI 619634	Lr34, Lr46	+	+	-	+
30	PAT 7219	PI 422416	Lr34, Lr46	+	-	-	+	67	Lr34	GSTR 433	Lr34	+	-	-	-
31	HI 617	PI 422283	Lr46, Lr67	-	-	-	-	68	IWA8608696	PI 624623	Lr34	-	+	-	-
32	Oxley	PI 386167	Lr34, Lr46	+	-	-	-	69	Anza	PI 638742	Lr34	+	-	-	-
33	NP 718	PI 322236	Lr46, Lr67	-	-	-	+	70	UC1110	PI 671999	Lr34, Lr46	+	-	-	+
34	San Martin	PI 104137	Lr46	-	-	-	+	71	Kern	PI 672001	Lr34	+	+	-	+
35	A99AR	PI 600923	Lr34, Lr46	+	+	+	+	72	TX89D6435	PI 584759	Lr34, Lr46	+	-	-	+
36	Klein San Martin	PI 191884	Lr46	-	+	-	+	73	Purdue	Citr 13227	Lr34, Lr46	-	+	-	+
37	H 51	PI 184512	Lr46	-	+	-	-								

\*(<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx>, based on Xwmc44 marker analysis [48]).

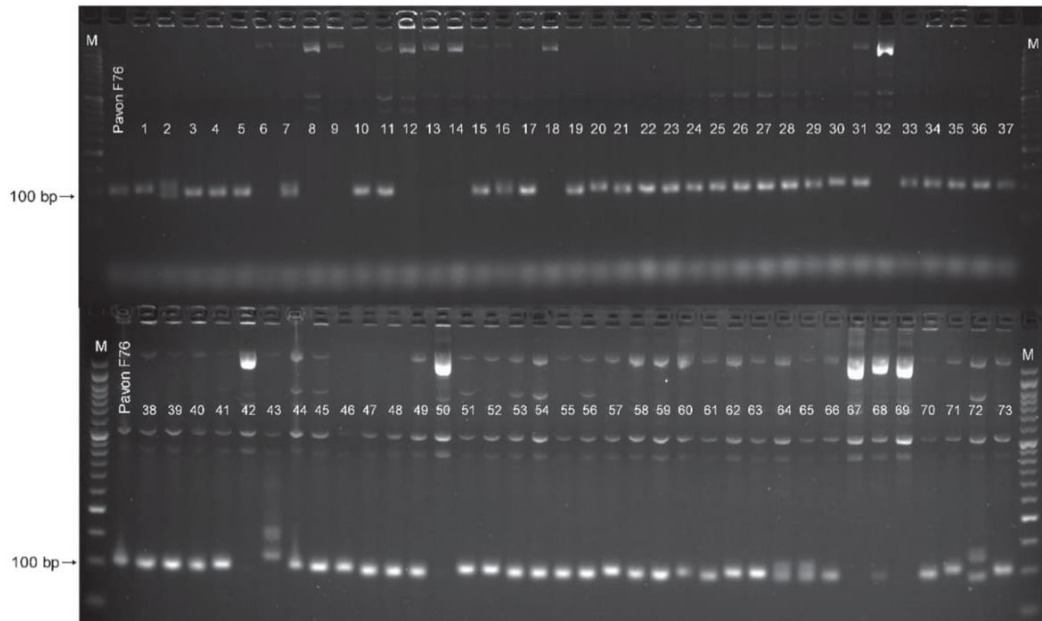
(DeNovix Inc., USA) at 260 nm. The samples were diluted with Tris buffer (EURx Ltd, Poland) to obtain a uniform concentration of 50 ng/ $\mu$ L. The following molecular markers: *csLV46G22R*, *Xwmc44*, *Xgwm259*, and *Xbarc80* were used to confirm the presence of alleles connected with *Lr46* gene. The PCR was carried out in 20  $\mu$ L volume, consisting of 1  $\mu$ L of two primers (Sigma); 12.5  $\mu$ L FastGene® Optima HotStart ReadyMix (NIPPON Genetics Europe GmbH), which included FastGene® Optima DNA Polymerase blend (0.2 U per  $\mu$ L reaction), FastGene® Optima Buffer (1 $\times$ ), dNTPs (0.4 mM of each dNTP at 1 $\times$ ), MgCl<sub>2</sub> (4 mM at 1 $\times$ ), and stabilizers. PCR procedure was modified with reference to the standard protocol. The primer annealing temperatures of the marker primers were 61°C for *Xwmc44* [33], 56°C for *Xgwm259* [35], and 50°C for *Xbarc80* [33]. The final PCR consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles (denaturation, 94°C for 45 s; primer annealing, 60°C for 30 s; elongation, 72°C for 1 min), followed by the final extension for 7 min at 72°C and storage at 4°C. The *csLV46G22* PCR amplification products were digested with the reaction enzyme BspEI (Thermo Fisher Scientific, USA) at 37°C for 1 h (Lagudah, pers. comm. 2020). The Labcycler thermal cycler (SensoQuest GmbH) was used to carry out the reaction and digestion. The PCR products were separated on 2% agarose (Bioshop, Canada Inc.) gel in 1  $\times$  TBE buffer (Bioshop, Canada Inc.) for one and a half hour. DNA was visualized using Midori Green Advanced DNA Stain (Nippon Genetics Europe, Germany) that was added to agarose gel.

## Results and discussion

The presented work aimed at showing the differences between the results of the *Lr46/Yr29* locus identification using four markers (*Xwmc44*, *Xgwm259*, *Xbarc80*, and *csLV34G22*) located at different distances from the gene locus. In 2003, Suenaga et al. [29] determined that the microsatellite locus *Xwmc44* marker is located 5.6 cM proximal to the putative QTL for *Lr46*. The authors scored genotypic effects of marker loci, *Xwmc44* (*Lr46/Yr29*) and *Xgwm295* (*Lr34/Yr18*), on leaf rust resistance QTLs and found out that the two genes did not work additively [29]. Furthermore, *Xwmc44* marker was reported as diagnostic and completely linked with *Lr46* gene [30–32]. In our experiment, the specific product for the marker *Xwmc44* with a size of 242 bp was present in 38 out of 73 tested genotypes (Table 1 and Figure 1). Another microsatellite marker, *Xgwm259*, was also analyzed. The locus of marker maps approximately 20 cM distal to *Lr46* [26]. According to the literature, the expected product should be 105 bp [26]. Due to the large number of nonspecific products of similar size to the amplified specific product, it was difficult to evaluate by standard electrophoresis using 2% agarose gel (Figure 2). A similar problem emerged with the identification of the *Xbarc80* marker. Microsatellite locus *Xbarc80* maps 10–11 cM distal to *Xgwm259*. The expected marker product according to Giffey et al. [33] is 100 bp; however, according to the MASwheat database [34] and the marker



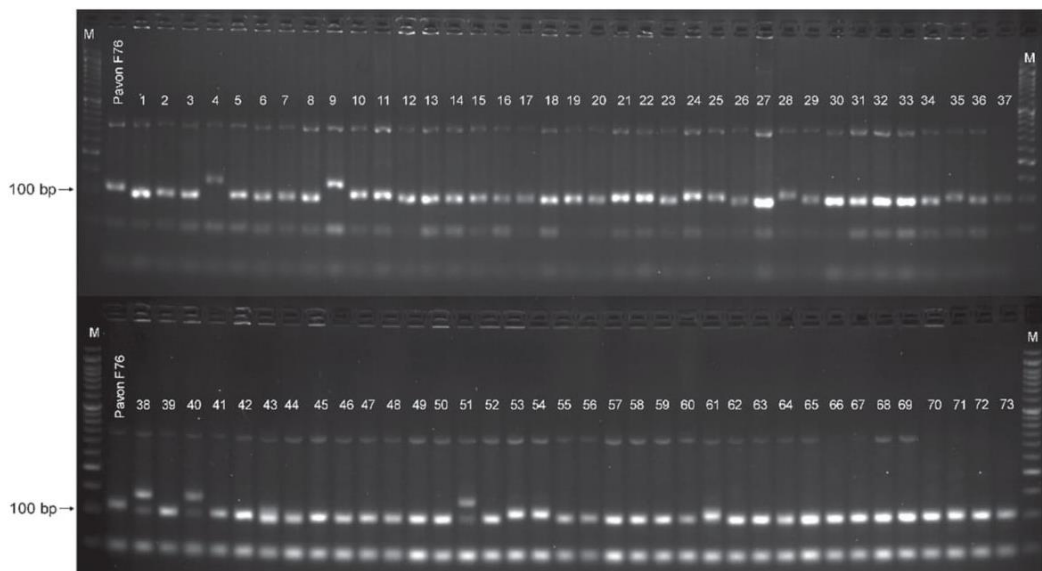
**Figure 1:** Electropherogram showing the presence of molecular marker *Xwmc44* in tested genotypes. M, FastGene 50 bp DNA Ladder (NIPPON Genetics EUROPE GmbH); 1–73 – wheat genotypes.



**Figure 2:** Amplification products of PCR of wheat genotypes with *Xgwm259* marker linked to *Lr46* locus. M, FastGene 50 bp DNA Ladder (NIPPON Genetics EUROPE GmbH); 1–73 – wheat genotypes.

electrophoresis attached therein, the expected product for the reference genotype is above the 100 bp standard. According to our analyses, the specific product identified in the Pavon F76 reference genotype was also slightly greater than 100 bp (Figure 3). Based on multiple repetitions of the *Lr46/Yr29* locus identification using both the marker

*Xgwm259* and *Xbarc80*, we assessed the presence of the markers linked with the resistance allele. We identified a product specific for *Xgwm259* marker in 52 out of 73 analyzed genotypes (Table 1 and Figure 2), while the product of *Xbarc80* marker appeared in 11 genotypes (Table 1 and Figure 3). The last analyzed marker was *csLV46G22*, which



**Figure 3:** Electropherogram showing the presence of *Xbarc80* marker linked to *Lr46* gene in tested genotypes. M, FastGene 50 bp DNA Ladder (NIPPON Genetics EUROPE GmbH); 1–73 – wheat genotypes.

is tightly linked to the *Lr46* gene (Lagudah, pers. comm. 2020). As a result of the analyses, the marker locus was identified in 60 out of 73 analyzed genotypes (Table 1). It was reported that *csLV46G22* is highly reliable and close to 100% diagnostic marker for the *Lr46* gene [35,36]. This marker was used in many studies on the identification of the *Lr46* gene in wheat [37–40] and triticale [41,42]. However, the primer sequences and protocols are not published by the developer, hence the marker cannot be considered for MAS, so far. Similarly, Huerta-Espino et al. [21] used two SNP markers (Viccars, L., Chandramohan, S., and Lagudah, E. unpublished data), which were located in the proximity of *Lr46*, with the purpose to screen a collection of bread wheat cultivars from Mexico. The other markers are located at a greater distance from the gene, and the obtained significant differences in the results indicate the unsuitability of the markers for the identification of the *Lr46* gene. Our results of the identification of the *Xwmc44* marker coincide 52% with the *csLV46G22* marker, 75% with the *Xgwm259* marker, and 32% with the *Xbarc80* marker. Only 12% of the genotypes achieved the same result for all markers (Table 1). To validate and confirm the occurrence of *L46* gene, Liu et al. [43] used the following molecular markers: *Xwmc44*, *Xgwm259*, and *Xbarc80*, jointly. Kolmer et al. [44] used the  $F_6$  recombinant inbred lines (RILs) “Thatcher”\*3/“CI13227” with *csLV46G22* marker to map the 1BL chromosome region that was highly associated with resistance to multiple pathogens. The authors reported that *csLV46G22* marker identified the leaf rust, stripe rust, and powdery mildew resistance at significant level [nr]. However, in the present study this marker appeared to be negative (together with other three markers) for genotype no. 31 (HI 617; PI 422283; Sujata), which was reported as a parental to carry *Lr46/Yr29* gene [45,46]. According to Lan et al. [45], the *Lr46/Yr29* gene was detected in the Avocet YrA × Sujata RIL population. It can lead to the hypothesis that the linkage between available markers and *Lr46/Yr29* loci can be broken. What is more interesting in our another study (not published) is that we confirmed that genotype HI617 – Sujata possesses *Lr67* gene, which was also reported by Lan et al. [45].

Considering the results of molecular analyses, it should be stated that *csLV46G22* marker can be considered as the reliable positive marker for the identification of the *Lr46* gene, but the analyses should be supported by the additional screening of *Xwmc44* marker. The *csLV46G22* CAPS marker is codominant and appeared to be useful for MAS in wheat breeding programs after publishing the primer sequences and protocols. It should be mentioned that scoring of LTN, a morphological trait (*Ltn2*), which is closely linked to *Lr46/Yr29* loci [23], can also be considered for selection of resistant wheat genotypes.

In summary, it can be said that the extended durability of the *Lr46* gene seems to be suitable for attempting to clone this gene or genes based on the previous studies of wheat multipathogen APR genes *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* and *Lr67/Yr46/Sr55/Pm46*. Cobo et al. mapped the 1BL chromosome region which overlaps with *Lr46/Yr29* loci [35]. These authors identified 13 genes in the candidate region that are annotated with functions associated with disease resistance. The latest maps for *Lr46/Yr29* from Pavon 76 place this locus between TraesCS1B01G453900 and *csLV46G22* (Lagudah, unpublished data, 2018), a region very similar to the candidate region of the 332 kb gene for QYr.ucw-1BL identified by Cobo et al. [35]. Tomkowiak et al. [47] reported the differences in the expression of microRNAs (miR5085 and miR164) associated with the *Lr46* gene and proved that miR164 can be involved in leaf rust resistance mechanisms. Detailed identification of *Lr46/Yr29* region sequence will be a key issue for characterizing the allelic variation presence in breeding collections of wheat and become a significant support for MAS programs.

**Acknowledgements:** The authors would like to acknowledge Dr Harrold Bockelman at the USDA/ARS Small Grains Laboratory, Aberdeen (ID, USA) for providing the seed samples. The authors thank Prof. Evans Lagudah for providing protocol instructions and primer sequences for *csLV46G22* marker.

**Funding information:** This research and the APC were financed by the framework of Ministry of Agriculture and Rural Development (Poland) program as “Biological Progress in Plant Production” in years 2021–2027, task no. 5: “A molecular analysis of an adult plant slow rusting genes conferring resistance to rusts caused by *Puccinia* sp” (KS.zb.802.10.2021).

**Author contributions:** RS made the experiments and analyses, wrote the first draft, and incorporated all inputs from co-authors. AN made the experiments and analyses. MK initiated and administered the project, conceived and designed the experiments. MK, AN, JS, AT, and JN revised the draft and made suggestions for improving the manuscript. MK revised the manuscript.

**Conflict of interest:** The authors state no conflict of interest.

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

## References

- [1] Miedaner T, Korzun V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding. *Phytopatol.* 2012 May 12;102(6):560–6.
- [2] Kage U, Kumar A, Dhokane D, Karre S, Kushalappa AC. Functional molecular markers for crop improvement. *Crit Rev Biotechnol.* 2015 Jul 14;36(5):917–30.
- [3] Gupta S, Prasad M. Development and characterization of genic SSR markers in medicago truncatula and their transferability in leguminous and non-leguminous species. *Genome.* 2009 Aug 28;52:761–71.
- [4] Prasanna BM, Pixley K, Warburton ML, Xie CX. Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia. *Mol Breed.* 2010 Aug 01;26(2):339–56.
- [5] Saghai Maroof MA, Jeong SC, Gunduz I, Tucker DM, Buss GR, Tolin SA. Pyramiding of soybean mosaic virus resistance genes by marker-assisted selection. *Crop Sci.* 2008 Mar 01;48(2):517–26.
- [6] Platten JD, Cobb JN, Zantua RE. Criteria for evaluating molecular markers: Comprehensive quality metrics to improve marker-assisted selection. *PLoS one.* 2019 Jan 15;14(1):e0210529.
- [7] Huerta-Espino J, Singh RP, Germán S, McCallum BD, Park RF, Chen WQ, et al. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica.* 2011 May 1;179(1):143–60.
- [8] Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Mol Plant Pathol.* 2008 Sep;9(5):563–75.
- [9] Singh RP, Huerta-Espino, Pfeiffer W, Figueroa-Lopez P. Occurrence and impact of a new leaf rust race on durum wheat in northwestern Mexico from 2001 to 2003. *Plant Dis.* 2004;88:703–8.
- [10] Germán S, Kohli M, Chaves M, Labes Barcellos A, Nisi J, Annone J, et al. Breakdown of resistance of wheat cultivars and estimated losses caused by recent changes in the leaf rust population of South America. *Proceedings of the 11th International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference, Norwich, England, August 22–27, 2004, Cereal Rusts and Powdery Mildews Bulletin.* John Innes Centre, Norwich, England, 2004; Abstract 2.21.
- [11] Pretorius ZA. Occurrence and pathogenicity of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat in South Africa from 1983 through 1985. *Plant Dis.* 1987;71(12):1133.
- [12] Prasad P, Savadi S, Bhardwaj SC, Gupta PK. The progress of leaf rust research in wheat. *Fungal Biol.* 2020 Feb 29;124(6):537–50.
- [13] McCallum BD, Hiebert CW, Cloutier S, Bakkeren G, Rosa SB, Humphreys DG, et al. A review of wheat leaf rust research and the development of resistant cultivars in Canada. *Can J Plant Pathol.* 2016 Jan 2;38(1):1–18.
- [14] Kilpatrick RA. Data from: new wheat cultivars, and longevity of the rust resistance, 1971–75. *Beltsville: United States Department of Agriculture;* 1975.
- [15] McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Xia XC. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 supplement. Available at <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf> [Verified 21 November 2019]. 2017;36:103–10.
- [16] Peng FY, Yang R-C. Prediction and analysis of three gene families related to leaf rust (*Puccinia triticina*) resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol.* 2017 Jun 20;17(1):108.
- [17] Singh R, Herrera-Foessel SA, Huerta-Espino J, Bariana HS, Bansal U, McCallum BD et al. *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Bdv1/Ltn1* confers slow rusting, adult plant resistance to *Puccinia graminis tritici* 13th Cereal Rust and Powdery Mildew Conference. Beijing: Friendship Hotel; August 28–September 1, 2012. p. 173
- [18] Singh RP, Herrera-Foessel SA, Huerta-Espino J, Lan CX, Basnet BR, Bhavani S et al. Pleiotropic gene *Lr46/Yr29/Pm39/Ltn2* confers slow rusting, adult plant resistance to wheat stem rust fungus. *Proceedings Borlaug Global Rust Initiative.* New Delhi, India: 2013 Technical Workshop, 19–22 August, p. 17.1.
- [19] Herrera-Foessel SA, Singh RP, Lillemo M, Huerta-Espino J, Bhavani S, Singh S, et al. *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theor Appl Genet.* 2014 Jan 10;127(4):781–9.
- [20] William M, Singh RP, Huerta-Espino J, Ortiz Islas S, Hoisington D. Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene *Lr46* and its association with stripe rust resistance gene *Yr29* in wheat. *Phytopathology.* 2003 Feb;3:153–9.
- [21] Huerta-Espino J, Singh R, Crespo-Herrera LA, Villaseñor-Mir HE, Rodriguez-Garcia MF, Dreisigacker S, et al. Adult plant slow rusting genes confer high levels of resistance to rusts in bread wheat cultivars from Mexico. *Front Plant Sci.* 2020 Jul 14;11:824.
- [22] Singh S, Singh RP, Bhavani S, Huerta-Espino J, Eugenio LVE. QTL mapping of slow-rusting, adult plant resistance to race Ug99 of stem rust fungus in PBW343/Muu RIL population. *Theor Appl Genet.* 2016 Feb 26;126:1367–75.
- [23] Rosewarne GM, Singh RP, Huerta-Espino J, William HM, Bouchet S, Cloutier S, et al. Leaf tip necrosis, molecular markers and  $\beta$ 1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes *Lr46/Yr29*. *Theor Appl Genet.* 2006 Feb 1;112(3):500–8.
- [24] Lillemo M, Asalf B, Singh RP, Huerta-Espino J, Chen XM, He ZH, et al. The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theor Appl Genet.* 2008 May;116(8):1155–66.
- [25] Lagudah ES. Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat. *Euphytica.* 2011 May 1;179(1):81–91.
- [26] Somers DJ, Isaac P, Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet.* 2004 Oct 1;109(6):1105–14.
- [27] Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M-H, Leroy P, et al. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998 Aug 1;149(4):2007–23.
- [28] Lowe I, Jankuloski L, Chao S, Chen X, See D, Dubcovsky J. Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly virulent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. *Theor Appl Genet.* 2011 Apr 01;123(1):143–57.
- [29] Suenaga K, Singh RP, Huerta-Espino J, William HM. Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathol.* 2003 Jul 1;93(7):881–90.

- [30] Mutari B, Udupa SM, Mavindidze P, Mutengwa CS. Detection of rust resistance in selected Zimbabwean and ICARDA bread wheat (*Triticum aestivum*) germplasm using conventional and molecular techniques. *South Afr J Plant Soil*. 2017 Nov 8;35(2):101–10.
- [31] Kumar S, Phogat BS, Vikas VK, Sharma AK, Saharan MS, Singh AK, et al. Mining of Indian wheat germplasm collection for adult plant resistance to leaf rust. *PLoS One*. 2019 Mar 28;14(3):e0213468.
- [32] Dubey NK, Upadhyay SA. Genetic characterization of leaf tip necrosis and its effect on quantitative traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Curr J Appl Sci Technol*. 2020 Dec 14;39(39):72–81.
- [33] Griffey CA, Thomason WE, Pitman RM, Beahm BR, Paling JJ, Chen J, et al. Registration of 'USG 3555' Wheat. *J Plant Regist*. 2009 Sep 1;3(3):273–8.
- [34] Rust resistance gene *Lr46-Yr29*. Available online: <https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr46> (accessed on 08.10.2021).
- [35] Cobo N, Wanjugi H, Lagudah E, Dubcovsky J. A high-resolution map of wheat *QYr.ucw-1BL*, an adult plant stripe rust resistance locus in the same chromosomal region as *Yr29*. *Plant Genome*. 2019 Mar 1;12:180055.
- [36] Ren Y, Singh RP, Basnet BR, Lan CX, Huerta-Espino J, Lagudah ES, et al. Identification and mapping of adult plant resistance loci to leaf rust and stripe rust in common wheat cultivar Kundan. *Plant Dis*. 2017 Jan 12;101:456–63.
- [37] Lan C, Li Z, Herrera-Foessel SA, Huerta-Espino J, Basnet BR, Dreisigacker S, et al. Identification and mapping of two adult plant leaf rust resistance genes in durum wheat. *Mol Breed*. 2019;39:118.
- [38] Kankwatsa P, Park RF, Singh D. African wheat germplasm—a valuable resource for resistance to rust diseases. *Plant Pathol*. 2019 Jun 19;68(7):1308–19.
- [39] Ye B, Singh RP, Yuan C, Liu D, Randhawa MS, Huerta-Espino J, et al. Three co-located resistance genes confer resistance to leaf rust and stripe rust in wheat variety Borlaug 100. *Crop J*. 2021. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214514121001604?via%3Dihub>.
- [40] Zhang P, Qi A, Zhou Y, Xia X, He Z, Li Z, et al. Quantitative trait loci mapping of adult-plant resistance to leaf rust in a Fundulea 900× 'Thatcher'wheat cross. *Plant Breed*. 2017;136(1):1–7.
- [41] Skowrońska R, Mariańska M, Ulaszewski W, Tomkowiak A, Nawracała J, Kwiatek MT. Development of triticale × wheat prebreeding germplasm with loci for slow-rusting resistance. *Front Plant Sci*. 2020 May 07;11:447.
- [42] Skowrońska R, Tomkowiak A, Nawracała J, Kwiatek MT. Molecular identification of slow rusting resistance *Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale (×*Triticosecale* Wittmack) cultivars. *J Appl Genet*. 2020 May 14;61:359–66.
- [43] Liu F, Niu Y, Deng H, Tan G. Mapping of a major stripe rust resistance gene in chinese native wheat variety chike using microsatellite markers. *J Genet Genomics*. 2007 Dec;34(12):1123–30.
- [44] Kolmer JA, Lagudah ES, Lillemo M, Lin M, Bai G. The *Lr46* gene conditions partial adult- plant resistance to stripe rust, stem rust, and powdery mildew in thatcher wheat. *Crop Sci*. 2015 Nov 1;55:2557–65.
- [45] Lan C, Zhang Y, Herrera-Foessel SA, Basnet BR, Huerta-Espino J, Lagudah ES, et al. Identification and characterization of pleiotropic and co-located resistance loci to leaf rust and stripe rust in bread wheat cultivar Sujata. *Theor Appl Genet*. 2015 Jan 23;128:549–61.
- [46] Ponce-Molina LJ, Huerta-Espino J, Singh RP, Basnet BR, Lagudah E, Aguilar-Rincón VH, et al. Characterization of adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in Indian wheat cultivar 'New Pusa 876'. *Crop Sci*. 2018 Mar 1;58:630–8.
- [47] Tomkowiak A, Jędrzejewski T, Sychała J, Kuczyński J, Kwiatek MT, Tyczewska A, et al. Analysis of miRNA expression associated with the *Lr46* gene responsible for APR resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Appl Genet*. 2020 Aug 18;61:503–11.
- [48] Yashavantha Kumar KJ, Desai SA. Phenotypic and molecular analysis of *slow leaf rusting* in wheat genotypes. *J Farm Sci*. 2017;30(2):157–63.

## **ROZDZIAŁ III**

### **Podsumowanie i wnioski**

Na podstawie wyników badań w prezentowanych w rozprawie doktorskiej zaproponowano następujące wnioski:

1. Opracowane warunki multipleks PCR są skutecznym narzędziem diagnostycznym do jednoczesnej identyfikacji genów *Lr34*, *L46* i *Lr68* przy użyciu markerów *csLV34*, *Xwmc44* i *csGS* i mogą być wykorzystane w programach hodowlanych do selekcji wspomaganej markerami.
2. Na podstawie analiz molekularnych w porównaniu z oceną polową porażenia i wynikami identyfikacji markera morfologicznego LTN, można przypuszczać, że odmiana pszenżyta 'Kasyno' posiada gen *Lr46*.
3. Odmiana pszenżyta 'Kasyno' może służyć jako materiał wyjściowy do piramidyzowania genów typu *slow rusting* w genotypach pszenżyta.
4. Wykorzystanie metod MAS i GISH umożliwia wyselekcjonowanie roślin hybrydowych pszenżyto × pszenica z genami typu *slow rusting*.
5. 'Twingo' × 'Frontana 3671' wydaje się być najbardziej obiecującą kombinacją krzyżowania, biorąc pod uwagę akumulację alleli genów *Lr34* i *Lr46* warunkujących odporność na rdzę brunatną.
6. Marker *csLV46G22* można uznać za wiarygodny do identyfikacji genu *Lr46* i może być użyteczny dla MAS w programach hodowli pszenicy po opublikowaniu sekwencji starterów i protokołów.
7. Ocena nekrozy wierzchołków liści LTN (ang. *Leaf Tip Necrosis*) jest pomocna w selekcji odpornych genotypów pszenicy.
8. Niezbędna jest poprawa krzyżowalności odmian pszenżyta z wybranymi zapyłaczami pszenicy, w celu kontynuowania badań.

## **ROZDZIAŁ IV**

### **Streszczenie**

Pszenżyto ( $\times$ *Triticosecale* Wittmack) powstało poprzez skrzyżowanie pszenicy (*Triticum* spp.) z żytem (*Secale cereale* L.) w celu otrzymania zboża łączącego cechy jakościowe pszenicy z odpornością lub tolerancją na abiotyczne i biotyczne stresy żyta. Początkowo pszenżyto charakteryzowało się wysoką odpornością na choroby, jednak wraz z rosnącą powierzchnią uprawy pojawiały się nowe rasy w populacjach patogenów. Obecnie jedną z najczęściej występujących chorób pszenżyta jest rdza brunatna powodowana przez nieustannie ewoluujące patotypy *Puccinia triticina* Eriksson, charakterystyczne dla pszenicy, rzadziej żyta. Hodowla odmian odpornych jest jedną z najskuteczniejszych i najbardziej przyjaznych dla środowiska metod zwalczania chorób. W pszenicy zidentyfikowano ponad 100 genów i alleli odporności na rdzę brunatną, które oznaczane są symbolem *Lr* (ang. *Leaf rust*), ale największą grupę wśród nich stanowią geny zapewniające odporność rasowo-specyficzną, które tracą swoją skuteczność w przypadku pojawienia się nowej rasy patogena. W puli genowej pszenicy zidentyfikowano jednak do tej pory osiem genów typu „*slow rusting*”, które nadają trwałą odporność roślin dorosłych (APR, ang. *Adult Plant Resistance*), nazywaną także odpornością poziomą, rasowo-niespecyficzną lub częściową. Geny te nazwano: *Lr34* (=Yr18/Sr57/Pm38), *Lr46* (=Yr29/Sr58/Pm39), *Lr67* (=Yr46/Sr55/Pm46), *Lr68*, *Lr74*, *Lr75*, *Lr77* i *Lr78*. Geny zapewniają roślinom odporność przed wieloma rasami różnych patogenów. Pszenżyto jest stosunkowo nową rośliną uprawną, charakteryzującą się brakiem przejścia naturalnego procesu ewolucji, dlatego jedną z metod poszerzania różnorodności genetycznej pszenżyta może być introgresja chromatyny spokrewnionych gatunków, takich jak pszenica.

Prezentowana rozprawa miała na celu ocenę możliwości przeniesienia genów warunkujących odporność horyzontalną na rdzę brunatną z pszenicy zwyczajnej (*T. aestivum* L.) do pszenżyta. Celem pośrednim badań było opracowanie metod pozwalających na wybór materiałów do krzyżowań, a także ocenę uzyskanych roślin mieszańcowych pod względem przeniesienia chromosomów lub fragmentów chromatyny z pszenicy do pszenżyta.

Materiał badawczy stanowiły 73 genotypy pszenicy otrzymane z otrzymane z National Small Grains Germplasm Facility, National Small Grains Collection w Aberdeen, Idaho, USA, które według danych literaturowych oraz analizy rodowodowej mogą być źródłem różnych genów typu *slow rusting*. Do badań użyto ponadto 20 odmian pszenżyta, uzyskanych z firmy nasiennej DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. w Choryni.

W pracy opracowano metodę typu multipleks PCR do jednoczesnej identyfikacji *loci* genów *Lr34*, *Lr46*, *Lr68* w różnych wariantach przy użyciu markerów molekularnych odpowiednio *csLV34*, *Xwmc44*, *csGS*. Zastosowanie metody multipleks PCR umożliwia skrócenie czasu analiz, kosztów i nakładów pracy i stanowi wygodne narzędzie do selekcji materiałów do hodowli roślin. Opracowane warunki multipleks PCR umożliwiły także identyfikację genów w materiałach pszenicy, które według doniesień literatury i analizy rodowodów mogą posiadać geny typu *slow rusting*.

Identyfikowano także *locus Lr46* w wybranych odmianach pszenżyta przy użyciu pszenicznych markerów molekularnych *Xwmc44* oraz *csLV34G22* oraz markera morfologicznego *LTN*, a wyniki zestawiono z 3 letnią oceną polową porażenia. W wyniku analiz wykazano, że odmiana ‘Kasyno’ może posiadać gen *Lr46*, a markery pszeniczne umożliwiają identyfikację genów w genotypach pszenżyta.

Przeprowadzono ponadto kontrolowane krzyżowania dwóch odmian pszenżyta z 33 genotypami pszenicy, w celu oceny możliwości przeniesienia genów typu *slow rusting* z genotypów pszenicy do pszenżyta. Materiał wyjściowy oraz uzyskane rośliny mieszańcowe F<sub>1</sub> analizowano przy użyciu markerów molekularnych *csLV34*, *Xwmc44* oraz *csLV46G22*. Ponadto, przeprowadzono analizę GISH (genomowa hybrydyzacja *in situ*) w celu potwierdzenia mieszańcowego charakteru uzyskanych roślin. Wykorzystanie markerów molekularnych oraz GISH umożliwiło wyselekcjonowanie roślin mieszańcowych pszenżyto × pszenica z *loci* genów typu *slow rusting*. Rośliny mieszańcowe uzyskane z kombinacji ‘Twingo’ × ‘Frontana 3671’ wydają się być najbardziej obiecującymi formami, biorąc pod uwagę akumulację alleli odpornych zarówno na *Lr34*, jak i *Lr46*. Te kombinacje mogą być wykorzystane do dalszych badań.

W pracy porównano również użyteczność diagnostyczną czterech markerów molekularnych, charakteryzujących się różnym stopniem sprzężenia (dystansem genetycznym) w odniesieniu do *locus Lr46*. Wykazano, że ściśle sprzężony marker *csLV46G22* można uznać za wiarygodny do identyfikacji genu *Lr46* i może być użyteczny do selekcji wspomagananej markerami w programach hodowli pszenicy po opublikowaniu sekwencji starterów i protokołów.

Opracowane w pracy metody oraz uzyskany materiał mogą zostać wykorzystane do kontynuowania prac hodowlanych mających na celu ulepszenie odmian uprawnych pszenżyta.

# **ROZDZIAŁ V**

## **Summary**

### **Transfer of gene loci determining horizontal resistance to leaf rust from common wheat (*Triticum aestivum* L.) to triticale ( $\times$ *Triticosecale* Wittmack)**

Triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack) is a hybrid crop of wheat (*Triticum* spp.) and rye (*Secale cereale* L.) which was developed to combine the quality attributes of wheat and the resistance and tolerance of rye to biotic and abiotic stresses, respectively. Initially, triticale showed high resistance to diseases, but with the growing area of cultivation, new types of pathogen populations have appeared. Currently, leaf rust is one of the most common diseases of triticale. It is caused by the constantly evolving pathotypes of *Puccinia triticina* Eriksson, characteristic of wheat, less often rye. The breeding of resistant varieties is the most effective and environmentally friendly method of disease control. More than 100 leaf rust genes have been identified in wheat (*Lr* – leaf rust), but most of them are race-specific, hence they are prone to lose their effectiveness when a new races of pathogen appear. However, eight “slow rusting” genes have been identified in the wheat gene pool that confer sustained resistance for adult plants (APR), which is also known as horizontal, racial-non-specific or partial resistance. These genes were classified as: *Lr34* (=Yr18/Sr57/Pm38), *Lr46* (=Yr29/Sr58/Pm39), *Lr67* (=Yr46/Sr55/Pm46), *Lr68*, *Lr74*, *Lr75*, *Lr77* and *Lr78*. These genes secure resistance against many races of various pathogenes. Triticale is a relatively new crop in comparison to other crops and lacks natural evolution. Therefore, an introgression of chromatin from related species such as wheat is assumed as an effective method of expanding the genetic diversity of triticale.

The aim of this study was to assess the possibility of transferring the horizontal resistance genes to leaf rust from common wheat (*T. aestivum* L.) to triticale. The intermediate goal of research was to develop methods allowing selection of materials for crossing and the evaluation of the obtained hybrid plants in terms of the transfer of chromosomes or chromatin fragments from wheat to triticale.

The plant material consisted of 73 wheat genotypes (*T. aestivum* L.), which were provided from the National Small Grains Germplasm Facility, National Small Grains Collection in Aberdeen, Idaho, USA. According to literature data and pedigree analysis, these genotypes were the source of various slow rusting genes. Moreover, 20 cultivars of triticale derived from DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. breeding company in Choryń was also used in the research.

As a result of research, a multiplex PCR method for the simultaneous identification of *Lr34*, *Lr46*, *Lr68* gene loci in different variants was developed using the molecular markers *csLV34*, *Xwmc44*, and *csGS*, respectively. The use of the multiplex PCR method enables to reduce the time and costs of analyses and it can be considered as a convenient tool for plant breeding selection. The multiplex PCR conditions developed were crucial for identification of genes in wheat materials, which were donors of slow rusting genes.

The *Lr46* gene locus was also identified in selected triticale cultivars using the wheat molecular markers (*Xwmc44* and *csLV34G22*) and the leaf tip necrosis (LTN) appearance. The results were compared with a 3-year field assessment of leaf rust infection. It was shown that cv. 'Kasyno' may have the *Lr46* gene, and wheat markers are enabled for the identification of genes in the genotypes of triticale.

In addition, a set of cross-hybridizations of two triticale cultivars with 33 wheat genotypes were performed to evaluate the possibility of 'slow rusting' genes transfer from wheat into hexaploid triticale. The genotypes of wheat and the F<sub>1</sub> hybrid plants were analyzed using the molecular markers *csLV34*, *Xwmc44* and *csLV46G22*. In addition, GISH (Genomic *In Situ* Hybridization) analysis was performed to confirm the chromosome set of the hybrid plants. The use of molecular markers and GISH were crucial techniques for selection of triticale × wheat hybrid plants with the "slow rusting" gene loci. 'Twingo' × 'Frontana 3671' hybrids seems to be the most promising pre-breeding forms, considering the accumulation of both *Lr34* and *Lr46* resistant alleles.

Moreover, in this study the diagnostic accuracy of four molecular markers located at different distances from the *Lr46* gene locus was evaluated. It has been shown that *csLV46G22* can be considered as a reliable marker for the identification of the *Lr46* gene and may be useful for marker assisted selection (MAS) in wheat breeding programs after publication of the primer sequences and protocols.

The methods developed in the study as well as original plant material can be implemented into breeding programs aiming in triticale improvement.

**ROZDZIAŁ VI**  
**Oświadczenia autorów**

Mgr inż. Roksana Bobrowska (Skowrońska)

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Skowrońska R., Kwiatek M., Tomkowiak A., Nawracała J. (2019) Development of multiplex PCR to detect *slow rust* resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *Journal of Applied Genetics*, 60(3): 301-304. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z>

Byłam zaangażowana w: przeprowadzenie ekperymentów i analiz, przygotowanie pierwotnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu. Procentowy udział: 60%.

- Skowrońska R., Tomkowiak A., Szware J., Nawracała J., Kwiatek M. (2020) Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *slow rust* resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Protection Research*, 388-398. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.134914>

Byłam zaangażowana w: przeprowadzenie ekperymentów i analiz, przygotowanie pierwotnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu. Procentowy udział: 60%.

- Skowrońska R., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) Molecular identification of *slow rusting* resistance *Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack) cultivars. *Journal of Applied Genetics*, 61(3): 359-366. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00562-8>

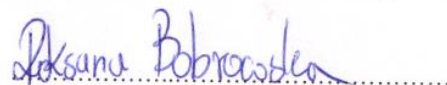
Byłam zaangażowana w: przeprowadzenie ekperymentów i analiz, przygotowanie pierwotnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu. Procentowy udział: 60%.

- Skowrońska R., Mariańska M., Ulaszewski W., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) Development of triticale  $\times$  wheat prebreeding germplasm with *loci* for *slow-rusting* resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11: 447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00447>

Byłam zaangażowana w: przeprowadzenie analiz molekularnych, przygotowanie preparatów cytogenetycznych, przeprowadzenie analizy GISH, ocenę wyników analiz i przygotowanie manuskryptu. Procentowy udział: 50%.

- Bobrowska R., Noweiska A., Spychała J., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2022). Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* “*slow rusting*” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biomolecular Concepts*, 13(1): 1-9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>.

Byłam zaangażowana w: przeprowadzenie ekperymentów i analiz, przygotowanie pierwotnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu. Procentowy udział: 60%.



Podpis

dr hab. Michał Kwiatek, Prof. UPP  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Skowrońska R., Kwiatek M., Tomkowiak A., Nawracała J. (2019) Development of multiplex PCR to detect *slow rust* resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *Journal of Applied Genetics*, 60(3): 301-304. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z>

Byłem zaangażowany w: zainicjowanie projektu, poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 20%.

- Skowrońska R., Tomkowiak A., Szwarz J., Nawracała J., Kwiatek M. (2020) Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *slow rust* resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Protection Research*, 388-398. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.134914>

Byłem zaangażowany w: zainicjowanie projektu, poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 20%.

- Skowrońska R., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) Molecular identification of *slow rusting* resistance *Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale (*× Triticosecale* Wittmack) cultivars. *Journal of Applied Genetics*, 61(3): 359-366. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00562-8>

Byłem zaangażowany w: zainicjowanie projektu, poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 20%.

- Skowrońska R., Mariańska M., Ulaszewski W., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) Development of triticale  $\times$  wheat prebreeding germplasm with *loci* for *slow-rusting* resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11: 447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00447>

Byłem zaangażowany: w zainicjowanie projektu, zaprojektowanie badań, wyprowadzenie roślin mieszańcowych oraz przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu. Procentowy udział: 25%.

- Bobrowska R., Noweiska A., Spychała J., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2022). Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* “*slow rusting*” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biomolecular Concepts*, 13(1): 1-9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>

Byłem zaangażowany w: zainicjowanie projektu i zaprojektowanie badań, poprawienie pierwotnej i przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu. Procentowy udział: 15%.

  
.....  
Podpis

dr hab. Jerzy Nawracała, Prof. UPP  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

— Skowrońska R., Kwiatek M., Tomkowiak A., Nawracała J. (2019) Development of multiplex PCR to detect *slow rust* resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *Journal of Applied Genetics*, 60(3): 301-304. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z>

Byłem zaangażowany w: poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 10%.

— Skowrońska R., Tomkowiak A., Szwarz J., Nawracała J., Kwiatek M. (2020) Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *slow rust* resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Protection Research*, 388-398. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.134914>

Byłem zaangażowany w: poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 5%.

— Skowrońska R., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) Molecular identification of *slow rusting* resistance *Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack) cultivars. *Journal of Applied Genetics*, 61(3): 359-366. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00562-8>

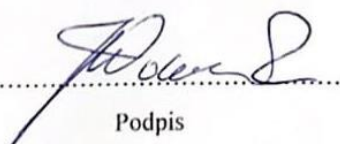
Byłem zaangażowany w: poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 10%.

— Skowrońska R., Mariańska M., Ulaszewski W., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) Development of triticale  $\times$  wheat prebreeding germplasm with *loci* for *slow-rusting* resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11: 447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00447>

Byłem zaangażowany w: nadzór przygotowania manuskryptu. Procentowy udział: 5%.

— Bobrowska R., Noweiska A., Spychała J., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2022). Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* “*slow rusting*” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biomolecular Concepts*, 13(1): 1-9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>

Byłem zaangażowany w: poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 5%.

  
.....  
Podpis

Dr hab. Agnieszka Tomkowiak  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Skowrońska R., Kwiatek M., Tomkowiak A., Nawracała J. (2019) Development of multiplex PCR to detect *slow rust* resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *Journal of Applied Genetics*, 60(3): 301-304. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z>

Byłam zaangażowana w: poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 10%.

- Skowrońska R., Tomkowiak A., Szwarz J., Nawracała J., Kwiatek M. (2020) Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *slow rust* resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Protection Research*, 388-398. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.134914>

Byłam zaangażowana w: poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 10%.

- Skowrońska R., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) Molecular identification of *slow rusting* resistance *Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack) cultivars. *Journal of Applied Genetics*, 61(3): 359-366. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00562-8>

Byłam zaangażowana w: poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 10%.

- Skowrońska R., Mariańska M., Ulaszewski W., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020) Development of triticale  $\times$  wheat prebreeding germplasm with *loci* for *slow-rusting* resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11: 447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00447>

Byłam zaangażowana w: nadzór nad metodyką analiz molekularnych. Procentowy udział: 5%.

- Bobrowska R., Noweiska A., Spychała J., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2022). Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* “*slow rusting*” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biomolecular Concepts*, 13(1): 1-9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>

Byłam zaangażowana w: poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 5%.



Podpis

Poznań, 20.05.2022

Mgr Jusytyna Szwarz  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Skowrońska R., Tomkowiak A., Szwarz J., Nawracała J., Kwiatek M. (2020) Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *slow rust* resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Plant Protection Research, 388-398.  
<https://doi.org/10.24425/jppr.2020.134914>

Uczestniczyłam w prowadzeniu badań. Procentowy udział: 5%.

.....  
Podpis

Poznań, 20.05.2022

Dr Waldemar Ulaszewski  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Skowrońska R., Mariańska M., Ulaszewski W., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020)  
Development of triticale × wheat prebreeding germplasm with *loci* for *slow-rusting* resistance.  
Frontiers  
in Plant Science, 11: 447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00447>

Byłem zaangażowany w analizę obrazów mikroskopowych. Procentowy udział: 5%.

Waldemar Ulaszewski.....

Podpis

Poznań, 20.05.2022

Mgr Monika Mariańska  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Skowrońska R., Mariańska M., Ułaszewski W., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2020)  
Development of triticale × wheat prebreeding germplasm with *loci* for *slow-rusting* resistance.  
Frontiers in Plant Science, 11: 447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00447>

Byłam zaangażowana w: wyprowadzenie roślin mieszańcowych, analizy molekularne oraz przygotowanie preparatów cytogenetycznych. Procentowy udział: 10%.



Podpis

Poznań, 20.05.2022

Mgr Julia Spychała  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Bobrowska R., Noweiska A., Spychała J., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2022). Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* “slow rusting” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biomolecular Concepts*, 13(1): 1-9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>

Byłam zaangażowana w: poprawienie pierwotnej wersji i przedstawienie sugestii dotyczących ulepszenia manuskryptu. Procentowy udział: 5%.

.....  


Podpis

Poznań, 20.05.2022

Mgr Aleksandra Noweiska  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Bobrowska R., Noweiska A., Spychała J., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M. T. (2022). Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* “slow rusting” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biomolecular Concepts*, 13(1): 1-9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>

Uczestniczyłam w prowadzeniu badań. Procentowy udział: 10%.

Noweiska Aleksandra

Podpis