

ALEKSANDRA PIETRUSIŃSKA

Pracownia Genetyki Stosowanej

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

## Wykorzystanie markerów molekularnych do wprowadzania genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) i mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) do pszenicy ozimej\*

### The use of molecular markers for introduction of leaf rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) and powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) resistance genes in winter wheat (*Triticum aestivum*)

Wykorzystując selekcję wspomaganą markerami molekularnymi do odmiany pszenicy Lexus wprowadzono geny odporności *Lr41* na rdzę brunatną oraz *Pm21* na mączniaka prawdziwego. Jako źródło odporności na rdzę brunatną w badaniach wykorzystano heksaploidalną linię WGRC10, warunkowaną dominującym genem *Lr41* pochodzącym z diploidalnej dzikiej pszenicy *Triticum tauschii* (syn. *Aegilops squarrosa*). Jako źródło odporności na mączniaka prawdziwego w badaniach zastosowano linię translokacyjną 6VS/6AL Yangmai 5 z dominującym genem *Pm21* pochodzącym od *Dasyphyrum villosum* (syn. *Haynaldia villosa*). Do identyfikacji genu *Lr41* wykorzystano pięć markerów mikrosatelitarnych SSR: *Gdm35*, *Barc124*, *Gwm261*, *Gwm296* oraz *Gwm210*. Natomiast w celu wyselekcjonowania obiektów roślinnych posiadających gen *Pm21* posłużono się dwoma markerami SCAR (*SCAR<sub>1250</sub>*, *SCAR<sub>1400</sub>*) oraz markerem *NAU/xibao*. Ponadto, dla pierwszego pokolenia populacji mieszańcowej, za pomocą markerów AFLP, losowo rozproszonych w genomie pszenicy, oszacowano procentową zawartość genomu rodzica wypierającego (selekcja tła genetycznego). Dodatkowo w drugim oraz w trzecim pokoleniu populacji mieszańcowej do oceny reakcji na zakażenie przez *P. recondita* f. sp. *tritici* i *B. graminis* f. sp. *tritici* użyto jednozarodnikowych izolatów, wirulentnych do odmiany Lexus, natomiast awirulentnych do linii odpowiednio z genem *Lr41* i *Pm21*. Przeprowadzona selekcja wspomaganą markerami oraz selekcja fenotypowa pozwoliły na uzyskanie linii homozygotycznych pod względem odporności na oba patogeny.

**Słowa kluczowe:** *Blumeria graminis*, *Lr41*, piramidowanie genów, *Pm21*, *Puccinia recondita*

The aim of the presented research was to use genetic markers in process of introduction of effective resistance genes to the wheat. A leaf rust resistance gene *Lr41* derived from *Triticum tauschii* (syn.

\* Praca doktorska została częściowo sfinansowana ze środków 6 Programu ramowego UE BioExploit oraz grantu promotorskiego Nr NN310 147035

*Aegilops squarrosa*) and powdery mildew resistance gene *Pm21* derived from *Dasyphyrum villosum* (syn. *Haynaldia villosa*) were introgressed into the best German variety. Line WGRC10 was used as the resistance source of *Lr41* for leaf rust, whereas the 6VS/6AL translocation line Yangmai 5 was used as the resistance source of *Pm21* for powdery mildew. In foreground selection several molecular markers for *Lr41* and *Pm21* were applied. For the detection of gene *Lr41* in breeding materials with leaf rust resistance five SSR markers: *Gdm35*, *Barc124*, *Gwm261*, *Gwm296* and *Gwm210* were used. To detect the *Pm21* gene three molecular markers: *SCAR1250*, *SCAR1400* and *NAU/xibao* were development. After the first backcrosses background selection was conducted using the AFLP markers. For the greenhouse screening of the second and the third generations of plants for leaf rust and powdery mildew resistance, plants of selected lines were inoculated at the three-leaf stage with natural pathogen populations of *B. graminis* and *P. recondita*. The marker-assisted selection and pathology test allowed to obtain homozygous lines carrying the genes resistance to leaf rust and powdery mildew of winter wheat.

**Key words:** *Blumeria graminis*, *Lr41*, *Pm21*, *Puccinia recondita*, pyramiding breeding

#### WSTĘP

Do jednych z istotniejszych czynników wpływających na wielkość uzyskanego plonu pszenicy należą powszechnie występujące choroby zbóż, z których najważniejsze to: rdza brunatna (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*), mączniak prawdziwy traw (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), septorioza (*Stagonospora nodorum* syn. *Septoria nodorum*) i fuzarioza (*Fusarium* spp.). W zależności od warunków pogodowych, choroby te z różnym nasileniem występują zarówno na pszenicy jarej jak i ozimej, we wszystkich rejonach Polski. Odmiany pszenicy ozimej dopuszczone do uprawy w Polsce oraz nowe, będące w badaniach rejestrowych, pod względem odporności na porażenie przez grzyby *Blumeria graminis* i *Puccinia recondita* oceniane są jako średnio podatne i podatne w stadium siewek, a w warunkach polowych, w zależności od roku jako mniej lub bardziej wrażliwe.

W celu zwiększenia odporności na choroby grzybowe pszenic, hodowla nowych odmian skierowana jest na pozyskiwanie nowych, efektywnych źródeł odporności i wprowadzaniu ich do programów hodowlanych. Najważniejszym i najcenniejszym źródłem genów odporności na rdzę brunatną oraz mączniaka prawdziwego pszenicy są przede wszystkim gatunki dzikie pszenic oraz gatunki im pokrewne, tj.: *T. monococcum*, *T. spelta*, *T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *T. timopheevii*, *T. durum*, *T. carthlicum*, *T. sphaerococcum*, *T. tauschii* (syn. *Aegilops squarrosa*), *Ae. speltoides*, *Ae. longissima*, *Ae. ovata*, *H. villosa* (syn. *Dasyphyrum villosum* L. Candargy) oraz żyto (*Secale cereale*) (McIntosh, 1998; Górny, 2004; Chełkowski i in., 2005 b).

W ogólnie przyjętej nomenklaturze wszystkim genom odporności na rdzę brunatną przypisano symbol *Lr* (ang. *Leaf rust* – *Lr* genes). Aktualnie zidentyfikowano około 70 genów warunkujących odporność na populację *Puccinia recondita*. Natomiast genom odporności na mączniaka prawdziwego pszenicy przyporządkowano symbol *Pm* (ang. *Powdery mildew* — *Pm* genes). Z literaturowych doniesień wynika, że obecnie poznanych jest 57 genów *Pm* (Xue i in., 2009). Większość z genów odporności na rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego, są to geny główne, nazywane również genami R (ang. Major Resistance Genes), warunkujące odporność monogeniczną, opartą na teorii „gen na gen”, gdzie produkty genów awirulencji patogena współdziałają pośrednio lub

bezpośrednio z produktami genów R (Flor, 1955; Bennett, 1984; McIntosh i in., 1995; Huang i Röder, 2004; Górny, 2004; Tyrka i Chełkowski, 2003; Chełkowski i Koczyka, 2005 a; Chen i in., 2005; Perugii i in., 2008).

W celu poprawienia odporności na grzyb *P. recondita* f. sp. *tritici* oraz *B. graminis* f. sp. *tritici* w odmianach powszechnie uprawianych, możliwe jest równoczesne wprowadzenie do jednego genotypu różnych kombinacji efektywnych genów odporności. Piramidowanie kilku genów R w jednym genotypie, zwiększa skuteczność i trwałość odporności uprawianych odmian. Z czasem odporne odmiany zostają porażone przez patotypy wirulentne, pojawiające się w wyniku presji selekcyjnej na populację patogena. Dlatego też, bardzo ważnym kierunkiem w hodowli odpornościowej jest poszukiwanie nowych, efektywnych źródeł odporności na wszystkie choroby pszenicy. Za wysoce efektywne, zarówno na świecie jak i w Polsce, uważa się geny *Lr*: *Lr9*, *Lr12*, *Lr19*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr36*, *Lr37*, *Lr41*, *Lr42*, *Lr47*, *Lr50*, *Lr55* (Mesterházy i in., 2000; Woźniak-Strzembicka, 2003; Chełkowski i in., 2005b; Shamanin i Morgounov, 2009). W polskich odmianach pszenic ozimych i jarych najczęściej spotykanymi kombinacjami genów odporności na mączniaka prawdziwego, w przeszłości jak i obecnie, są: *Pm2 + Pm5*, *Pm2 + Pm6*, *Pm3d + Pm4b*, *Pm3d + Pm8*, *Pm3d + Pm* nieokreślony, *Pm5 + Pm8*, *Pm1 + Pm2 + Pm* nieokreślony, *Pm1 + Pm3d + Pm4b*, *Pm2 + Pm3d + Pm4b*, *Pm2 + Pm6 + Pm* nieokreślony, *Pm3d + Pm4b + Pm* nieokreślony oraz *Pm1 + Pm2 + Pm9 + Pm4b* (Kowalczyk i in., 1998; www.pin.org.pl).

Wykorzystywanie markerów molekularnych w genetyce i hodowli roślin uprawnych stanowi obecnie bardzo dogodne, czasami niezbędne i jedyne nadrzędzie diagnostyczne w selekcji korzystnych genotypów. Wspomagają prace hodowlane podczas selekcji wprowadzanego(ych) genu(ów) (ang. Foreground Selection) lub też w selekcji tła genetycznego (ang. Background Selection). Do najważniejszych korzyści MAS można niewątpliwie zaliczyć fakt, że selekcja materiału hodowlanego jest przede wszystkim niezależna od fazy rozwojowej badanych roślin oraz czynników zewnętrznych, co jest istotne w przypadku konieczności przeprowadzanie krzyżowań wypierających.

Celem niniejszej pracy było spiramidowanie dwóch genów odporności *Lr41* na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) i *Pm21* na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) w odmianie pszenicy ozimej Lexus, dobrze przystosowanej do polskich warunków przyrodniczych. Końcowym etapem przeprowadzonych prac było wyprowadzenie linii homozygotycznych pod względem odporności na oba patogeny.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiła elitarna niemiecka odmiana Lexus (pszenica ozima) (Hodowla A. Jackobi, W. von Borries-Eckendorf), dobrze przystosowana do polskich warunków klimatycznych, o wysokim potencjale plonowania, jednak podatna na *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* oraz *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Jako źródła odporności wykorzystano dwie linie pszenicy ozimej, wyprowadzone na Uniwersytecie w Kansas (Wheat Genetic and Genomic Resources Center). Pierwsze źródło odporności stanowiła linia KS90WGRC10 (oznaczona jako linia *Lr41*) z genem odporności na rdzę brunatną

*Lr41*, pochodzącym z diploidalnego dzikiego gatunku *Triticum tauschii* (syn. *Aegilops tauschii*, *Ae. squarrosa* L.). Jako źródło odporności na mączniaka prawdziwego wykorzystano translokacyjną linię 6VS/6AL Yangmai 5 (oznaczona jako linia *Pm21*) z genem odporności *Pm21*, pochodzącym z dzikiego diploidalnego gatunku *Haynaldia villosa* (syn. *Dasypyrum villosum*). W celu eliminacji niekorzystnych cech z punktu widzenia rolniczego, przeprowadzono krzyżowanie wypierające linią pszenicy ozimej RAH979 o wysokim potencjale plonowania, wcześniej uzyskaną w Pracowni Genetyki Stosowanej IHAR.

Do oceny reakcji na zakażenie przez *P. recondita* f. sp. *tritici* i *B. graminis* f. sp. *tritici* użyto jednozarodnikowych izolatów, odpowiednio izolat Pt2902 i Witon 2 (*P. recondita*) oraz Bgt28 (*B. graminis*), wirulentnych w stosunku do odmiany Lexus, a awirulentnych odpowiednio *Lr41* lub *Pm21*. Test fitopatologiczny przeprowadzono w kontrolowanych warunkach, przy fotoperiodzie 16 godz. światła 8 godz. ciemności i temperaturze w zakresie 16–22°C. Materiał roślinny zakażono zawiesiną zarodników *P. recondita* f. sp. *tritici*, zawierającej 1–2 kropli środka zmniejszającego napięcie powierzchniowe Tween-20. Po 8–10 dniach od inokulacji oceniono reakcję roślin w pięciostopniowej skali Levine i Cherewick (Kopahnke i in., 2004). Po upływie 3–4 dni od zakażenia izolatami *P. recondita*, przeprowadzono inokulację roślin izolatem *B. graminis* f. sp. *tritici* (Bgt28). Doświadczenie infekcyjne polegało na strząsaniu nad materiałem roślinnym zarodników konidialnych z roślin porażonych mączniakiem. Po 8–10 dniach od drugiej infekcji, oceniono reakcje roślin w pięciostopniowej skali wg Mainsa i Dietza (Czembor, 2008).

W zależności od selekcji materiału roślinnego (selekcja genów, selekcja tła genetycznego) do ekstrakcji DNA wykorzystano dwie różne metody izolacji DNA.

Do selekcji genu(ów) posłużono się metodyką opracowaną i opisaną przez Higgins i zespół (Higgins i in., 2000) z drobnymi modyfikacjami. Z każdego obiektu roślinnego pobrano 150 mg tkanki roślinnej. Pocięty materiał roślinny następnie umieszczono w 2 ml probówce uzupełnionej 1 ml buforu ekstrakcyjnego TPS (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M KCl, 10 mM EDTA). Całość wirowano przez 2 min. przy 12.000 obr./min. a następnie całość homogenizowano przy użyciu młynka miksującego MM301 (Retsch, Verder, Katowice, Polska) i częstotliwości wytrząsania 30 tys./min. w dwóch cyklach pięciominutowych. Po zakończeniu tego etapu izolacji, procedura przebiegała według procedury opracowanej przez Higginsa i zespół (Higgins i in., 2000).

Do selekcji tła genetycznego przeprowadzonej w pierwszym pokoleniu populacji mieszańcowej, wyizolowano genomowe DNA wykorzystując zestaw DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA). Z każdego obiektu pobrano 200 mg tkanki roślinnej, którą homogenizowano w buforze ekstrakcyjnym przy użyciu młynka miksującego MM301 (Retsch, Polska) i częstotliwości wytrząsania 30 tys./min. w dwóch cyklach pięciominutowych. Po zakończeniu pierwszego etapu izolacji, procedura przebiegała zgodnie z zaleceniami podanymi przez producenta zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Stężenie genomowego DNA oznaczono spektrofotometrycznie zgodnie z instrukcją fluorymetru NanoDrop 3300 (ThermoScientific, USA).

W celu określenia występowania genu *Lr41*, w selekcyjonowanym materiale roślinnym wykorzystano pięć *loci* mikrosatelitarnych: *Gdm35* (170 pz — par zasad), *Barc124* (250

pz), *Gwm210* (182 pz), *Gwm296* (135 pz) oraz *Gwm261* (160-200 pz). W tabeli 1 przedstawiono sekwencje nukleotydowe pięciu starterów użytych do selekcji genu *Lr41* (Röder i in., 1998; Pestsova i in., 2000; Singh i in., 2004; Somers i in., 2004; Song i in., 2005). Wszystkie wymienione startery zsyntetyzowano w Sigma-Genosys (Sigma-Genosys, W. Brytania). W każdej parze starterów jeden ze starterów na końcu 5' wyznakowano jednym z trzech barwników fluorescencyjnych ABI (FAM — niebieski, HEX — żółty lub TET — zielony). Reakcję amplifikacji przeprowadzono w probówkach (MJ Research, USA) w termocyklerze Mastercycler ep (Eppendorf AG, Niemcy). Reakcje PCR przeprowadzono w układzie zawierającym w objętości 8 µl następujące komponenty: 1,5 µl supernatantu otrzymanego po ekstrakcji za pomocą buforu TPS, 1 × bufor (MBI Fermentas, Litwa), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM startera i 1 jednostka polimerazy *Taq* (MBI Fermentas, Litwa). W zależności od temperatury przyłączania się starterów do matrycy zastosowano dwa profile termiczne reakcji PCR. Dla markerów *Barc124* oraz *Gdm35* warunki amplifikacji przebiegały według następującego programu: 94°C/2min. denaturacji wstępnej, 10 cykli składających się z: 94°C/30 sek., 55°C/30 sek., 72°C/1 min., a także 30 cykli 90°C/30 sek., 55°C/30 sek., 72°C/1 min. Dla markerów *Gwm296* oraz *Gwm261* profil reakcji PCR różnił się jedynie temperaturą hybrydizacji, która wynosiła 60°C/30 sek. W ostatnim cyklu reakcji amplifikacji, etap elongacji został wydłużony do 5 min. Dla markera *Gwm210* amplifikację prowadzono jednostopniowo według następującego profilu: 94°C/3min. denaturacji wstępnej, 45 cykli składających się z: 94°C/1 min., 60°C/1 min., 72°C/2 min., końcowe wydłużanie łańcucha DNA przedłużono do 10 min. Temperatura pokrywy grzewczej w termocyklerze, we wszystkich zastosowanych programach, wynosiła 105°C.

Tabela 1

Sekwencje nukleotydowych starterów wykorzystywanych do selekcji genu *Lr41*  
The sequences of the primers used to detect *Lr41* gene

Starter Primer	Sekwencja 5' – 3' Sequence 5' – 3'	
	Forward (For)	Reverse (Rev)
<i>Gdm35</i>	CCTGCTCTGCCCTAGATACG	ATGTGAATGTGATGCATGCA
<i>Barc124</i>	TGCACCCCTTCCAAATCT	TGCGAGTCGTGGTTGT
<i>Gwm210</i>	TGAGAGGAAGGCTCACACCT	TGCATCAAGAATAGTGTGGAAG
<i>Gwm296</i>	GCCTAATAAACTGAAAACGAG	AATTCACCTACCAATCTCTG
<i>Gwm261</i>	CTCGCGCTACTAGCCATTG	CTCCCTGTACGCCTAAGGC

Produkty PCR przed naniesieniem na żel polyakrylamidowy (Cambrex Bio Science Rockland, USA) denaturowano w obecności formamidu (Sigma-Aldrich, Polska) z temperaturą pokrywy grzewczej ustawioną na 105°C i temperaturą bloku 95°C przez 3 min., wykorzystując do tego termocykler UNO II (Biometria, Niemcy). Rozdział produktów amplifikacji PCR przeprowadzono na sekwenatorze DNA ABI 377XL (Applied Biosystems, USA) na 4,75% denaturującym żelu polyakrylamidowym. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze 1 × TBE (0,1 M Tris, 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 9 mM EDTA).

Do selekcji materiału roślinnego pod kątem obecności genu *Pm21* wykorzystano system markerów SCAR: *SCAR<sub>1250</sub>* (1250 pz), *SCAR<sub>1400</sub>* (1400 pz) (Liu i in., 1999; Yildirim i in., 2004), a także marker o nazwie *NAU/xibao* (902 pz) (Cao i in., 2006). W tabeli 2 przedstawiono sekwencje nukleotydowe trzech starterów użytych do selekcji genu *Pm21*. Wszystkie wymienione startery również zsyntetyzowano przez Sigma-Genosys (Sigma-Genosys, W. Brytania). Powielanie fragmentów DNA dla markerów *SCAR<sub>1250</sub>* oraz *SCAR<sub>1400</sub>*, przeprowadzono w cienkościennych probówkach w 10 µl mieszaniny reakcyjnej, w skład której wchodziły następujące komponenty: 4 µl supernatantu pochodzącego po ekstrakcji za pomocą buforu TPS, 1 × bufor (MBI Fermentas, Litwa), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM startera i 1 jednostka polimerazy *Taq* (MBI Fermentas, Litwa). W termocyklerze Mastercycler ep, z pokrywą grzewczą ustawioną na 105°C, mieszaninę reakcyjną poddano następującemu profilowi termicznemu: 94°C/3min. denaturacji wstępnej, 40 cykli składających się z: 94°C/1 min., 55°C/1 min., 72°C/2 min., w ostatnim cyklu reakcji etap elongacji trwał 5 min. Objętość mieszaniny reakcyjnej w amplifikacji z udziałem markera *NAU/xibao* wynosiła 8 µl, a w jej skład wchodziły następujące komponenty: 1,5 µl supernatantu po izolacji metodą TPS, 1 × bufor (MBI Fermentas, Litwa), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM startera i 1 jednostka polimerazy *Taq* (MBI Fermentas, Litwa). Powielanie fragmentów DNA przeprowadzono również w termocyklerze Mastercycler ep według następującego profilu reakcji PCR: 94°C/3min. denaturacji wstępnej, 32 cykli składających się z: 94°C/30 sek., 55°C/30 sek., 72°C/2 min., końcowy etap amplifikacji trwał 5 min.

Tabela 2

**Sekwencje nukleotydowych starterów wykorzystywanych do selekcji genu *Pm21***  
**The sequences of the primers used to detect *Pm21* gene**

Starter Primer	Sekwencja 5' – 3' Sequence 5' – 3'	
	Forward (For)	Reverse (Rev)
<i>SCAR<sub>1250</sub></i>	GTTTGTTACGTTGAATGAATTC	CACTCTCCTCCACTAACAGAGG
<i>SCAR<sub>1400</sub></i>	CACTCTCCTCAAACCTTGCAAG	CACTCTCCTCCACTAACAGAGG
<i>NAU/xibao</i>	AGATCCAACACCAGTTCAAG	ATGTTATGGAGGCTTGTGTC

Rozdział produktów amplifikacji dla trzech markerów wykorzystywanych przy selekcji materiału roślinnego na obecność genu *Pm21*, przeprowadzono na 1,5% żelu agarozowym przy napięciu 240 V, przez 4 godz. w buforze 0,5 × TBE. Otrzymany obraz rozdziału produktów amplifikacji wizualizowano przy użyciu bromku etydy, wykorzystując system Gel Logic 200 (Eastman Kodak Company, USA).

Do procentowego oszacowania genomu rodzica wypierającego (selekcja tła genetycznego) w pierwszym pokoleniu mieszańcowym wykorzystano technikę AFLP. Do tego celu, wykorzystano pięć kombinacji starterowych: *P38/T43* (P-ACT/T-CAT), *P41/T41* (P-AGG/T-CAC), *P39/T41* (P-AGA/T-CAC), *P35/T43* (P-ACA/T-CAT), *P36/T46* (P-ACC/T-CCG). Technikę AFLP wykonano w firmie KeyGene w Holandii (Keygene N.V., Holandia) zgodnie z protokołem opracowanym przez Vos i zespół (Vos i in., 1995). Ponadto w zależności od kombinacji jeden ze starterów AFLP wyznakowany

był jednym z dwóch barwników fluorescencyjnych (FAM — niebieski oraz JOE — zielony).

Rozdział produktów AFLP przeprowadzono za pomocą elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze typu MegaBACE 1000 (AME Bioscience, Norwegia). Detekcja w wolnym buforze przebiegała w systemie dwóch różnych sygnałów fluorescencyjnych pochodzących z dwóch płytek jednocześnie (każda płytka 96 próbek) w czasie około 1,5 godzinowego cyklu.

Procentowy udział genomu rodzica wypierającego oszacowano za pomocą następującego wzoru:

$$\%RP = [A / (A + H + B)] \times 100$$

gdzie:

- %RP – procentowy udział genomu rodzica wypierającego (Lexus),
- A – homozygota typu rodzic wypierający,
- H – heterozygota,
- B – homozygota typu dawca odporności (linia *Lr41* lub linia *Pm21*).

Do konstrukcji map sprzężeń i oszacowania dystansu genetycznego w centymorganach (cM) wykorzystano oprogramowanie JoinMap 4.0. (Plant Research International, Holandia) przy wartości krytycznej LOD 3.0.

Otrzymane obrazy map genetycznych wygenerowano za pomocą programu komputerowego MapChart 2.2. (Plant Research International, Holandia).

## WYNIKI

W pierwszym etapie pracy otrzymano dwie odrębne populacje, uzyskane po skrzyżowaniu odmiany pszenicy Lexus ze źródłem odporności na rdzę brunatną — linią *Lr41* (oznaczenie populacji: Lexus × *Lr41*), oraz odmiany Lexus ze źródłem odporności na mączniaka prawdziwego — linią *Pm21* (oznaczenie populacji: Lexus × *Pm21*).

Uzyskane rośliny F<sub>1</sub> populacji (Lexus × *Lr41*) i F<sub>1</sub> (Lexus × *Pm21*), przekrzyżowano między sobą. W wyniku tego, otrzymano populację mieszańcową krzyżowania zbieżnego ((Lexus × *Lr41*) × (Lexus × *Pm21*)) w liczbie 55 obiektów roślinnych. W badanej populacji ((Lexus × *Lr41*) × (Lexus × *Pm21*)) przeprowadzono selekcję molekularną na obecność dwóch *loci* odporności w jednym genotypie. Wśród 55 roślin z populacji ((Lexus × *Lr41*) × (Lexus × *Pm21*)) dokonano selekcji molekularnej pod względem obecności dwóch *loci* odporności, w wyniku czego do pierwszego krzyżowania z linią RAH979 wybrano 14 obiektów roślinnych (tab. 3). Dla pozostałych 41 obiektów roślinnych otrzymano niewystarczającą liczbę alleli *loci* mikrosatelitarnych dla genu *Lr41*, a w przypadku genu *Pm21* analizowane obiekty nie amplifikowały w reakcji PCR dla *locus* odporności. Dlatego też, zdecydowano, o wyeliminowaniu ich z kolejnego etapu badań.

W następnym etapie skrzyżowano 14 wyselekcjonowanych roślin z linią RAH979 i otrzymano pierwsze pokolenie populacji mieszańcowej [((Lexus × *Lr41*) × (Lexus × *Pm21*)) × RAH979] w liczbie 121 roślin. W analizowanej populacji mieszańcowej [((Lexus × *Lr41*) × (Lexus × *Pm21*)) × RAH979] przeprowadzono selekcję molekularną na obecność dwóch *loci* odporności w jednym genotypie. Na podstawie analizy molekularnej wybrano

do dalszych badań 29 roślin do analizy tła genetycznego (tab. 4). Pozostałe 92 rośliny, nie spełniły kryteriów selekcji molekularnej, dlatego też, wyeliminowano je z następnego etapu badań.

Tabela 3

**Analiza molekularna (selekcja genów) genów odporności na rdzę brunatną (*Lr41*) i mączniaka prawdziwego (*Pm21*) dla populacji mieszańcowej ((*Lexus* × *Lr41*) × (*Lexus* × *Pm21*))**  
**Molecular analysis (foreground selection) of the leaf rust (*Lr41*) and powdery mildew (*Pm21*) resistance genes for the ((*Lexus* × *Lr41*) × (*Lexus* × *Pm21*)) population**

Nr rośliny Plant number	Selekcja molekularna na obecność genu odporności na rdzę brunatną <i>Lr41</i> Molecular selection for the presence of leaf rust resistance gene <i>Lr41</i>			Selekcja molekularna na obecność genu odporności na mączniaka prawdziwego <i>Pm21</i> Molecular selection for the presence of powdery mildew resistance gene <i>Pm21</i>	
	<i>Gdm35</i>	<i>Barc124</i>	<i>Gwm210</i>	<i>SCAR<sub>1265</sub></i>	<i>SCAR<sub>1400</sub></i>
840	+	+	-*	+	+
848	+	-	-	+	+
850	+	+	-	+	+
851	+	+	-	+	+
853	+	-	+	+	+
854	+	-	+	+	+
855	+	+	-	+	+
858	+	+	+	+	+
860	+	-	+	+	+
864	+	+	+	+	+
866	+	+	+	+	+
871	+	+	+	+	+
883	+	+	+	+	+
887	+	-	-	+	+

\* - (-), (+) – brak lub obecność produktów amplifikacji; presence or absence of amplification products

Wyniki selekcji tła genetycznego zestawiono w tabeli 5. W analizie tła uzyskano łącznie 20 polimorficznych profili markerowych AFLP: *P35/T43-119.25*, *P35/T43-212.58*, *P35/T43-282.98*, *P36/T46-099.45*, *P36/T46-122.73*, *P36/T46-186.41*, *P36/T46-278.63*, *P36/T46-358.13*, *P36/T46-393.19*, *P36/T46-550.36*, *P38/T43-347.41*, *P39/T41-222.24*, *P39/T41-336.26*, *P41/T41-132.30*, *P41/T41-147.60*, *P41/T41-165.01*, *P41/T41-324.07*, *P41/T41-380.22*, *P38/T43-346.18*, *P38/T43-386.94*. Dla każdego z analizowanych obiektów, w stosunku do każdej wygenerowanej pary markerów AFLP, określono segregację populacji [((*Lexus* × *Lr41*) × (*Lexus* × *Pm21*)) × RAH979]. W zależności od typu otrzymanych prążków AFLP, rozróżniono homozygoty pod względem rodzica wypierającego (RAH979) oraz heterozygoty, a następnie badanym obiektom przypisano odpowiednie profile genetyczne. W badanym materiale roślinnym oszacowano procentowy udział genomu rodzica wypierającego. Dla analizowanej populacji, oscylował on w granicach 20–78,6%, odpowiednio dla rośliny numer 707 przypadło 78,6% genomu rodzica wypierającego, a 20% dla rośliny 684 (tab. 5).



Tabela 4

**Analiza molekularna (selekcja genów) genów odporności na rdzę brunatną (*Lr41*) i mączniaka prawdziwego (*Pm21*) dla populacji mieszańcowej [((*Lexus* × *Lr41*) × (*Lexus* × *Pm21*)) × RAH979]**  
**Molecular analysis (foreground selection) of the leaf rust (*Lr41*) and powdery mildew (*Pm21*) resistance genes for the [((*Lexus* × *Lr41*) × (*Lexus* × *Pm21*)) × RAH979] population**

Nr rośliny Plant number	Selekcja molekularna na obecność genu odporności na rdzę brunatną <i>Lr41</i> Molecular selection for the presence of leaf rust resistance gene <i>Lr41</i>				Selekcja molekularna na obecność genu odporności na mączniaka prawdziwego <i>Pm21</i> Molecular selection for the presence of powdery mildew resistance gene <i>Pm21</i>
	<i>Gdm35</i>	<i>Barc124</i>	<i>Gwm261</i>	<i>Gwm296</i>	<i>NAU/xibao</i>
601	+	+	+	+	+
602	+	+	-*	+	+
604	+	+	-	+	+
607	+	+	+	-	+
608	+	+	-	+	+
609	+	+	+	+	+
614	+	+	-	+	+
619	+	+	-	+	+
620	+	+	+	+	+
627	+	+	-	-	+
632	+	+	+	-	+
644	+	+	+	-	+
658	+	+	+	+	+
661	+	+	+	+	+
664	+	+	+	+	+
668	+	+	+	+	+
669	+	+	+	+	+
676	+	+	-	+	+
684	+	+	+	+	+
686	+	-	-	-	+
695	+	+	+	+	+
698	+	+	+	+	+
703	+	+	-	+	+
705	+	-	-	+	+
707	+	-	-	+	+
708	+	+	+	+	+
713	+	+	-	+	+
716	+	-	-	-	+
718	+	+	+	+	+

\* - (-), (+) – brak lub obecność produktów amplifikacji; presence or absence of amplification products

W celu uzyskania drugiego pokolenia populacji mieszańcowej [((*Lexus* × *Lr41*) × (*Lexus* × *Pm21*)) × RAH979], po przeprowadzonej selekcji genów oraz analizie tła genetycznego, do kolejnego rozmnożenia wybrano 12 roślin. Wyniki oceny molekularnej i fenotypowej dla wybranych roślin potomnych przedstawiono w tabeli 6. Oceniono zgodność między oceną selekcji molekularnej a oceną selekcji fenotypowej. Dla części obiektów uzyskano niejednoznaczne wyniki. Niektóre rośliny według oceny fenotypowej były odporne na oba patogeny, natomiast podczas oceny molekularnej, nie wykryto specyficznych alleli *loci* mikrosatelitarnych dla *locus* odporności *Lr41* i/lub brak translokacji *Pm21*.

Tabela 5

Procentowe oszacowanie udziału genomu rodzica wypierającego (% RP) dla populacji [((Lexus x *Lr41*) x (Lexus x *Pm21*)) x RAH979]  
 The percentage of recurrent parent (% RP) for the [((Lexus x *Lr41*) x (Lexus x *Pm21*)) x RAH979] population

	Markery AFLP AFLP Markers	P35/T43-119.25	P35/T43-212.58	P35/T43-282.98	P36/T46-099.45	P36/T46-122.73	P36/T46-186.41	P36/T46-278.63	P36/T46-358.13	P36/T46-393.19	P36/T46-550.36	P38/T43-347.41	P39/T41-222.24	P39/T41-336.26	P41/T41-132.30	P41/T41-147.60	P41/T41-165.01	P41/T41-324.07	P41/T41-380.22	P38/T43-346.18	P38/T43-386.94	Razem A All A	Razem H All H	Razem U All U	Razem B All B	SUMA SUM	A+H+B	%RP
Rodzic wypierający Recurrent parent	RAH979	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	20	0	0	0	20	20	100,0
	Lexus	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	20	0	0	0	20	20	100,0
Dawca odporności Donor parent	Pm21	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0	0	0	20	20	20	0,0
	Lr41	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0	0	0	20	20	20	0,0
Nr rośliny Plant number	707	A	A	A	H	A	A	A	H	U	A	U	U	U	A	H	A	A	A	U	U	11	3	6	0	20	14	78,6
	619	A	A	A	A	A	A	A	H	A	A	A	H	H	A	H	A	A	A	H	H	14	6	0	0	20	20	70,0
	609	H	A	A	H	A	H	A	A	A	A	H	U	U	H	H	A	A	H	A	A	11	7	2	0	20	18	61,1
	686	A	A	A	H	H	A	A	A	H	H	H	U	U	A	H	A	A	A	H	H	10	8	2	0	20	18	55,6
	602	H	A	H	H	H	H	A	H	A	A	H	H	A	A	H	A	A	A	A	A	11	9	0	0	20	20	55,0
	668	H	A	H	H	U	U	U	U	U	U	H	H	H	A	A	A	A	H	A	A	7	7	6	0	20	14	50,0
	607	H	A	H	H	A	A	H	A	A	A	H	H	H	H	H	A	A	H	A	A	10	10	0	0	20	20	50,0
	658	H	U	A	H	A	A	A	H	A	A	H	H	H	H	H	A	H	H	A	A	9	10	1	0	20	19	47,4
	614	H	A	H	H	H	H	H	A	H	A	H	H	A	A	A	H	A	H	A	A	9	11	0	0	20	20	45,0
	632	A	H	A	H	H	A	A	A	H	A	H	H	H	H	A	H	A	H	H	H	9	11	0	0	20	20	45,0
	716	H	H	H	H	H	A	H	A	H	H	H	H	A	A	A	A	A	H	A	A	9	11	0	0	20	20	45,0
	676	H	U	H	H	H	A	H	A	H	H	H	H	A	A	H	A	A	H	A	A	8	11	1	0	20	19	42,1
	620	A	H	A	A	A	H	H	A	H	A	H	H	H	H	H	A	A	U	H	H	8	11	1	0	20	19	42,1
	695	U	H	H	H	A	H	H	A	H	H	H	U	U	A	H	A	H	A	A	A	7	10	3	0	20	17	41,2
	601	H	H	H	U	U	U	U	U	U	U	H	H	A	A	H	A	H	H	A	A	5	8	7	0	20	13	38,5
Nr roślin F <sub>1</sub> BC <sub>1</sub>	698	U	H	H	H	H	A	U	A	H	H	H	U	U	H	H	A	A	H	A	A	6	10	4	0	20	16	37,5
Nr roślin F <sub>1</sub> BC <sub>1</sub>	604	H	H	H	H	H	A	A	H	H	A	H	H	H	A	H	H	A	H	A	A	7	13	0	0	20	20	35,0

c.d. Tabela 5

	Markery AFLP AFLP Markers	P35/T43-119.25	P35/T43-212.58	P35/T43-282.98	P36/T46-099.45	P36/T46-122.73	P36/T46-186.41	P36/T46-278.63	P36/T46-358.13	P36/T46-393.19	P36/T46-550.36	P38/T43-347.41	P39/T41-222.24	P39/T41-336.26	P41/T41-132.30	P41/T41-147.60	P41/T41-165.01	P41/T41-324.07	P41/T41-380.22	P38/T43-346.18	P38/T43-386.94	Razem A All A	Razem H All H	Razem U All U	Razem B All B	SUMA SUM	A+H+B	%RP
Rodzic wypierający	RAH979	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	20	0	0	0	20	20	100,0
Recurrent parent	Lexus	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	20	0	0	0	20	20	100,0
Dawca odporności	Pm21	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0	0	0	20	20	20	0,0
Donor parent	Lr41	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0	0	0	20	20	20	0,0
Nr rośliny  Plant number	669	H	H	H	H	H	A	H	A	H	H	H	H	A	H	H	A	H	A	A	A	7	13	0	0	20	20	35,0
	661	H	A	H	H	H	A	A	H	H	A	U	U	U	H	H	A	H	H	U	U	5	10	5	0	20	15	33,3
	608	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	H	A	U	A	H	H	A	A	6	13	1	0	20	19	31,6
	627	H	H	H	H	H	H	H	A	H	A	H	H	A	H	H	H	A	U	A	A	6	13	1	0	20	19	31,6
	644	H	H	A	H	H	A	H	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	6	14	0	0	20	20	30,0
	718	H	H	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	6	14	0	0	20	20	30,0
	703	H	H	H	H	H	H	A	H	H	H	H	U	U	H	A	A	H	H	A	A	5	13	2	0	20	18	27,8
	705	H	H	H	H	H	H	H	A	H	H	H	U	U	H	H	A	H	A	A	A	5	13	2	0	20	18	27,8
	664	H	U	H	H	H	A	A	H	H	A	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	5	14	1	0	20	19	26,3
	713	H	H	H	H	A	H	U	H	H	H	H	H	H	H	A	H	H	H	A	A	4	15	1	0	20	19	21,1
684	H	U	H	H	A	H	H	H	U	H	U	H	H	A	H	A	H	H	U	U	3	12	5	0	20	15	20,0	

Wśród 176 analizowanych osobników drugiego pokolenia populacji mieszańcowej  $[(\text{Lexus} \times \text{Lr}41) \times (\text{Lexus} \times \text{Pm}21)] \times \text{RAH979}$ , 156 obiektów roślinnych nie spełniło kryteriów selekcji molekularnej i dlatego też, odrzucono je z kolejnego etapu badań.

Wykorzystując wyniki oceny molekularnej w połączeniu z wynikami oceny fenotypowej, do trzeciego rozmnożenia z populacji wybrano 19 roślin odpornych wykazujących zgodność oceny molekularnej i fenotypowej (tab. 6).

Tabela 6  
**Analiza molekularna (selekcja genów) oraz ocena odporności dla F<sub>2</sub> populacji mieszańcowej  $[(\text{Lexus} \times \text{Lr}41) \times (\text{Lexus} \times \text{Pm}21)] \times \text{RAH979}$**   
**Molecular analysis (foreground selection) and reaction of  $[(\text{Lexus} \times \text{Lr}41) \times (\text{Lexus} \times \text{Pm}21)] \times \text{RAH979}$  F<sub>2</sub> population to leaf rust (*Lr41*) and powdery mildew (*Pm21*) resistance**

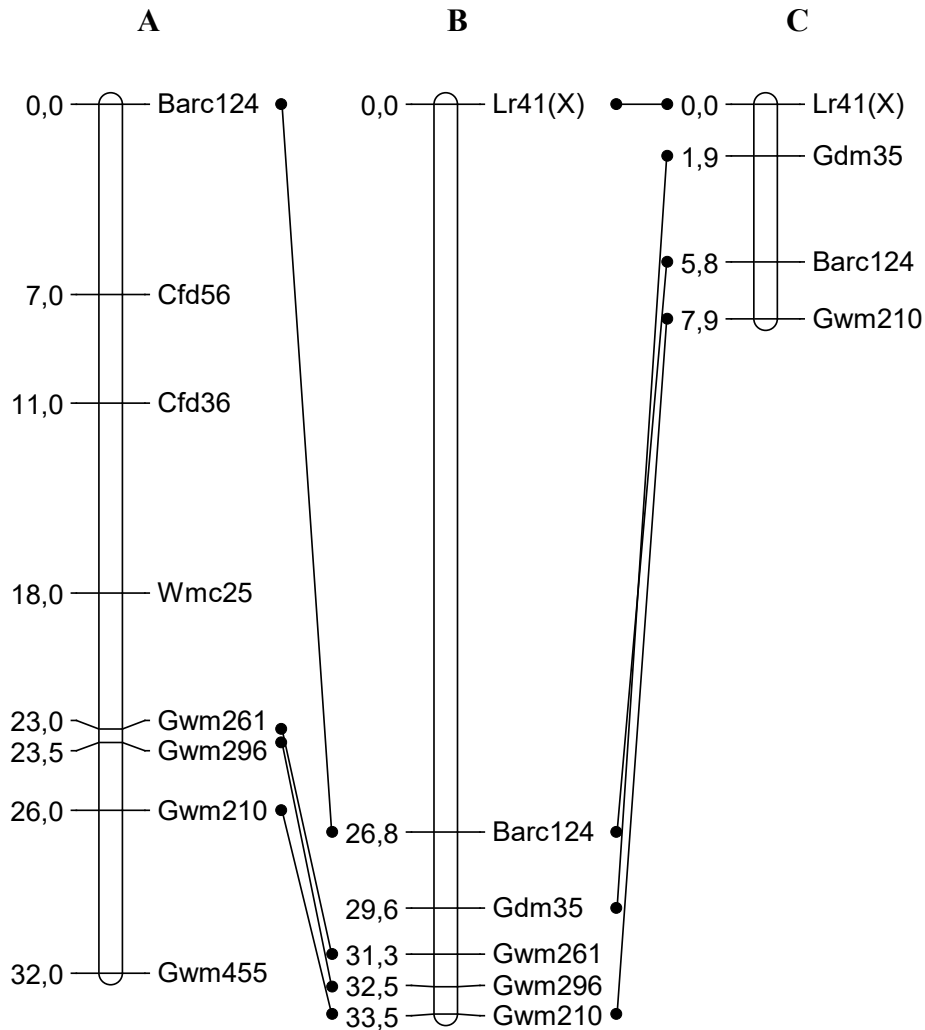
Rośliny F <sub>1</sub> Plants F <sub>1</sub>		Selekcja genów i ocena fenotypowa Foreground selection and leaf rust and powdery mildew test								
nr rośliny plant number	%RP	nr rośliny populacji F <sub>2</sub> plant number in F <sub>2</sub> generation	selekcja molekularna na obecność genów odporności molecular selection for the presence of the resistance genes					ocena fenotypowa resistance test		
			<i>Lr41</i>					<i>Pm21</i>	rdza brunatna leaf rust	mączniak prawdziwy powdery mildew
			<i>Gdm35</i>	<i>Barc124</i>	<i>Gwm261</i>	<i>Gwm296</i>	<i>Gwm210</i>	<i>NAU/xibao</i>		
602	55,0	602/664	+	+	+	+	+	+	O**	O
		602/666	+	+	-*	-	+	+	O	O
		602/676	+	+	-	-	+	+	O	O
		602/677	+	+	+	+	-	+	O	O
607	50,0	607/706	+	+	+	+	+	+	O	O
		609/611	+	+	-	-	-	+	O	O
609	61,1	609/612	+	+	+	-	-	+	O	O
		609/613	+	+	+	-	-	+	O	O
		609/615	+	+	+	-	-	+	O	O
		609/618	+	+	+	-	-	+	O	O
		609/620	+	+	+	-	-	+	O	O
		609/623	+	+	+	-	-	+	O	O
		609/626	+	+	+	+	+	+	O	O
614	45,0	614/715	+	+	+	+	+	+	O	O
		614/716	+	+	+	+	+	+	O	O
		614/717	+	+	+	+	+	+	O	O
		614/720	+	+	-	-	+	+	O	O
658	47,4	658/684	+	+	-	-	-	+	O	O
		658/688	+	+	-	-	-	+	O	O

\* - (-); (+) – brak lub obecność produktów amplifikacji, presence or absence of amplification products

\*\* O - rośliny odporne na podstawie oceny fenotypowej, plant resistant to leaf rust and powdery mildew

Na podstawie oceny molekularnej i fenotypowej drugiego pokolenia populacji mieszańcowej  $[(\text{Lexus} \times \text{Lr}41) \times (\text{Lexus} \times \text{Pm}21)] \times \text{RAH979}$ , skonstruowano mapę genetyczną (rys. 1). Utworzono grupy homologiczne w obrębie trzech map genetycznych, za pomocą których porównano kolejność położenia markerów na zbudowanej mapie w stosunku do map źródłowych (referencyjnych). Rozmieszczenie markerów na skonstruowanej mapie dla populacji mieszańcowej różniło się nieznacznie z położeniem markerów na dwóch mapach referencyjnych. Kolejność położenia markerów od *locus* odporności *Lr41(X)* (0,0cM) na chromosomie 2DS pszenicy dla populacji  $[(\text{Lexus} \times \text{Lr}41) \times (\text{Lexus}$

× *Pm21*) × RAH979] była następująca: *Barc124*, *Gdm35*, *Gwm261*, *Gwm296*, *Gwm210*, oddalone odpowiednio o 26,8cM; 29,6cM; 31,3cM; 32,5cM; 33,5cM od *locus* odporności.



Rys. 1. Porównanie skonstruowanej mapy genetycznej (B) z mapami referencyjnymi: wg Somers i in. (2004) (A) i wg Singh in. (2004) (C). A - mapa zbiorcza dla czterech populacji mapujących: Synthetic / Opata, RL4452 / AC Domain, Wuhan / Maringa, Superb / BW278; B - F<sub>2</sub> [(Lexus x *Lr41*) x (Lexus x *Pm21*) x RAH979], C - WGRC10 / TAM 107

Fig. 1. Comparison of elaborated *Lr41* genetic map (B) with reference maps by Somers et al. (2004) (A) and Singh et al. (2004) (C). A - Consensus map which contains four mapping populations: Synthetic / Opata, RL4452 / AC Domain, Wuhan / Maringa, Superb / BW278; B - F<sub>2</sub> [(Lexus x *Lr41*) x (Lexus x *Pm21*) x RAH979], C - WGRC10 / TAM 107

W pokoleniu F<sub>3</sub> w ocenie fenotypowej wśród 312 roślin, równoczesną odporność (na oba patogeny) stwierdzono u 113 roślin (tab. 7).

Tabela 7

**Reakcja populacji mieszańcowej [(Lexus × Lr4I) × (Lexus × Pm2I)] × RAH979] na rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego po inokulacji izolatami *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* i *Blumeria graminis* f. sp. *tritici***

**Reaction of [(Lexus × Lr4I) × (Lexus × Pm2I)] × RAH979] population for leaf rust and powdery mildew after inoculation with isolates with *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* and *Blumeria graminis* f. sp. *tritici***

Rośliny F <sub>1</sub> — Plants F <sub>1</sub>		Nr rośliny populacji F <sub>2</sub> Plant number in F <sub>2</sub> generation	Nr rośliny populacji F <sub>3</sub> Plant number in F <sub>3</sub> generation	Ocena fenotypowa — Resistance test	
nr rośliny plant number	%RP			rdza brunatna leaf rust	mączniak prawdziwy powdery mildew
602	55,0	602/664	602/664/1	O**	O
			602/664/2	O	O
			602/664/3	O	O
			602/664/4	O	O
			602/664/5	O	O
			602/664/6	O	O
			602/664/7	O	O
			602/664/8	O	O
			602/664/9	O	O
			602/664/10	O	O
			602/664/11	O	O
			602/664/12	O	O
			602/664/13	O	O
			602/664/14	O	O
			602/664/15	O	O
			602/664/16	Roślina wypadła — Missing plant	
			602/664/17	O	O
			602/664/18	O	O
			602/664/19	O	O
			602/664/20	O	O
609	61,1	609/611	609/611/1	O	O
			609/611/2	O	O
			609/611/3	O	O
			609/611/4	O	O
			609/611/5	O	O
			609/611/6	O	O
			609/611/7	O	O
			609/611/8	O	O
			609/611/9	O	O
			609/611/10	O	O
			609/611/11	O	O
			609/611/12	O	O
			609/611/13	O	O
			609/611/14	O	O
			609/611/15	O	O
			609/611/16	O	O
			609/611/17	O	O
			609/611/18	O	O
			609/611/19	O	O
			609/611/20	O	O
609/613		609/613	609/613/1	O	O
			609/613/2	O	O

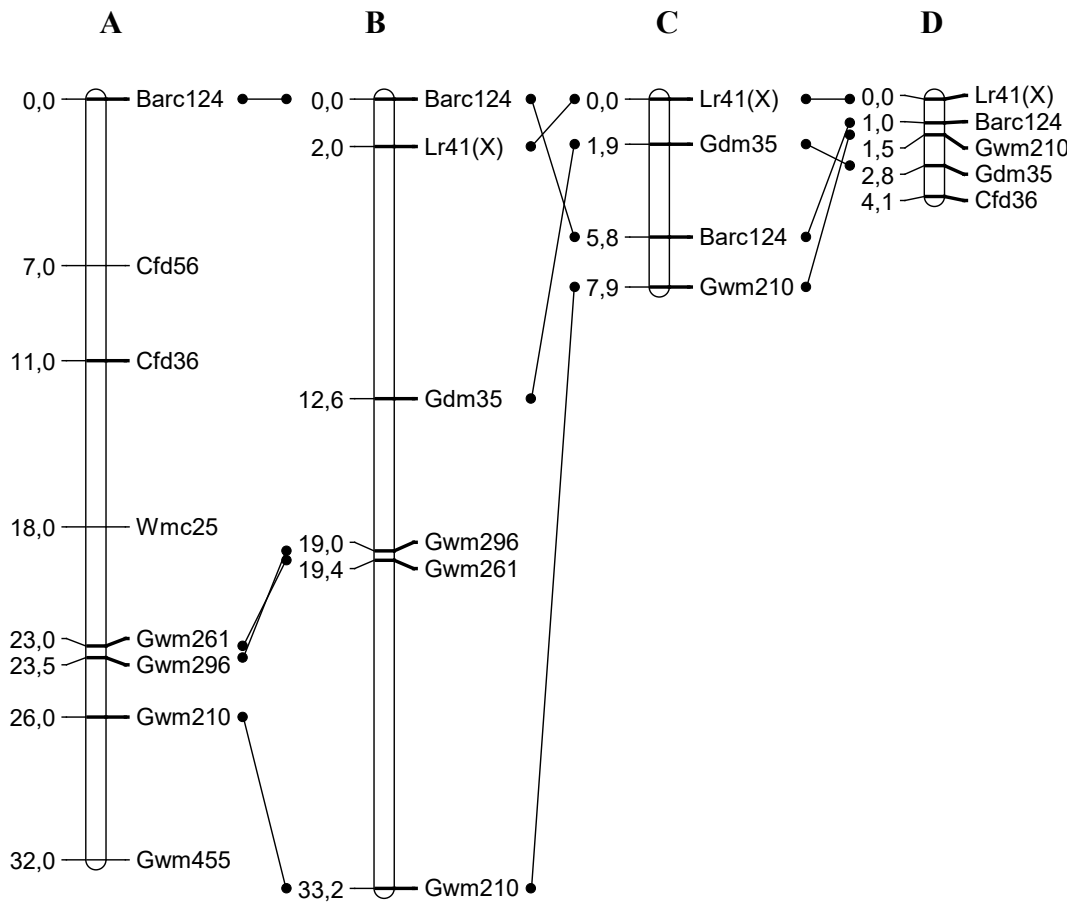
Rośliny F <sub>1</sub> — Plants F <sub>1</sub>		Nr rośliny populacji F <sub>2</sub> Plant number in F <sub>2</sub> generation	Nr rośliny populacji F <sub>3</sub> Plant number in F <sub>3</sub> generation	Ocena fenotypowa — Resistance test		
nr rośliny plant number	%RP			rdza brunatna leaf rust	mączniak prawdziwy powdery mildew	
		609/613	609/613/3	O	O	
			609/613/4	O	O	
			609/613/5	O	O	
			609/613/6	O	O	
			609/613/7	O	O	
			609/613/8	O	O	
			609/613/9	O	O	
			609/613/10	O	O	
			609/613/11	O	O	
			609/613/12	O	O	
			609/613/13	O	O	
			609/613/14	O	O	
			609/613/15	O	O	
			609/613/16	O	O	
			609/613/17	O	O	
			609/613/18	O	O	
			609/613/19	O	O	
			609/613/20	O	O	
				609/615/1	Roślina wypadła — Missing plant	
				609/615/2	Roślina wypadła — Missing plant	
		609/615	609/615/3	O	O	
			609/615/4	O	O	
			609/615/5	Roślina wypadła — Missing plant		
			609/615/6	O	O	
			609/615/7	O	O	
			609/615/8	O	O	
			609/615/9	O	O	
			609/615/10	Roślina wypadła — Missing plant		
			609/615/11	O	O	
			609/615/12	Roślina wypadła — Missing plant		
			609/615/13	Roślina wypadła — Missing plant		
			609/615/14	Roślina wypadła — Missing plant		
			609/615/15	O	O	
			609/615/16	O	O	
			609/615/17	Roślina wypadła — Missing plant		
			609/615/18	O	O	
			609/618	609/618/1	O	O
				609/618/2	O	O
		609/618/3		O	O	
		609/618/4		O	O	
		609/618/5		O	O	
		609/618/6		O	O	
		609/618/7		O	O	
		609/618/8		O	O	
		609/618/9		O	O	
		609/618/10		O	O	
		609/618/11		O	O	
		609/618/12		O	O	
		609/618/13		O	O	
		609/618/14		O	O	

Rośliny F <sub>1</sub> — Plants F <sub>1</sub>		Nr rośliny populacji F <sub>2</sub> plant number in F <sub>2</sub> generation	Nr rośliny populacji F <sub>3</sub> plant number in F <sub>3</sub> generation	Ocena fenotypowa — Resistance test		
nr rośliny plant number	%RP			rdza brunatna leaf rust	mączniak prawdziwy powdery mildew	
609	61,1	609/618	609/618/15	O	O	
			609/618/16	O	O	
			609/618/17	O	O	
			609/618/18	O	O	
			609/618/19	O	O	
			609/618/20	O	O	
		609/626	609/626/1	O	O	
				609/626/2	O	O
				609/626/3	O	O
				609/626/4	O	O
				609/626/5	Roślina wypadła — Missing plant	
				609/626/6	O	O
				609/626/7	O	O
				609/626/8	O	O
				609/626/9	Roślina wypadła — Missing plant	
614/720	614/720/1	O	O			
		614/720/2	O	O		
		614/720/3	O	O		
		614/720/4	O	O		
		614/720/5	O	O		
		614/720/6	O	O		
614	45,0	614/720	614/720/7	O	O	
			614/720/8	O	O	
			614/720/9	O	O	
			614/720/10	O	O	
			614/720/11	O	O	
			614/720/12	O	O	
			614/720/13	O	O	
			614/720/14	O	O	

\*\* O - rośliny odporne na podstawie oceny fenotypowej; plant resistant to leaf rust and powdery mildew

Analizie molekularnej poddano 93 rośliny z wybranych 113, z czego 20 roślin wypadło z powodu wyginięcia. Na podstawie uzyskanych wyników oceny fenotypowej i molekularnej skonstruowano mapę genetyczną (rys. 2). W obrębie czterech map stworzono grupy homologiczne, za pomocą których porównano ułożenie markerów na zbudowanej mapie w stosunku do trzech map referencyjnych, jak również pomiędzy samymi mapami źródłowymi. Kolejność markerów na chromosomie dla populacji  $[(\text{Lexus} \times \text{Lr41}) \times (\text{Lexus} \times \text{Pm21})] \times \text{RAH979}$ , w porównaniu do trzech map referencyjnych znacznie się różniła. Układ markerów na skonstruowanej mapie genetycznej dla populacji  $[(\text{Lexus} \times \text{Lr41}) \times (\text{Lexus} \times \text{Pm21})] \times \text{RAH979}$  oraz ocena fitopatologiczna były najważniejszym kryterium, jakim kierowano się przy selekcji materiału roślinnego.





**Rys. 2. Porównanie skonstruowanej mapy genetycznej (B) z mapami referencyjnymi: wg Somers i in. (2004) (A), wg Singh i in. (2004) (C) oraz wg Sun i in. (2009) (D). A - mapa zbiorcza czterech populacji mapujących: Synthetic / Opata, RL4452 / AC Domain, Wuhan / Maringa, Superb / BW278; B – F<sub>3</sub> [(Lexus x *Lr41*) x (Lexus x *Pm21*)] x RAH979], C - WGRC10 / TAM 107, D – KS93U62 x OK92G205/206**

**Fig. 2. Comparison of the elaborated *Lr41* genetic map (B) with two reference maps obtained from Somers et al. (2004) (A), Singh et al. (2004) (C) and Sun et al. (2009) (D). A - consensus map which contains four mapping populations: Synthetic / Opata, RL4452 / AC Domain, Wuhan / Maringa, Superb / BW278; B – F<sub>3</sub> [(Lexus x *Lr41*) x (Lexus x *Pm21*)] x RAH979], C - WGRC10 / TAM 107**

Kolejność markerów wraz z *locus* odporności *Lr41* zlokalizowanych na chromosomie 2DS dla analizowanej populacji była następująca: *Barc124* (0,0cM), *Lr41(X)* (2,0cM), *Gdm35*, (12,6cM), *Gwm296* (19,0cM), *Gwm261* (19,4cM), *Gwm210* (33,2cM). Każda z roślin wyznaczonych do dalszego etapu prac hodowanych musiała posiadać następujący układ markerowy: *Barc124* (0,0cM), *Gdm35* (12,6cM), *NAU/xibao*. Przeprowadzona selekcja molekularna wykazała, że spośród 93 zanalizowanych obiektów roślinnych

populacji [((Lexus × *Lr41*) × (Lexus × *Pm21*)) × RAH979], do kolejnego rozmnożenia wybrano 23 homozygotycznych linii pod względem odporności na oba patogeny (tab.8).

Tabela 8

**Analiza molekularna (selekcja genów) oraz ocena odporności dla F<sub>3</sub> populacji mieszańcowej [((Lexus × *Lr41*) × (Lexus × *Pm21*)) × RAH979]**  
**Molecular analysis (foreground selection) and resistance of [((Lexus × *Lr41*) × (Lexus × *Pm21*)) × RAH979] F<sub>3</sub> population to leaf rust (*Lr41*) and powdery mildew (*Pm21*)**

Rośliny F <sub>1</sub> Plants F <sub>1</sub>		Nr rośliny populacji F <sub>2</sub> plant number in generation	Selekcja genów i ocena fenotypowa Foreground selection and leaf rust and powdery mildew test										
nr rośliny plant number	%RP		nr rośliny populacji F <sub>3</sub> plant number in generation	selekcja molekularna na obecność genów odporności molecular selection for the presence of the resistance genes					ocena fenotypowa resistance test				
				<i>Lr41</i>					<i>Pm21</i>	rdza brunatna leaf rust	mączniak prawdziwy powdery mildew		
			<i>Barc124</i>	<i>Gdm35</i>	<i>Gwm296</i>	<i>Gwm261</i>	<i>Gwm210</i>	<i>NAU/xibao</i>					
602	55	602/664	602/664/2	+	*	+	-	*	-	+	+	O**	O
			602/664/4	+	+	-	-	-	-	+	O	O	
			602/664/5	+	+	-	-	-	+	+	O	O	
			602/664/8	+	+	-	-	-	+	+	O	O	
			602/664/13	+	+	-	-	-	+	+	O	O	
			602/664/19	+	+	-	-	-	+	+	O	O	
			602/664/20	+	+	-	-	-	+	+	O	O	
609	61,1	609/613	609/613/3	+	+	-	-	-	-	+	O	O	
			609/613/9	+	+	-	-	-	-	+	O	O	
			609/613/15	+	+	-	-	-	-	+	O	O	
			609/613/16	+	+	-	-	-	-	+	O	O	
			609/613/17	+	+	-	-	-	-	+	O	O	
			609/613/18	+	+	-	-	-	+	+	O	O	
			609/615	609/615/3	+	+	-	-	-	+	+	O	O
		609/618	609/618/3	+	+	-	-	-	-	+	O	O	
			609/618/4	+	+	-	-	-	-	+	O	O	
			609/618/6	+	+	-	-	-	+	+	O	O	
			609/618/16	+	+	-	-	-	+	+	O	O	
			609/618/20	+	+	+	+	+	+	+	O	O	
			609/626	609/626/2	+	+	-	-	-	-	+	O	O
609/626/12	+	+	+	+	+	+	+	O	O				
609/626/15	+	+	+	+	+	+	+	O	O				
614	45	614/720	614/720/1	+	+	+	+	+	+	+	O	O	

\* - (-); (+) – brak lub obecność produktów amplifikacji; presence or absence of amplification products

\*\* O - rośliny odporne na podstawie oceny fenotypowej; plant resistant to leaf rust and powdery mildew

## DYSKUSJA

Wzbogacanie pul genowych pszenicy prowadzone na drodze krzyżowań jest zabiegiem hodowlanym, dzięki któremu dochodzi do połączenia efektywnych genów odporności na szerokie spektrum ras jednego lub kilku patogenów (Liu i in., 2000; Chełkowski i in., 2005b). Kumulacja różnych kombinacji genów warunkujących odporność na ważne z punktu widzenia rolniczego choroby, w tym również genów o charakterze ilościowym, jest obecnie metodą powszechnie stosowaną w programach hodowlanych na całym świecie.

Istnieje wiele przykładów wprowadzania efektywnych genów odporności do jednego genotypu. Przykładem są prace prowadzone przez zespół Liu (Liu i in., 2000), którzy wprowadzili dwa geny odporności na mączniaka prawdziwego w kombinacjach: *Pm4a* + *Pm21* oraz *Pm2* + *Pm21* do chińskiej odmiany pszenicy Yang158. Jednak brak jest doniesień literaturowych dotyczących wprowadzenia kombinacji *Lr41* + *Pm21*, czego podjęto się w pracach prowadzonych w Pracowni Genetyki Stosowanej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Radzikowie.

Wybór pożądaných genotypów przy użyciu technik molekularnych, jest nieporównywalnie szybszą i w większości przypadków skuteczniejszą metodą selekcji materiału roślinnego. Dlatego też, w celu selekcji korzystnych genotypów pod względem obecności genu(ów) odporności na rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego, po każdym wykonanym krzyżowaniu przeprowadzono analizę molekularną. W początkowym etapie badań do selekcji materiału roślinnego pod kątem obecności genu *Lr41* wykorzystano trzy markery mikrosatelitarne SSR, sprzężone z genem *Lr41*: *Gdm35*, *Barc124* oraz *Gwm210*. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez Singha i zespół (Singh i in., 2004) oraz Sun i zespół (Sun i in., 2009), markery te, nie potwierdziły w pełni swojego praktycznego zastosowania podczas selekcji materiału roślinnego pod względem obecności genu *Lr41*. Interpretacja otrzymanych obrazów elektroforetycznych, czyli produktów reakcji PCR, przy użyciu wspomnianych markerów SSR, była niekiedy trudna i problematyczna. Dlatego też, aby selekcja materiału roślinnego była bardziej rzetelna i dokładniejsza, zdecydowano się na zastosowanie dodatkowych markerów mikrosatelitarnych. W tym celu posłużono się mapą referencyjną wg Somers i zespół (Somers i in., 2004). Wybrano dwa polimorficzne markery SSR: *Gwm261* oraz *Gwm296*, zlokalizowane na krótkim ramieniu chromosomu 2DS, które wg Somers położone są najbliżej literaturowych mikrosatelit. Nadal istnieją pewne niejasności dotyczące prawidłowego doboru markerów molekularnych do selekcji genu *Lr41*. Singh z zespołem (Singh i in., 2004) uważają, że do selekcji materiału roślinnego, wystarczy wykorzystać tylko marker *Gdm35*, najbardziej sprzężony z *locus* odporności (1,9cM od *locus Lr41*). Z tego też względu, na przełomie ostatnich dwóch lat, selekcja pszenic pod względem obecności genu *Lr41*, prowadzana w amerykańskich programach hodowlanych opierała się tylko na wspomnianym markerze. Okazało się jednak, że nie jest on na tyle wiarygodnym i uniwersalnym, aby można go było wykorzystywać na szeroką skalę w selekcji wspomaganą markerami (MAS) (Sun i in., 2009). Natomiast z wyników otrzymanych przez Sun i zespół (Sun i in., 2009) można wywnioskować, że do selekcji genu *Lr41*, należy posłużyć się czterema markerami: *Barc124*, *Gwm210*, *Gdm35* oraz *Cfd36*. Jednak autorzy tych badań wyraźnie podkreślają, że prawidłowy dobór markerów do selekcji materiału roślinnego powinien być poprzedzony bardzo dokładną analizą źródła pochodzenia odporności (dawcy odporności). Sugerują oni, że selekcja materiału roślinnego może być oparta tylko na podstawie jednego markera *Gdm35* tylko wtedy, kiedy dawcą odporności na rdzę brunatną jest amerykańska odmiana Thunderbolt (źródło pochodzenia: Abilene/KS90WGRC10). Innym przykładem prawidłowego wykorzystania markerów podczas selekcji genu *Lr41* jest zestaw *Barc124* oraz *Gdm35*, gdy źródło odporności pochodzi z linii KS93U62 (źródło pochodzenia: Century\*3/TA2460) (Sun i in., 2009). Wspomniane przykłady świadczą o trudnościach i

problemach, jakie często występują podczas selekcji materiału roślinnego pod względem obecności genu *Lr41*. Dla selekcji wspomaganej markerami (prowadzonej na szeroką skalę) stanowi to bardzo poważny problem, bowiem MAS powinna opierać się o markery, które bez względu na źródło pochodzenia, są powtarzalne oraz generują łatwe do interpretacji wyniki.

W selekcji genotypów pod względem obecności genu odporności *Pm21*, po każdym wykonanym krzyżowaniu posłużono się, w zależności od etapu przeprowadzonych badań, trzema markerami molekularnymi: *SCAR<sub>1250</sub>*, *SCAR<sub>1400</sub>* oraz *NAU/Xibao*. W początkowej fazie selekcja materiału roślinnego oparta była na markerach *SCAR<sub>1250</sub>* oraz *SCAR<sub>1400</sub>*. Otrzymane rozmiary produktów reakcji PCR w pełni pokryły się z polimorfizmem DNA otrzymanym przez Liu i zespół (Liu i in., 1999). W dalszej fazie badań do selekcji *Pm21* wykorzystano nowy marker *NAU/Xibao*. Uzyskane wyniki, również potwierdziły się z pracą Cao i zespół (Cao i in., 2006). Wszystkie wspomniane trzy markery generowały powtarzalne, łatwe do interpretacji wyniki, i w pełni potwierdziły swoje praktyczne zastosowanie podczas selekcji wspomaganej markerami. Innym przykładem wykorzystania markerów do wykrycia genu *Pm21* w selekcyonowanym materiale roślinnym są prace Liu z zespołem (Liu i in., 2000), którzy użyli marker RFLP o nazwie *Psr113*. Jednak ograniczeniem tego systemu markerowego do wykorzystania w selekcji materiału roślinnego na szeroką skalę jest wysoki koszt analizy oraz długotrwała procedura (Tanskley i in., 1989). Dlatego też, czynniki te eliminują markery RFLP w selekcji wspomaganej markerami.

W niniejszej pracy przeprowadzono jedno krzyżowanie z linią RAH979. Zastosowanie tego modelu krzyżowania miało na celu wykorzystanie linii o wysokiej wartości gospodarczej i wprowadzeniu korzystnych innych cech do analizowanej populacji mieszańcowej. Główną ideą tego rodzaju krzyżowania było oszacowania za pomocą markerów molekularnych, zawartości genomu biorcy (ang. Recipient Genome Content — RGC), a następnie wybór do kolejnych krzyżowań osobników zawierających największą liczbę alleli rodzica wypierającego. Selekcja tła genetycznego kontrolowana przez markery molekularne przyczynia się w sposób znaczący do przyspieszenia powrotu do rodzica wypierającego. Na podstawie doniesień literaturowych wykazano, że do kontroli tła genetycznego potrzeba od 2 do 4 polimorficznych markerów (Hospital i in., 1992; Serwin i Hospital, 2002). W tym celu najczęściej wykorzystuje się markery SSR oraz AFLP. Przy zastosowaniu dwóch markerów optymalnie oddalonych od telomeru, odpowiednio 18,6 oraz 27,5cM, na chromosomie o długości 100cM, zawartość genomu rodzica wypierającego, szacowana po pierwszym krzyżowaniu wstecznym, jest rzędu 93,4%. W przypadku metod konwencjonalnych wartość ta jest znacznie niższa i wynosi 75%. Przy kontroli tła genetycznego za pomocą trzech markerów, oddalonych od telomeru o 8,4cM i 18,3cM, uważa się, że zawartość genomu szacowana po pierwszym krzyżowaniu wypierającym, wynosi 97,1%. Podczas gdy, dla klasycznych metod, wartość ta wynosi 87,7%, w przypadku zastosowania czterech markerów oddalonych od telomeru odpowiednio o 4,5cM i 13,6cM, wartość genomu rodzica wypierającego, również szacowana po pierwszym krzyżowaniu wstecznym, wynosi 98,5%. Natomiast dla tradycyjnej hodowli, nie wspomaganej markerami molekularnymi, wartość ta wynosi

93,3% (Ribaut i Hoisington, 1998; Serwin i Hospital, 2002). Dlatego też, w obecnych badaniach podjęto próbę, procentowego oszacowania genomu rodzica wypierającego w pierwszym pokoleniu mieszańcowym za pomocą pięciu polimorficznych kombinacji markerów AFLP, losowo rozproszonych po całym genomie pszenicy. Uzyskane wyniki kształtowały się dla populacji mieszańcowej  $[(\text{Lexus} \times Lr41) \times (\text{Lexus} \times Pm21)] \times \text{RAH979}$  w przedziale 78,6%–20,0% podobieństwa genetycznego. Uzyskane szacunkowe wartości nie w pełni pokryły się z wynikami otrzymanymi przez Chen i zespół (Chen i in., 2001), którzy do selekcji tła genetycznego wykorzystali dziesięć par markerów AFLP. Zawartość genomu rodzica wypierającego szacowali oni po pierwszym, drugim oraz trzecim krzyżowaniu wypierającym. W badaniach tych dla populacji mieszańcowej  $F_1BC_1$  udział genomu rodzica wypierającego wynosił 92,25%, dla  $F_1BC_2$  — 97,67%, a dla  $F_1BC_3$  — 98,8% podobieństwa genetycznego (Chen i in., 2001). Gupta z zespołem (<http://ses.library.usyd.edu.au/bitstream>) selekcję tła genetycznego przeprowadzili dopiero po trzecim krzyżowaniu wstecznym. Do tego celu wykorzystali 35 markerów SSR oraz 12 kombinacji markerów AFLP. Uzyskane wyniki pozwoliły na oszacowanie podobieństwa genetycznego, które kształtowało się w przedziale od 94,3%–97% (<http://ses.library.usyd.edu.au/bitstream>). Różnice wynikające z szacunkowych pomiarów podobieństwa genetycznego, przeprowadzonych dla populacji mieszańcowej  $[(\text{Lexus} \times Lr41) \times (\text{Lexus} \times Pm21)] \times \text{RAH979}$  mogą wynikać z różnych sposobów określania tej wartości, często w publikacjach nie wyjaśnionych ani nie opisanych, jak również z różnej liczby markerów molekularnych wykorzystanych do selekcji tła genetycznego.

W niniejszej pracy przeprowadzono również ocenę reakcji materiału roślinnego na populację *P. recondita* f. sp. *tritici* i *B. graminis* f. sp. *tritici*. Do tego celu użyto jednozarodnikowych izolatów, wirulentnych w stosunku do odmian wypierających, natomiast awirulentnych do linii odpowiednio z genem *Lr41* i *Pm21*. Wyniki testów fitopatologicznych w połączeniu z oceną molekularną były czynnikami, decydującymi o wyborze korzystnych genotypów. Dla populacji mieszańcowej wyniki testu patogeniczności nie pokryły się we wszystkich przypadkach z oceną molekularną. Wyodrębniono obiekty, które według oceny fenotypowej były odporne na izolaty rdzy brunatnej, a według oceny molekularnej były podatne i nieamplifikowały w reakcji PCR produktów w oczekiwanej wielkości (par zasad) dla *locus* odporności *Lr41*. Fakt ten potwierdza opinię, iż selekcja genu *Lr41* za pomocą samych markerów molekularnych może być niewystarczająca i nawet w niektórych przypadkach niestety błędna. Dlatego przeprowadzenie testu fitopatologicznego jest wciąż niezbędnym kryterium selekcji materiału roślinnego w programach hodowlanych. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, że selekcja korzystnych obiektów za pomocą wspomnianych markerów molekularnych, w tym samym programie hodowlanym, powinna zawsze być przeprowadzana o te same wielkości produktów amplifikacji (par zasad). W przeciwnym razie, można prowadzić selekcję materiału hodowlanego błędnie i wybierać materiał roślinny pod względem innych cech użytkowych.

W trakcie piramidowania genów *Lr41* i *Pm21* w jednym genotypie pszenicy dla populacji mieszańcowej sporządzono ( $F_2$  oraz  $F_3$ ) mapy molekularne. Porównując ułożenie markerów w obrębie populacji mieszańcowej, stwierdzono, że lokalizacja markerów

sprzężonych z *locus* odporności *Lr41* jest zmienna. Ponieważ, zaobserwowano na mapach różnice wynikające z lokalizacji poszczególnych markerów względem *locus Lr41*, otrzymane wyniki porównano z wynikami uzyskanymi przez Singha i zespół (Singh i in., 2004) oraz Sun i zespół (Sun i in., 2009). Na otrzymanej przez Singha i zespół mapie kolejność markerów względem *locus* odporności była następująca: *Gdm35*, *Barc124*, *Gwm210* (Singh i in., 2004). Na mapie zbudowanej przez Sun z zespołem (Sun i in., 2009) kolejność markerów względem genu *Lr41* była zachowana według następującej kolejności: *Barc124*, *Gwm210*, *Gdm35*, *Cfd36*. Kolejność markerów względem siebie na mapach genetycznych znacznie się różniła co było potwierdzeniem innych badań (Sun i in., 2009). Ponadto wg mapy referencyjnej na chromosomie 2DS, nie ma markera *Gdm35* (Somers i in., 2004). Dlatego po przeanalizowaniu wyników uzyskanych dla populacji mieszańcowej pokolenia F<sub>3</sub> zdecydowano że, kryteria selekcji materiału roślinnego będą niezależne i że populacja ta będzie traktowana oddzielnie. Głównymi czynnikami decydującymi o selekcji materiału roślinnego w F<sub>3</sub> były wyniki oceny fenotypowej oraz kolejność markerów molekularnych na chromosomie względem genu odporności *Lr41*. Zaistniałe różnice w lokalizacji markerów na poszczególnych mapach genetycznych, można tłumaczyć faktem tym, iż populacje mapujące miały różne tło genetyczne oraz różna była ich liczebność, co miało znaczący wpływ na skonstruowane tychże map.

Wprowadzenie dwóch genów *Lr41* i *Pm21*, z których *Lr41* warunkuje odporność pszenicy na rdzę brunatną powodowaną przez *P. recondita* a *Pm21* na mączniaka prawdziwego powodowanego przez *B. graminis* potwierdziło fakt, że techniki molekularne mogą znacznie skrócić proces hodowli odmian. Jednak nie mogą w pełni zastąpić metod tradycyjnych, polegających na opisie fenotypowym podatności lub odporności badanego materiału roślinnego na zakażenie określonym patogenem. Metody molekularne skracają również proces tworzenia linii homozygotycznych pod względem obecności określonego genu, co uzyskano w przypadku genów *Lr41* i *Pm21*. Linie te są cennym materiałem wyjściowym do dalszych programów hodowlanych i badań czysto naukowych.

#### WNIOSKI

1. Selekcja genu *Lr41* za pomocą trzech markerów mikrosatelitarnych: *Gdm35*, *Barc124*, *Gwm210* może być niewystarczająca i trudna w interpretacji, dlatego też, selekcja genu *Lr41* powinna być oparta o dodatkowe SSR tj.: *Gwm261*, *Gwm296*.
2. Markery molekularne: *SCAR<sub>1250</sub>*, *SCAR<sub>1400</sub>* oraz *NAU/xibao*, wykorzystywane w selekcji materiału roślinnego pod względem obecności genu *Pm21* generują powtarzalne i łatwe w interpretacji wyniki, co świadczy o ich uniwersalności dla MAS.
3. Zamiana dwóch markerów SCAR (*SCAR<sub>1250</sub>*, *SCAR<sub>1400</sub>*) na jeden marker *NAU/xibao* nie wpływa negatywnie na selekcję materiału roślinnego pod względem obecności genu *Pm21*.
4. Selekcja tła genetycznego za pomocą markerów AFLP pozwala oszacować procentowy udział genomu rodzica wypierającego i dlatego też, są one skutecznym narzędziem molekularnym wykorzystywanym w celu oszacowania podobieństwa genetycznego.

5. Przeprowadzenie testu fitopatologicznego w programie hodowlanym jest niezbędną częścią doświadczalną podczas selekcji wspomaganej markerami molekularnymi.

## LITERATURA

- Bennett F. G. A. 1984. Resistance to powdery mildew in wheat: A review of its use in agriculture and breeding programmers. *Plant. Pathol.* 33: 279 — 300.
- Cao A. Z., Wang X. E., Chen Y.P., Zou X.W., Chen P. D. 2006. A sequence-specific PCR marker linked with *Pm21* distinguishes chromosomes 6AS, 6BS, 6DS of *Triticum aestivum* and 6VS of *Haynaldia villosa*. *Plant Breed.* 125: 201 — 205.
- Chelkowski J., Koczyka G. 2005 a. Genomika i bioinformatyka roślin. Rozprawy i Monografie. IGR PAN, Poznań, str. 139 — 157.
- Chelkowski J., Stępień Ł., Strzembicka A. 2005 b. Ocena podatności pszenicy ozimej na rdzę brunatną oraz poszukiwanie źródeł odporności. *Acta Agrobotanica* 58 (1): 143 — 152.
- Chen S., Xu C. G., Lin X. H., Zhang Q. 2001. Improving bacterial blight resistance of '6078', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Plant Breed.* 120: 133 — 137.
- Chen X. M., Luo Y. H., Xia X. C., Xia L. Q., Chen X., Ren Z. L., He Z. H., Jia J. Z. 2005. Chromosomal location of powdery mildew resistance gene *Pm16* in wheat using SSR marker analysis. *Plant Breed.* 124: 225 — 228.
- Czembor H. J. 2008. Odporność na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) odmian jęczmienia włączonych do badań rejestrowych w Polsce w latach 2004-2006. *Biul. IHAR* 248: 33 — 42.
- Flor H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680 — 685.
- Górny, A.G. 2004. Zarys Genetyki Zboż. Tom 1. Jęczmień, pszenica i żyto. Wyd. Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, str.: 181 — 327.
- Higgins C. M., Hall R. M., Campbell P. R., Dietzgen R.G. 2000. PCR rescue and analysis of transgene sequences directly from crude extracts of transgenic embryos and plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 285a — 285g.
- Hospital F., Chevalet C., Mulsant P. 1992. Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics* 132: 1199 — 1210.
- <http://ses.library.usyd.edu.au/bitstream>.
- Huang X. Q., Röder M. S. 2004. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat. *Euphytica* 137: 203 — 223.
- Kopahnke D., Nachtigall M., Ordon F., Steffenson B. J. 2004. Evaluation and mapping of a leaf rust resistance gene derived from *Hordeum vulgare* subsp. spontaneous. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 40(3): 86 — 90.
- Kowalczyk K., Hsam S. L. K., Zeller F. J. 1998. Identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). XI. Cultivars grown in Poland. *J. Appl. Genet.* 39 (3): 225 — 236.
- Liu J., Liu D., Tao W., Li W., Wang S., Chen P., Cheng S., Gao D. 2000. Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. *Plant Breed.* 119: 21 — 24.
- Liu, Z., Sun, Q., Ni, Z., Yang, T. 1999. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat. *Plant Breed.* 118: 215 — 219.
- 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. 9<sup>th</sup> Int. Wheat Genet Symp.* 5: 13 — 72. Univ. Extension Press. University of Saskatchewan Saskatoon.
- McIntosh R. A., Wellings C. R., Park R. F. 1995. *Wheat Rust: an atlas of resistance genes*. CSIRO, Australia, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mesterházy Á., Bartoš P., Goyeau H. 2000. European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie* 20: 793 — 804.
- Perugini L. D., Murphy J. P., Marshall D., Brown-Guedira G. 2008. *Pm37*, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii*. *Theor. Appl. Genet.* 116: 417 — 425.

- Pestsova, E., Ganal, M.W., Röder, M.S. 2000. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43: 689 — 697.
- 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.
- 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.
- Shamanin V., Morgounov A. 2009. Spring wheat breeding in western Siberia for resistance to leaf and stem rust. 12<sup>th</sup> International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference, October 13–16, Antalya — Turkey. Abstract Book, str. 82.
- Singh S., Franks C. D., Huang L., Brown-Guedira G. L., Marshall D. S., Gill B. S. 2004. *Lr41*, *Lr39*, and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS. *Theor. Appl. Genet.* 108: 586 — 591.
- Somers D. J., Isaac P., Edwards K. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109: 1105 — 1114.
- Song Q.J., Shi J.R., Singh S., Fickus E.W., Costa J. M., Lewis J., Gill B.S., Ward R., Cregan P. B. 2005. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 110: 550 — 560.
- Sun, X., Bai, G., Carver, B.F. 2009. Molecular markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr41*. *Mol Breeding* 23: 311 — 321.
- Tanskley S. D., Young, N. D., Paterson A. H., Bonierbaale M. W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools and old science. *Biotechnology* 7: 257 — 264.
- Tyrka, M., Chełkowski, J. 2003. Enhancing the resistance of triticale by using genes from wheat and rye. *J. Appl. Genet.* 45(3): 283 — 295.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407 — 4414.
- Woźniak-Strzembicka, A. 2003. Wirulencja populacji *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* w Polsce w latach 1998–2001. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 230: 109 — 117.  
[www.pin.org.pl](http://www.pin.org.pl).
- Xue, F., Duan, X., Zhai, W., Zhou, Y., Ji, W. 2009. Microsatellite mapping of the powdery mildew resistance gene in two Chinese landraces of wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) Mazhamai and Xiaobaidong. 12<sup>th</sup> International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference, October 13-16, Antalya — Turcja. Abstract Book.
- Yildirim A., Sakin M., Karadag Y., Gokmen S., Kandemir N., Akkaya M. S., Yildirim F. 2004. Genetic marker mediated transfer of an alien gene, *Pm21*, into wheat conferring resistance to powdery mildew. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 18(2): 15 — 19.