

ANGELIKA KIEL¹, DOROTA WEIGT¹, MARTYNA KARPIŃSKA¹, JERZY NAWRACAŁA¹,
DANUTA KURASIAK-POPOWSKA¹, AGNIESZKA TOMKOWIAK¹, BOGUSŁAWA ŁUGOWSKA²

¹Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²„Danko” Hodowla Roślin Sp. z o.o. w Choryni

WYKORZYSTANIE MARKERÓW MOLEKULARNYCH W SELEKCJI GENOTYPÓW PSZENICY OTRZYMANÝCH W KULTURACH *IN VITRO**

THE USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE SELECTION
OF WHEAT GENOTYPES OBTAINED FROM *IN VITRO* CULTURES

Abstrakt

Wstęp. Rdza brunatna wywoływana przez patogen *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* należy do najgroźniejszych chorób grzybowych powodujących znaczne straty w plonach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). Najskuteczniejszą metodą walki z chorobami zbóż jest hodowla odpornościowa. Zastosowanie metod biotechnologicznych, jak markery molekularne i technika haploidyzacji, pozwala na skrócenie cyklu hodowli oraz zwiększenie wydajności selekcji. Celem badań była identyfikacja genu *Lr19* odporności na rdzę brunatną w genotypach pszenicy otrzymanych w kulturach *in vitro*.

Materiał i metody. Materiał do badań stanowiły rośliny haploidalne oraz spontanicznie podwojone haploidy otrzymane z mieszańców pokolenia F₁ powstałych z krzyżowania genotypów referencyjnych posiadających gen *Lr19* (T36, T39) i dobrze plonujących odmian ‘Ozon’ oraz ‘Hondia’. Identyfikację genu *Lr19* prowadzono z użyciem markerów *Xwmc221* oraz *GB*. Przebadano 58 genotypów o haploidalnej liczbie chromosomów oraz 39 spontanicznie podwojonych haploidów.

Wyniki. Obecność markera *Xwmc221* (200pz) stwierdzono w 29 haploidach oraz w 24 spontanicznie podwojonych haploidach. Obecność markera *GB* (130pz) obserwowano w 27 genotypach o haploidalnej liczbie chromosomów oraz w 27 spontanicznie podwojonych haploidach.

Wnioski. Wykonane analizy świadczą o tym, iż selekcja z zastosowaniem markerów molekularnych jest możliwa na poziomie haploidalnym, co pozwala na obniżenie kosztów i skrócenie cyklu hodowlanego.

*Badanie wykonano w ramach projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju nr PBS2/A8/25/2013 realizowanego przez konsorcjum BIOTRIGEN.

Słowa kluczowe: rdza brunatna, haploidy, markery DNA, *Lr19*, MAS

Wstęp

Rdza brunatna powodowana przez patogen *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* jest przyczyną znacznych strat plonów na całym świecie, sięgających nawet 50% (Abou-Elseoud i in., 2014; Imbabi i in., 2014). Hodowla odpornościowa pszenicy, wprowadzająca do nowych odmian geny odporności na rdzę brunatną (z ang. *Lr* – *leaf rust resistance genes*), jest najbardziej ekonomiczną oraz efektywną metodą minimalizacji strat plonów (Okoń i in., 2012; Sehgal i in., 2012).

Obecnie jednym z najbardziej efektywnych genów odporności na rdzę brunatną, niosącym odporność przeciwko wszystkim rasom patogenu w wielu regionach świata, jest gen *Lr19* (Kassem i in., 2011; Sehgal i in., 2012). Gen ten zapewnia odpowiedź opartą na reakcji nadwrażliwości rośliny (Okoń i in., 2012). Został on wprowadzony do pszenicy zwyczajnej poprzez translokacje z *Thinopyrum ponticum* (syn. *Agropyron elongatum*) do dystalnej części długiego ramienia chromosomu 7D pszenicy zwyczajnej (Miralles i in., 2007; Uhrin i in., 2008). Gen *Lr19* może być piramidyzowany z innymi genami *Lr*, nadając roślinom dobrą i długotrwałą odporność na ten patogen (Gupta i in., 2006; Okoń i in., 2012).

W ostatnich latach skrócenie czasu selekcji oraz zwiększenie efektywności otrzymywania nowych odmian staje się bardzo ważnym aspektem hodowli roślin. Wyprowadzanie podwojonych haploidów (z ang. *DH* – *doubled haploids*) oraz zastosowanie markerów molekularnych pozwala na osiągnięcie tego celu. Haploidyzacja roślin znacząco ułatwia selekcję, ponieważ cechy recesywne roślin nie są maskowane przez cechy dominujące (Lantos i in., 2013; Pankiewicz i in., 2007). Ponadto, uzyskanie roślin haploidalnych, a następnie podwojenie liczby chromosomów, pozwala na otrzymanie osobników w pełni homozygotycznych w ciągu jednego pokolenia (Tadesse i in., 2012). Wykorzystanie technik *in vitro* w połączeniu z zastosowaniem markerów molekularnych (MAS – z ang. *Marker Assisted Selection*) związanych z genami kodującymi ważne cechy użytkowe daje nowe perspektywy dla hodowli nowych odmian (Parveen i in., 2014). Selekcja z wykorzystaniem markerów molekularnych może być bardzo efektywna ze względu na brak wpływu warunków środowiska, a także możliwość jej przeprowadzenia na dowolnym etapie rozwoju rośliny (Imbabi i in., 2014; Prabhu i in., 2009). Pozwala także na piramidyzację genów związanych z cechami takimi jak odporność na choroby, którą trudno osiągnąć za pomocą konwencjonalnych metod hodowli roślin (Joshi i Nayak, 2010; Parveen i in., 2014). Czynnikiem ograniczającym zastosowanie tej metody selekcji jest dostępność funkcjonalnych markerów związanych z pożądanymi cechami (Gupta i Varshney, 2000).

Celem pracy była identyfikacja genu *Lr19* odporności na rdzę brunatną w genotypach haploidalnych i podwojonych haploidach pszenicy ozimej otrzymanych w kulturach *in vitro*.

Material i metody

Rośliny haploidalne wyprowadzono w procesie androgenезy w kulturach pylnikowych zgodnie z metodą opisaną przez Weigt i in. (2012). Poziom ploidalności zregenerowanych roślin określono metodą cytometrii przepływowej w Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego Sp. z o.o. (Śliwińska, 2008). Materiałem wyjściowym do założenia kultur *in vitro* było 25 roślin z kombinacji krzyżowania T36 × ‘Hondia’ oraz 39 roślin z kombinacji T39 × ‘Ozon’ otrzymanych z „Danko” Hodowli Roślin Sp. z o.o., z których otrzymano łącznie 58 roślin haploidalnych i 39 spontanicznie podwojonych haploidów. Zregenerowane w drodze androgenезy rośliny, a także dwa genotypy referencyjne z genem *Lr19*: GSTR 420 (Thatcher *6/*Agropyron elongatum*) i Agatha (Agrus/6* Thatcher), wykorzystano do badań z zastosowaniem markerów molekularnych. Genotypy referencyjne otrzymano z kolekcji pszenicy z National Small Grain Collection, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service Aberdeen-Idaho, USA.

Genomowy DNA z roślin wyizolowano za pomocą zestawu Genomic Mini AX PLANT firmy A&A BIOTECHNOLOGY zgodnie z załączoną procedurą. Stężenie DNA oznaczono za pomocą spektrofotometru NanoDrop. Próby rozcieńczono wodą destylowaną w celu uzyskania jednakowego stężenia 25 ng/μl.

Reakcję PCR (z ang. *Polymerase Chain Reaction*) przeprowadzono w mieszaninie o całkowitej objętości 12,5 μl. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: woda – 5 μl, DreamTaq™ Green PCR Master Mix – 6,25 μl, startery – 2 × 0,25 μl, matryca DNA – 1 μl. Zidentyfikowano gen *Lr19* za pomocą dwóch markerów DNA: mikrosatelitarnego markera *Xwmc221* (Gupta i in., 2006) oraz markera *GB* typu STS (z ang. *Sequence-Tagged-Site*) konwertowanego przez Prinsa i in. (2001) z produktu amplifikacji markera AFLP (z ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*). Sekwencje starterów przedstawiono w tabeli 1. Amplifikację markerów PCR prowadzono w termocyklerze gradientowym TProfessional Basic Gradient Thermocycler. W procesie optymalizacji warunków reakcji PCR dla markera *Xwmc221* wybrano następujący profil: denaturacja wstępna – 3 min w 94°C, 35 cykli (denaturacja – 30 s w 94°C, przyłączanie starterów – 30 s w 55°C, synteza – 30 s w 72°C), synteza końcowa – 5 min w 72°C. W przypadku markera *GB* zastosowano warunki reakcji PCR według Prinsa i in. (2001): 4 min w 94°C, 30 cykli (30 s w 94°C, 30 s w 60°C, 30 s w 72°C), 5 min w 72°C. Produkty

Tabela 1. Sekwencje starterów wykorzystanych do identyfikacji genu *Lr19* w badanych genotypach

Marker	Sekwencja starterów 5'→3'	Długość amplifikowanego produktu (pz)	Źródło
<i>Xwmc221</i>	F: ACG ATA ATG CAG CGG GGA AT R: GCT GGG ATC AAG GGA TCA AT	200 – genotypy odporne 220 – genotypy podatne	Gupta i in. (2006)
<i>GB</i>	F: CAT CCT TGG GGA CCT C R: CCA GCT CGC ATA CAT CCA	130	Prins i in. (2001)

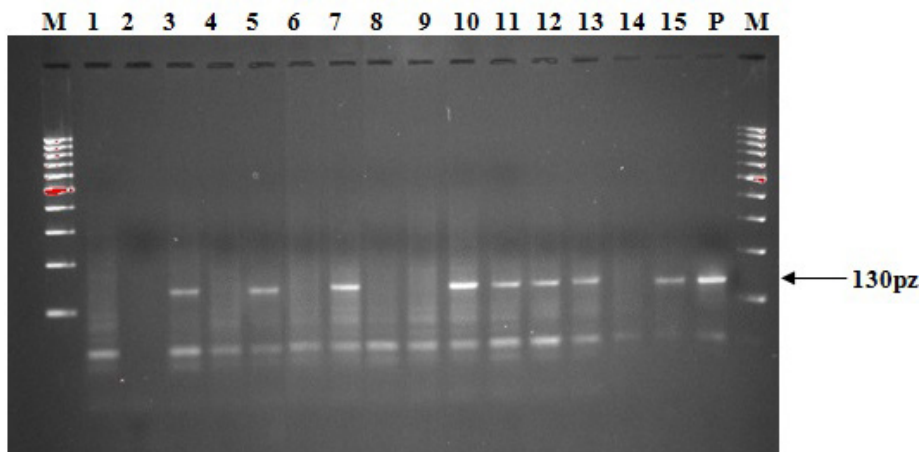
amplifikacji rozdzielano w 2-procentowym żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy. Obrazy elektroforetyczne wizualizowano na transiluminatorze High Performance UV Transiluminator UVP. Obrazy archiwizowano za pomocą systemu KTE – Video.

Wyniki i dyskusja

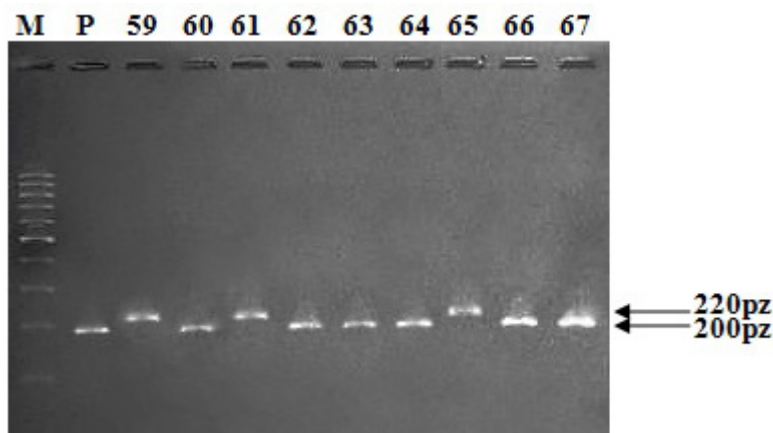
Wprowadzenie do odmian uprawnych genów odporności na choroby grzybowe, w tym na rdzę brunatną, jest jednym z podstawowych celów programów hodowlanych. Wykorzystanie markerów molekularnych w selekcji genotypów odpornych znacznie skraca czas trwania hodowli i w konsekwencji obniża koszty jej prowadzenia. Markery molekularne stosowane w hodowli roślin powinny przede wszystkim dawać powtarzalne wyniki, ważne jest również, by koszt pojedynczej analizy był stosunkowo niski. Praktyczny problem w zastosowaniu markerów molekularnych stanowi fakt, iż markery związane z określoną cechą danej populacji mapującej okazują się niespecyficzne w przypadku badania roślin o innym podłożu genetycznym. W związku z tym niezbędna jest ocena specyficzności markerów molekularnych z zastosowaniem dużej liczby genotypów w celu potwierdzenia ich wartości diagnostycznej, która często bywa mała (Tuveesson i in., 2007).

Wykorzystanie markerów molekularnych do selekcji roślin na poziomie haploidalnym pozwoliłoby na znaczne obniżenie kosztów wyprowadzania linii DH, umożliwiając wybór do dalszej hodowli roślin posiadających pożądane geny. Z tego względu w pracy przeprowadzono identyfikację genu *Lr19* w haploidach oraz spontanicznie podwojonych haploidach. Do analiz wykorzystano dwa markery molekularne – *Xwmc221* oraz *GB*. Marker *Xwmc221* kosegreguje z loci genu *Lr19*. Należy do markerów kodominujących, czego wynikiem jest amplifikacja fragmentu o rozmiarze 200pz dla genotypów odpornych (posiadających gen *Lr19*) i fragmentu 220pz dla genotypów wrażliwych (Gupta i in., 2006). Marker *GB* należy do grupy markerów dominujących – o występowaniu genu *Lr19* świadczy obecność produktu amplifikacji o rozmiarze 130pz (Prins i in., 2001). W obydwu badanych genotypach referencyjnych – GSTR 420 oraz Agatha – zidentyfikowano produkty amplifikacji markerów *Xwmc221* oraz *GB* charakterystyczne dla roślin posiadających gen *Lr19*, tj. odpowiednio 200pz oraz 130pz (rys. 1 i 2). W analizie roślin haploidalnych i podwojonych haploidów dokonanej za pomocą obu markerów wystąpiły nieznaczne różnice w obrazach elektroforetycznych. Spośród 58 badanych roślin haploidalnych marker *Xwmc221* o długości 200pz zidentyfikowano w 29 próbach, natomiast obecność markera *GB* (130pz) stwierdzono w 27 haploidach (tab. 2). W przypadku spontanicznie podwojonych haploidów w jednej roślinie obecność genu stwierdzono tylko za pomocą markera *Xwmc221*, a w czterech – jedynie z zastosowaniem markera *GB*. W analizie markerem *Xwmc221* prążek o długości 200pz otrzymano w przypadku 24 z 39 badanych roślin. W pozostałych 15 spontanicznie podwojonych haploidach obserwowano amplikon o długości 220pz świadczący o braku genu *Lr19*. Pośród badanych podwojonych haploidów nie wystąpiły formy heterozygotyczne, co potwierdziło ich gametofityczne pochodzenie. Produkt amplifikacji markera *GB* o długości 130pz obserwowano w 27 spontanicznie podwojonych haploidach (tab. 3).

Kiel, A., Weigt, D., Karpińska, M., Nawracała, J., Kurasiak-Popowska, D., Tomkowiak, A., Ługowska, B. (2017). Wykorzystanie markerów molekularnych w selekcji genotypów pszenicy otrzymanych w kulturach *in vitro*. *Nauka Przynr. Technol.*, 11, 1, 23–32. <http://dx.doi.org/10.17306/J.NPT.00179>



Rys. 1. Obraz elektroforetyczny z rozdziałem produktów PCR analizy roślin haploidalnych z użyciem markera *GB*. Ścieżki M – drabinki markerów o długości 100pz; ścieżki 3, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 15 – produkty amplifikacji o długości 130pz świadczące o obecności genu *Lr19*; P – kontrola pozytywna GSTR 420



Rys. 2. Obraz elektroforetyczny z rozdziałem produktów PCR analizy podwojonych haploidów z użyciem markera *Xwmc221*. Ścieżka M – drabinka markera o długości 100pz; ścieżki 60, 62, 63, 64, 66, 67 – produkty amplifikacji o długości 200pz świadczące o obecności genu *Lr19*; ścieżki 59, 61, 65 – produkty amplifikacji o długości 220pz świadczące o braku genu *Lr19*; P – kontrola pozytywna *Agatha*

Marker *Xwmc221* wykorzystali w swoich badaniach Gupta i in. (2006), analizując 10 odpornych i 10 podatnych roślin pokolenia F_2 z kombinacji krzyżowania linii izogenicznej Thatcher ($Tc + Lr19$) z Agra Local. Otrzymali oni produkt o długości 200pz, świadczący o obecności genu *Lr19*, we wszystkich 10 genotypach odpornych oraz produkt

Tabela 2. Obecność markerów genu *Lr19* w analizowanych roślinach haploidalnych

Lp.	Marker <i>Xwmc221</i>	Marker <i>GB</i>	Lp.	Marker <i>Xwmc221</i>	Marker <i>GB</i>
1	–	–	30	–	–
2	+	–	31	–	–
3	+	+	32	–	–
4	–	–	33	–	–
5	+	+	34	+	+
6	–	–	35	+	+
7	+	+	36	–	–
8	–	–	37	–	–
9	–	–	38	+	+
10	+	+	39	–	–
11	+	+	40	+	+
12	+	+	41	–	–
13	+	+	42	+	+
14	–	–	43	+	+
15	+	+	44	+	+
16	–	–	45	+	+
17	–	–	46	–	–
18	+	+	47	–	–
19	+	+	48	–	–
20	–	–	49	+	–
21	–	–	50	–	–
22	–	–	51	+	+
23	–	–	52	+	+
24	+	+	53	–	–
25	+	+	54	+	+
26	+	+	55	–	–
27	–	–	56	+	+
28	+	+	57	+	+
29	–	–	58	–	–

o długości 220pz, świadczący o braku odporności, w 10 genotypach podatnych. Skuteczność markera *GB* sprawdzono w wielu doświadczeniach. Kassem i in. (2011) w swoim badaniu otrzymali produkt o długości 130pz świadczący o obecności genu *Lr19* w 12 genotypach pszenicy zwyczajnej spośród 55 analizowanych, natomiast Leśniewska-Nowak i in. (2013) obecność tego genu wykazali w przypadku jednej odmiany

Kiel, A., Weigt, D., Karpińska, M., Nawracała, J., Kurasiak-Popowska, D., Tomkowiak, A., Ługowska, B. (2017). Wykorzystanie markerów molekularnych w selekcji genotypów pszenicy otrzymanych w kulturach *in vitro*. *Nauka Przynr. Technol.*, 11, 1, 23–32. <http://dx.doi.org/10.17306/J.NPT.00179>

Tabela 3. Obecność markerów genu *Lr19* w analizowanych spontanicznie podwojonych haploidach

Lp.	Marker <i>Xwmc221</i>	Marker <i>GB</i>	Lp.	Marker <i>Xwmc221</i>	Marker <i>GB</i>
59	–	–	79	–	–
60	+	+	80	+	+
61	–	–	81	+	+
62	+	+	82	–	–
63	+	+	83	–	–
64	+	+	84	–	–
65	–	–	85	+	+
66	+	+	86	+	–
67	+	+	87	–	–
68	+	+	88	–	–
69	+	+	89	+	+
70	+	+	90	–	+
71	+	+	91	+	+
72	+	+	92	–	–
73	+	+	93	+	+
74	+	+	94	+	+
75	+	+	95	–	+
76	+	+	96	–	+
77	–	+	97	–	–
78	+	+			

pszenicy zwyczajnej wśród 12 badanych. Podobne wyniki otrzymali Stępień i in. (2003), którzy stwierdzili obecność genu *Lr19* w trzech genotypach pszenicy zwyczajnej spośród 37 badanych.

Wnioski

1. W analizie genotypów referencyjnych za pomocą markerów molekularnych *Xwmc221* oraz *GB* otrzymano powtarzalne wyniki świadczące o ich specyficzności względem genu *Lr19*.

2. Wyniki testowania materiałów hodowlanych pozwalają stwierdzić, że zarówno marker *Xwmc221*, jak i marker *GB* można wykorzystać do selekcji roślin haploidalnych.

3. Ze względu na różnice w analizie obecności genu *Lr19* w siedmiu z 97 testowanych roślin sugeruje się stosowanie do selekcji przynajmniej dwóch markerów molekularnych w celu wyeliminowania błędnych analiz.

4. Istnieje konieczność ciągłego poszukiwania funkcjonalnych markerów dających powtarzalne i wiarygodne wyniki.

Literatura

- Abou-Elseoud, M. S., Kamara, A. E. M., Alaa-Eldein, O. A. E., El-Bebany, A. F., Ashmawy, N. A. E., Draz, I. S. (2014). Identification of leaf rust resistance genes in Egyptian wheat cultivars by multipathotypes and molecular markers. *J. Plant Sci.*, 2, 5, 145–151. <http://dx.doi.org/10.11648/j.jps.20140205.11>
- Gupta, P. K., Varshney, R. K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113, 163–185. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1003910819967>
- Gupta, S. K., Charpe, A., Prabhu, K. V., Haque, Q. M. R. (2006). Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 113, 6, 1027–1036. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-006-0362-7>
- Imbasy, I. A., Mahmoud, M. A., Hassan, M. E. M., Abd-El-Aziz, A. R. M. (2014). Identification of leaf rust resistance genes in selected Egyptian wheat cultivars by molecular markers. *Sci. World J.*, 2014, ID 574285. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/574285>
- Joshi, R. K., Nayak, S. (2010). Gene pyramiding – a broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 5, 3, 51–60.
- Kassem, M., El-Ahmed, A., Hakim, M. S., Al-Saleh, A., El-Khalifeh, M., Nachit, M. (2011). Identifying leaf rust resistance gene *Lr19* in durum wheat using simple sequence repeat (SSR) marker. *Afr. J. Biotechnol.*, 10, 44, 8716–8719. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.1526>
- Lantos, C., Weyen, J., Orsini, J. M., Gnad, H., Schlieter, B., Lein, V., Kontowski, S., Jacobi, A., Mihály, R., Broughton, S., Pauk, J. (2013). Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breed.*, 132, 2, 149–154. <http://dx.doi.org/10.1111/pbr.12032>
- Leśniowska-Nowak, J., Grądzielewska, A., Majek, M. (2013). Identyfikacja genów odporności na rdzę brunatną w wybranych europejskich odmianach pszenicy zwyczajnej oraz opracowanie warunków Multiplex PCR. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sect. E*, 68, 3, 20–28.
- Miralles, D. J., Resnicoff, E., Carretero, R. (2007). Yield improvement associated with *Lr19* translocation in wheat. Which plant attributes are modified? W: J. H. J. Spiertz, P. C. Struik, H. H. van Laar (red.), Scale and complexity in plant systems research: gene-plant-crop relations (s. 171–178). Dordrecht: Springer. http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-5906-X_14
- Okoń, S., Matysik, P., Nita, Z., Bichoński, A., Rubrycki, K., Woźna-Pawlak, U., Kowalczyk, K. (2012). Identyfikacja genu *Lr19* odporności na rdzę brunatną w polskich liniach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sect. E*, 67, 3, 39–43.
- Pankiewicz, K., Adamski, T., Kaczmarek, Z., Surma, M., Rębara, M. (2007). Molekularne i fenotypowe zróżnicowanie odmian i linii podwojonych haploidów pszenicy (*Triticum aestivum* L.). *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.*, 244, 91–97.
- Parveen, Z., Iqbal, N., Rahman, S. U., Younis, M., Nawaz, M., Raza, S. H., Iqbal, M. Z. (2014). Rust resistance evaluation of advanced wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using PCR-based DNA markers. *Pak. J. Bot.*, 46, 1, 251–257.
- Prabhu, K. V., Singh, A. K., Basavaraj, S. H., Cherukuri, D. P., Charpe, A., Gopala Krishnan, S., Gupta, S. K., Joseph, M., Koul, S., Mohapatra, T., Pallavi, J. K., Samsampour, D., Singh, A., Singh, V. K., Singh, A., Singh, V. P. (2009). Marker assisted selection for biotic stress resistance in wheat and rice. *Indian J. Genet. Plant. Breed.*, 69, 4, 305–314.

Kiel, A., Weigt, D., Karpińska, M., Nawracała, J., Kurasiak-Popowska, D., Tomkowiak, A., Ługowska, B. (2017). Wykorzystanie markerów molekularnych w selekcji genotypów pszenicy otrzymanych w kulturach *in vitro*. Nauka Przyn. Technol., 11, 1, 23–32. <http://dx.doi.org/10.17306/J.NPT.00179>

- Prins, R., Groenewald, J. Z., Marais, G. F., Snape, J. W., Koebner, R. M. D. (2001). AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theor. Appl. Genet., 103, 4, 618–624. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00002918>
- Sehgal, S. A., Tahir, R. A., Nawaz, M. (2012). Molecular characterization of wheat genotypes using SSR markers. Int. J. Bioautom., 16, 2, 119–128.
- Stępień, Ł., Golka, L., Chełkowski, J. (2003). Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources. J. Appl. Genet., 44, 2, 139–149.
- Śliwińska, E. (2008). Zastosowanie cytometrii przepływowej do oznaczania zawartości DNA u roślin. Post. Biol. Komórki, 35, Supl. 24, 165–176.
- Tadesse, W., Inagaki, M., Tawkaz, S., Baum, M., van Ginkel, M. (2012). Recent advances and application of doubled haploids in wheat breeding. Afr. J. Biotechnol., 11, 89, 15484–15492. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB12.2124>
- Tuvesson, S., Dayteg, C., Hagberg, P., Manninen, O., Tanhuanpää, P., Tenhola-Roininen, T., Kiviharju, E., Weyen, J., Förster, J., Schondelmaier, J., Lafferty, J., Marn, M., Fleck, A. (2007). Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. Euphytica, 158, 305–312. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-006-9239-8>
- Uhrin, A., Lang, L., Bedo, Z. (2008). Comparison of PCR-based DNA markers for using different *Lr19* and *Lr24* leaf rust resistance wheat sources. Cereal Res. Commun., 36, 4, 533–541. <http://dx.doi.org/10.1556/CRC.36.2008.4.2>
- Weigt, D., Nawracała, J., Popowska, D., Nijak, K. (2012). Examination of ability to androgenesis of spring wheat genotypes resistant to *Fusarium*. BioTechnologia, 93, 2, 116–122. <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46576>

THE USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE SELECTION OF WHEAT GENOTYPES OBTAINED FROM *IN VITRO* CULTURES

Abstract

Background. Leaf rust caused by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* is one of the most dangerous fungal diseases as it causes significant loss to common wheat (*Triticum aestivum* L.) yield. Breeding for resistance is the most effective method of controlling fungal diseases of cereals. Biotechnological methods such as molecular markers and the haploidisation technique shorten the breeding cycle and increase the efficiency of selection. The aim of the study was to identify the leaf rust resistance gene (*Lr19*) in wheat genotypes obtained in *in vitro* cultures.

Material and methods. The plant material consisted of haploid plants and spontaneously doubled haploids from generation F₁ hybrids, which were obtained by crossing reference genotypes with the *Lr19* gene (T36, T39) and well-yielding varieties ‘Ozon’ and ‘Hondia’. *Xwmc221* and *GB* markers were used for identification of the *Lr19* gene. 58 genotypes with the haploid number of chromosomes and 39 spontaneously doubled haploid plants were tested.

Results. The presence of *Xwmc221* marker (200bp) was observed in 29 haploid plants and in 24 spontaneously doubled haploids. The presence of *GB* marker (130bp) was observed in 27 genotypes with the haploid number of chromosomes and in 27 spontaneously doubled haploid plants.

Conclusions. The analyses proved that selection based on molecular markers is possible at the haploid level, which enables the reduction of costs and length of the breeding cycle.

Keywords: leaf rust, haploids, DNA markers, *Lr19*, MAS

Kiel, A., Weigt, D., Karpińska, M., Nawracała, J., Kurasiak-Popowska, D., Tomkowiak, A., Ługowska, B. (2017). Wykorzystanie markerów molekularnych w selekcji genotypów pszenicy otrzymanych w kulturach *in vitro*. *Nauka Przyr. Technol.*, 11, 1, 23–32. <http://dx.doi.org/10.17306/J.NPT.00179>

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Angelika Kiel, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Dojazd 11, 60-637 Poznań, Poland, e-mail: akiel@up.poznan.pl

Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:

31.03.2017

Do cytowania – For citation:

Kiel, A., Weigt, D., Karpińska, M., Nawracała, J., Kurasiak-Popowska, D., Tomkowiak, A., Ługowska, B. (2017). Wykorzystanie markerów molekularnych w selekcji genotypów pszenicy otrzymanych w kulturach *in vitro*. *Nauka Przyr. Technol.*, 11, 1, 23–32. <http://dx.doi.org/10.17306/J.NPT.00179>