

PAWEŁ CZ. CZEMBOR**ALEKSANDRA PIETRUSIŃSKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Zastosowanie selekcji wspomaganej markerami molekularnymi do wprowadzenia genu *Lr50* odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) do pszenicy

The use of marker-assisted selection for introduction of leaf rust resistance gene *Lr50* (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) to wheat

Do odmiany pszenicy Flair wprowadzano gen odporności *Lr50* na rdzę brunatną przy wykorzystaniu selekcji wspomaganej markerami molekularnymi. Wspomniany gen odporności wprowadzano na drodze dwukrotnego krzyżowania wstecznego. Dwa markery mikrosatelitarne gwm382 i gdm87 flankujące gen *Lr50* pozwoliły na wybór obiektów zawierających ten gen w kolejnych populacjach potomnych. Dodatkowo wśród obiektów pokolenia F₁BC₁ przeprowadzono analizę zawartości genomu rodzica wypierającego. W tym celu wykorzystano zestaw 21 markerów mikrosatelitarnych (po jednym dla każdego chromosomu) zlokalizowanych w pobliżu centromeru danego chromosomu. Niestety, z powodu braku polimorfizmu DNA lub nie występowania produktów reakcji PCR, uzyskana na ten temat informacja była bardzo ograniczona. Niemniej jednak, selekcja wspomagana markerami molekularnymi pozwoliła na wybór linii zawierających gen *Lr50*, które włączono do programu wytwarzania materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian pszenicy odpornych na rdzę brunatną.

Słowa kluczowe: odporność, pszenica, rdza brunatna, selekcja wspomagana markerami

The leaf rust resistance gene *Lr50* was introduced to the wheat variety Flair using marker-assisted selection strategy. Two backcrosses to the recurrent parent were performed. Two microsatellites gwm382 and gdm87 flanking gene *Lr50* were used to select individuals with the resistance gene in offspring populations. In addition, recipient genome content was evaluated on F₁BC₁ population using a set of 21 microsatellite markers. Therefore, in the centromer region of each chromosome one marker was located. Unfortunately, due to the lack of DNA polymorphism or absence of expected PCR products, the information obtained was limited. Nevertheless, the marker-assisted selection strategy allowed to select lines carrying gene *Lr50*. The lines were transferred to the wheat breeding program focused on the resistance to leaf rust.

Key words: leaf rust, marker-assisted selection, resistance, wheat

WSTĘP

Rdza brunatna pszenicy powodowana przez grzyba *P. recondita* f. sp. *tritici* jest jedną z najważniejszych chorób liści pszenicy o dużym znaczeniu ekonomicznym na świecie. Rokrocznie notuje się straty w plonach sięgające 10%, a w latach szczególnie sprzyjających rozwojowi choroby obniżka plonu wynosiła nawet 30% (Roelfs i in., 1992). W głównej mierze decydują o tym właściwości patogena: specjalizacja pasożytnictwa, wysoka wirulencja, zmienność genetyczna w populacji jak również mała liczba odmian odpornych. W Polsce rdza brunatna obserwowana jest na pszenicy corocznie w różnym nasileniu w zależności od warunków pogodowych.

W literaturze opisano ponad 50 genów warunkujących odporność pszenicy na porażenie przez *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* (Helguera i in., 2000; Huang i Gill, 2001; Knott, 1989; McIntosh i in., 1995; Raupp i in., 2001; Saini i in., 2002). W przeprowadzonych badaniach nad obecnością genów odporności na rdzę brunatną w odmianach europejskich (w tym również polskich) stwierdzono występowanie następujących genów: *Lr1*, *Lr3a*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr17b*, *Lr20*, *Lr26* i *Lr37* (Winzeler i in., 2000; Singh i in., 2001). Niestety, stwierdzono jedynie częściową ich efektywność lub w niektórych przypadkach jej całkowity brak w stosunku do występującego spektrum wirulencji patogena. Do ostatnio opisanych nowych efektywnych genów odporności na rdzę brunatną w pszenicy należy gen *Lr50*, który został przeniesiony z *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum* (Jakubcz.) van Slageran do pszenicy heksaploidalnej *T. aestivum* (Brown-Guedira i in., 1997) i został zlokalizowany na chromosomie 2B (Brown-Guedira i in., 2003). Mimo odnotowania izolatów rdzy brunatnej w Ameryce Północnej wirulentnych odnośnie genu *Lr50*, wydaje się że w warunkach europejskich ten gen przyczyni się wydatnie do zwiększenia zdrowotności upraw pszenicy.

Postępy w biologii molekularnej ostatniego dziesięciolecia zaowocowały również lepszym poznaniem genomu pszenicy i jej gatunków pokrewnych. Zastosowanie markerów molekularnych pozwoliło na stworzenie dokładnych map genetycznych dla poszczególnych chromosomów, w których również uwzględniono takie cechy jak odporność na rdzę brunatną (McIntosh i in., 1998; Langridge i in., 2001). Powstała możliwość manipulacji genetycznej w oparciu o markery molekularne określonymi regionami genomu odpowiedzialnymi za ekspresję pożądanej cechy (odporności). W ten sposób zdefiniowana metoda została określona mianem selekcji wspomagananej markerami (ang. marker-assisted selection, MAS) (Ribaut i Hoisington, 1998). Najczęściej wykorzystuje się pojedyncze markery molekularne do określenia obecności lub braku specyficznego allela, który w przeciwnym razie musiałby być zidentyfikowany fenotypowo. Tego typu procedura została nazwana częściową selekcją wspomaganą markerami (ang. partial MAS) w odróżnieniu od pełnej MAS (ang. full MAS), która zakłada zastosowanie dodatkowo większej liczby markerów do charakterystyki całego genomu roślinnego. Ponieważ pełny MAS pozwala na selekcję opartą o wiedzę bezpośrednią o genomie indywidualnych roślin, można znacząco podnieść skalę korzyści hodowlanych. Ribaut i Hoisington (1998) szacują, że całkowita

konwersja linii pod względem pojedynczej cechy monogenicznej można osiągnąć po trzech krzyżowaniach wypierających używając metody MAS, podczas gdy konwencjonalne metody hodowli wymagają przynajmniej sześciu krzyżowań wypierających dla osiągnięcia tego samego celu. W niniejszej pracy przedstawiono próbę zastosowania markerów molekularnych przy wprowadzeniu genu *Lr50* odporności na rdzę brunatną do odmiany pszenicy ozimej Flair, dobrze adaptowanej do polskich warunków klimatyczno-glebowych.

MATERIAŁ I METODY

W celu wprowadzenia genu *Lr50* do pożądanej odmiany skrzyżowano linię KS96WGRC36 (dawca genu odporności *Lr50*) z odmianą pszenicy jarej Flair. Rośliny pokolenia F_1 krzyżowano wstecznie z odmianą Flair i otrzymane pokolenie F_1BC_1 w liczbie 56 osobników poddano analizie molekularnej na obecność genu *Lr50* jak i zawartości genomu rodzica wypierającego w potomstwie. Do ponownego krzyżowania z populacji F_1BC_1 wybrano 5 osobników charakteryzujących się największą liczbą badanych *loci* w stanie homozygotycznym rodzica wypierającego i zawierających gen *Lr50*. W wyniku drugiego krzyżowania wypierającego uzyskano populację F_1BC_2 w liczbie 70 osobników, którą badano tylko na obecność genu *Lr50*.

W celu izolacji DNA dla każdego obiektu pobrano ok. 200 mg młodej tkanki roślinnej, którą homogenizowano w próbówce 2 ml uzupełnionej buforem lizującym AP1 zestawu DNeasy Plant Mini zgodnie z zaleceniami producenta (Qiagen Inc., 27220 Turnberry Lane, Valencia, CA 91355, USA). Do homogenizacji próbek roślinnych wykorzystano młynek miksujący MM301 (Retsch, Verder, Katowice, Polska) przy ustawieniu częstotliwości wytrząsania 30/sek. w dwóch cyklach pięciominutowych (jednocześnie można było homogenizować 48 próbek). Po etapie homogenizacji izolacja DNA przebiegała zgodnie z procedurą załączoną do zestawu DNeasy Plant Mini (Qiagen). Stężenie DNA otrzymanych preparatów oznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu aparatu Genesys 10 (ThermoSpectronic, Rochester, NY 14625, USA).

W celu określenia występowania genu *Lr50*, wykorzystano dwa flankujące *loci* mikrosatelitarne (SSR, ang. Simple Sequence Repeats) *Xgwm382* (allel 139 pz — par zasad) i *Xgdm87* (allel 110 pz) (Röder i in., 1998; Pestsova i in., 2000) oddalone odpowiednio o 6,7 cM i 9,4 cM od *locus* odporności (Brown-Guedira i in., 2003). Natomiast, aby wstępnie określić zawartość genomu rodzica wypierającego w potomstwie, testowano *loci* mikrosatelitarne zlokalizowane w pobliżu centromerów 21 chromosomów pszenicy (tab. 1) (Röder i in., 1998; Pestsova i in., 2000). Niektóre zestawy starterów reakcji PCR dla wybranych *loci* mikrosatelitarnych amplifikowały w reakcji PCR dodatkowe 11 *loci* (tab. 1), które również włączono do ogólnej oceny. Łącznie analizowano 32 *loci* mikrosatelitarne. Wszystkie startery reakcji PCR zostały dostarczone przez Sigma-Genosys Ltd. (London Road, Pampisford, Cambridge, CB2 4EF, W. Brytania). W każdej parze starterów amplifikujących *loci* mikrosatelitarne, jeden ze starterów został wyznakowany na końcu 5' barwnikiem fluorescencyjnym

(jednym z trzech: 6-FAM, HEX lub TET). Wspomniane mikrosatelity amplifikowano w reakcji PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) przy zastosowaniu niskoprofilowanych cienkościennych probówek (MJ Research, Inc., 149 Grove Street, Watertown, MA 02172, USA). W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 8 μ l wchodziły następujące komponenty: 1 $\times$ buforu (MBI Fermentas, V. Graiciuno g. 8, 02241 Vilnius, Litwa), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM każdego z deoksynukleotydów, 0,5 μ M startera i 1 jednostka *Taq* polimerazy (Fermentas). W termocyklerze UNO II (Biometra GmbH, P.O.B. 1544, 37005 Göttingen, Niemcy) z pokrywą grzewczą ustawioną na 105°C mieszaninę reakcyjną poddawano cyklicznym zmianom temperatury w czasie według programu: 94°C/2 min. wstępnej denaturacji, następnie 10 cykli składających się z etapów 94°C/30 sek., 60°C/30 sek. i 72°C/1 min. oraz 30 cykli 90°C/30 sek., 60°C/30 sek. i 72°C/1 min. Końcowy etap polimeryzacji przy temperaturze 72°C przedłużono do 5 min.

Produkty reakcji PCR w zależności od potrzeb rozdzielano i analizowano w dwóch systemach. W pierwszym z nich wykorzystano analizator DNA ABI 377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA 94404, USA) i 4,5% denaturujący żel polyakrylamidowy (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). W drugim układzie, rozdział produktów amplifikacji przeprowadzono na 2,75% żelu agarozowym MetaPhor (FMC Bioproducts, 191 Thomaston Street, Rockland, ME 04841, USA) przy napięciu 240 V w buforze 0,5 $\times$ TBE. Po wybarwieniu żelu bromkiem etydy dokumentowano obraz rozdziału produktów PCR wykorzystując system Gel Logic 200 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY 14650, USA).

WYNIKI

Wśród 56 osobników populacji F_1BC_1 wykryto 16 osobników, które miały obydwa specyficzne allele *loci* mikrosatelitarnych (odpowiednio 139 pz i 110 pz dla *Xgwm382* i *Xgdm87*) flankujących gen odporności *Lr50*. Z łącznej liczby 32 *loci* mikrosatelitarnych wybranych do analizy zawartości genomu rodzica wypierającego w potomstwie, jedynie 15 wykazywało polimorfizm DNA w tym dla 12 SSR zlokalizowanych w pobliżu centromerów chromosomów pszenicy. Pozostałe *loci* SSR nie wykazywały polimorfizmu DNA między rodzicem wypierającym (odmiana Flair) i dawcą (linia KS96WGRC36) lub nie uzyskano produktów reakcji PCR. Obiekty 104, 108, 109, 119 i 120 wykazywały największą liczbę (7) badanych *loci* homozygotycznych, co zadecydowało o wyborze ich do drugiego krzyżowania wstecznego (tab. 1). Z pośród 70 obiektów pokolenia F_1BC_2 stwierdzono występowanie obydwu specyficznych markerów sprzężonych z genem *Lr50* dla 35 obiektów. Wybrane genotypy z określonym genem *Lr50* włączono do programu wytwarzania materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian odpornych na rdzę brunatną.

Tabela 1

Występowanie mikrosatelitarnych *loci* homozygotycznych i heterozygotycznych dla wybranych obiektów z populacji F₁BC₁

Homozygous and heterozygous microsatellite *loci* identified in the selected F₁BC₁ individuals

Locus w pobliżu centromeru Locus adjacent to centromer	Dodatkowe locus poza centromerem Additional locus beyond centromer	Osobniki populacji F ₁ BC ₁ F ₁ BC ₁ individuals															
		87	89	93	95	98	100	104	108	109	111	116	119	120	123	140	144
<i>Xgwm131-3B</i>																	
	<i>Xgwm131-1B</i>																
<i>Xgwm357-1A</i>																	
<i>Xgwm494-6A</i>																	
<i>Xgwm55-6D</i>																	
	<i>Xgwm55-2B</i>																
	<i>Xgwm55-2B</i>																
<i>Xgwm337-1D</i>																	
<i>Xgwm473-2A</i>																	
<i>Xgwm43-7B</i>																	
<i>Xgwm304-5A</i>																	
<i>Xgwm497-3D</i>																	
	<i>Xgwm497-2A</i>																
	<i>Xgwm497-1A</i>																
<i>Xgwm111-7D</i>																	
	<i>Xgwm111¹</i>																
<i>Xgwm319-2B</i>																	
<i>Xgwm515-2D</i>																	
	<i>Xgwm515-2D</i>																
<i>Xgwm159-5B</i>																	
<i>Xgwm260-7A</i>																	
<i>Xgwm601-4A</i>																	
<i>Xgwm413-1B</i>																	
<i>Xgwm16-5D</i>																	
	<i>Xgwm16-2B</i>																
	<i>Xgwm16-7B</i>																
<i>Xgwm608-4D</i>																	
	<i>Xgwm608-2D</i>																
<i>Xgwm518-6B</i>																	
<i>Xgwm368-4B</i>																	
<i>Xgwm30-3A</i>																	
	<i>Xgwm30-2D</i>																
Liczba loci homozygotycznych rodzica wypierającego Number of homozygous <i>loci</i> for the recipient parent		4	3	6	6	2	4	7	7	7	4	6	7	7	3	6	3

¹ — Nieznana lokalizacja w genomie pszenicy; Unknown localization in the wheat genome

— Brak produktów PCR; Absence of PCR products

— Homozygotyczne *locus* rodzica wypierającego; Homozygous *locus* of the recipient parent

— Heterozygotyczne *locus*; Heterozygous *locus*

DYSKUSJA

Wprowadzanie do odmian pszenicy genów odporności na rdzę brunatną na drodze kilkakrotnych krzyżowań wstecznych jest metodą szeroko stosowaną w programach hodowlanych. Wzbogacenie tej metody o selekcję pożądaných genotypów przy użyciu markerów molekularnych zwiększyło znacznie jej atrakcyjność przez polepszenie efektywności i przyspieszenie procesu selekcji oraz możliwość kumulacji w jednym genotypie kilku genów odporności (piramidowanie) w tym również genów o charakterze ilościowym (Koebner i Summers, 2003). Przejście od teorii do praktycznego wykorzystania ostatnich dokonań genomiki pszenicy i nowej strategii hodowlanej znalazło swoje odzwierciedlenie w licznych inicjatywach badawczych np. Australian National Wheat Molecular Marker Program (Australia) (Eagles i in., 2001) i MASWheat konsorcjum (USA) (Dubcovsky, 2004). We wspomnianych programach hodowlanych wspomaganych markerami molekularnymi wprowadza się do odmian pszenicy również kilka genów odporności w tym *Lr50* na rdzę brunatną. Wspomniany przykład skłonił autorów do podjęcia próby wprowadzenia *Lr50* do odmiany Flair i wypracowania własnych metod postępowania w trakcie selekcji opartej o MAS. Odmiana Flair charakteryzuje się dobrą odpornością polową na rdzę brunatną z oceną 7,7 w skali 9-stopniowej (1 — podatny, 9 — odporny; COBORU, 2004) świadczącą o występowaniu bliżej nieokreślonych genów odporności na rdzę. W klasycznym podejściu, gdy genotyp już posiada gen(y) odporności, wprowadzanie kolejnego genu odporności na tego samego patogena wiąże się z przeprowadzeniem testu fitopatologicznego z odpowiednią rasą fizjologiczną grzyba nie zawsze będącą w dyspozycji hodowcy. Dlatego też, wprowadzanie nowego genu odporności (*Lr50*) do odmiany Flair w oparciu o markery molekularne znajduje swoje uzasadnienie.

Markery SSR gwm382 i gdm87 sprzężone z genem *Lr50* potwierdziły w pełni swoją uniwersalność w trakcie selekcji kolejnych pokoleń pochodzących ze skrzyżowania odmiany Flair i linii KS96WGRC36, tj. obserwowany polimorfizm DNA (rozmiary fragmentów amplifikowanych w reakcji PCR) potwierdza wyniki uzyskane przez Brown-Guedira i wsp. (2003). W pracy podjęto również próbę oszacowania zawartości genomu biorcy (ang. Recipient Genome Content, RGC) dla osobników pokolenia F_1BC_1 . Ograniczono się tylko do F_1BC_1 , ponieważ przeprowadzenie selekcji w tym pokoleniu może przynieść największe korzyści hodowlane. Przy zastosowaniu dwóch markerów ulokowanych w optymalnych pozycjach (około 20 cM od telomeru przy rozmiarach chromosomu 100 cM) na obu ramionach dla każdego z chromosomów, można uzyskać zawartość genomu biorcy (wypierającego) rzędu 93,4% w porównaniu do 75% przy braku selekcji w klasycznym podejściu (Servin, Hospital, 2002). Niestety, z przyczyn technicznych i finansowych ograniczono się tylko do selekcji markerów zlokalizowanych w pobliżu centromeru każdego z chromosomów, co ograniczyło zakres uzyskanej informacji. Co więcej, brak polimorfizmu DNA lub nie występowanie produktów PCR przyczyniło się do dalszego zubożenia informacji o RGC. Określenie największej liczby *loci* homozygotycznych rodzica wypierającego dla 15 z spośród 32 badanych *loci* mikrosatelitarnych z pewnością nie jest w pełni wartościowym wynikiem. W związku z tym

w przyszłości konieczna jest wcześniejsza wstępna selekcja przydatnych markerów i zwiększenie liczby badanych *loci* do przynajmniej dwóch na chromosom (przy optymalnej lokalizacji), aby uzyskać pełną informację o zawartości genomu rodzica wypierającego w potomstwie. Wiąże się to jednak z dodatkowymi kosztami analizy kolejnych markerów molekularnych. Aby selekcja oparta o markery molekularne była bardziej atrakcyjna (finansowo) należy w opisywanej procedurze poszukać oszczędności głównie odnośnie metody izolacji DNA, która stanowi zasadniczą część całkowitych kosztów analizy.

WNIOSKI

1. Zastosowane markery mikrosatelitarne gwm382 i gdm87 wykazały pełną przydatność w selekcji osobników zawierających gen *Lr50*.
2. Procedura określenia zawartości genomu rodzica wypierającego w potomstwie powinna być zmodyfikowana, aby uzyskać pełniejszą informację.

LITERATURA

- Brown-Guedira G. L., Gill B. S., Cox T. S., Leath S. 1997. Transfer of disease resistance genes from *Triticum araraticum* to common wheat. *Plant Breeding* 116: 105 — 112.
- Brown-Guedira G. L., Singh S., Fritz A. K. 2003. Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum*. *Phytopathology* 93: 784 — 789.
- COBORU. 2004. Lista opisowa odmian, COBORU, Słupia Wielka. Część I. Rośliny rolnicze zbożowe i przemysłowe: 34 s.
- Dubcovsky J. 2004. Marker-assisted selection in public breeding programs: the wheat experience. *Crop Science* 44: 1895 — 1898.
- Eagles H. A., Bariana H. S., Ogonnaya F. C., Rebetzke G. J., Hollamby G. J., Henry R. J., Henschke P. H., Carter M. 2001. Implementation of markers in Australian wheat breeding. *Aust. J. Agric. Res.* 52: 1349 — 1356.
- Helguera M., Khan I. A., Dubcovsky J. 2000. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr46*. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1137 — 1143.
- Huang L., Gill B. S. 2001. An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. *Theor. Appl. Genet.* 103: 1007 — 1013.
- Knott D. R. 1989. The wheat rusts: breeding for resistance. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics* 12. Springer, Berlin.
- Koebner R. M. D., Summers R. W. 2003. 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? *Trends in Biotechnology* 21 (2): 59 — 63.
- Langridge P., Lagudah E. S., Holton T. A., Appels R., Sharp P. J., Chalmers K. J. 2001. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 52: 1043 — 1077.
- McIntosh R. A., Hart G. E., Devos K. M., Gale M. D., Rogers W. J. 1998. Catalogue of gene symbols for wheat. In: Slinkard A. E. (ed.). *Proc. 9th Int. Wheat Genet Symp.* 5: 13–72. Univ. Extension Press. Univ. of Saskatchewan. Saskatoon.
- McIntosh R. A., Wellings C. R., Park R. F. 1995. Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Australia/ Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Pestova E., Ganai M. W., Röder M. S. 2000. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43: 689 — 697.
- Raupp W. J., Sukhwinder-Singh, Brown-Guedira G. L., Gill B. S. 2001. Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 102: 347 — 352.

- Ribaut J. M., Hoisington D. 1998. Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends in Plant Science* 3 (6): 236 — 239.
- Röder 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.
- Roelfs A. P., Singh R. P., Saari E. E. 1992. Rust Disease of Wheat. Concepts and methods of disease management. Mexico, D.F. CIMMYT: 81 p.
- Servin B., Hospital F. 2002. Optimal positioning of markers to control genetic background in marker assisted backcrossing. *The Journal of Heredity* 93 (3): 214 — 217.
- Winzeler M., Mesterházy A., Park R. F., Bartoš P., Csösz M., Goyeau H., Ittu M., Jones E., Löschnerberger F., Manninger K., Pasquini M., Richter K., Rubiales D., Schachermayr G., Strzembicka A., Trottet M., Unger O., Vida G., Walther U. 2000. Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. *Agronomie* 20: 783 — 792.