

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, e-mail: aleksandra.gogol@up.lublin.pl

ALEKSANDRA GOGÓŁ, JUSTYNA LEŚNIEWSKA-NOWAK,
MICHAŁ NOWAK, SYLWIA OKOŃ, KRZYSZTOF KOWALCZYK

**Opracowanie multiplex PCR do detekcji
genów odporności *Lr21* i *Pm4b* w pszenicy zwyczajnej
(*Triticum aestivum* L.)**

Development of multiplex PCR for *Lr21* and *Pm4b* resistance genes detection
in common wheat (*Triticum aestivum* L.)

Streszczenie. Rdza brunatna powodowana przez grzyb *Puccinia triticina* oraz mączniak prawdziwy *Blumeria graminis* są jednymi z najgroźniejszych chorób pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). Najskuteczniejszą metodą kontrolowania i ograniczania skutków wywołanych przez te patogeny jest wprowadzanie do uprawy odmian charakteryzujących się zwiększoną odpornością. Celem prezentowanych badań była identyfikacja genów odporności na rdzę brunatną – *Lr21* oraz mączniaka prawdziwego – *Pm4b* w polskich odmianach pszenicy zwyczajnej oraz opracowanie warunków multiplex PCR w celu jednoczesnej identyfikacji tych genów. Przedmiotem badań było 30 polskich odmian pszenicy zwyczajnej. Wyizolowane DNA zostało poddane jednoczesnej amplifikacji ze starterami specyficznymi dla obu analizowanych genów. Wykazano, że opracowane warunki multiplex PCR umożliwiają jednoczesną identyfikację genów *Lr21* i *Pm4b*. Multiplex PCR może być wykorzystany w hodowli odpornościowej pszenicy zwyczajnej wspomaganej markerami do identyfikacji tych genów.

Słowa kluczowe: pszenica zwyczajna, multiplex PCR, mączniak prawdziwy, rdza brunatna, geny odporności

WSTĘP

Mączniak prawdziwy pszenicy, powodowany przez grzyb *Blumeria graminis* (DC.) E. O. Speer f. sp. *tritici* (syn. *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal), oraz rdza brunatna (*Puccinia recondita* Rob. ex Desm f. sp. *tritici* Eriks. et Henn.) (syn. *Puccinia triticina* Erikss) są jednymi z najgroźniejszych chorób pszenicy [Bennett 1984, Bartoš i in. 1990, Woźniak-Strzembicka i Gajda 1995, Kowalczyk i in. 1998, Kowalczyk i in. 2011]. Występują powszechnie w klimacie umiarkowanym na całym świecie [Bennett 1984, McIntosh 1998, Rosewarne i in. 2012, Buerstmayr i in. 2014]. Rdza brunatna

w wielu krajach stanowi poważne zagrożenie dla plonu. Pszenica z objawami tej choroby wykształca drobne ziarno, o mniejszej zawartości skrobi, mniejszej zdolności kiełkowania i mniejszej wartości technologicznej. W warunkach Polski spadek plonu szacuje się na 5–8%, a straty przy silnym porażeniu mogą wynosić nawet 40–50% [McIntosh i in. 1995, Huang i Gill 2001]. Porażenie mączniakiem także powoduje duże straty w plonie ziarna, które wynoszą od 13 do 34%. Do ograniczenia występowania tych chorób stosowana jest ochrona fungicydowa, jednakże metoda ta jest kosztowna i mało przyjazna dla środowiska. Najbardziej ekonomiczną i przyjazną dla środowiska, a zarazem najskuteczniejszą metodą kontrolowania i ograniczania skutków porażenia tymi patogenami jest wprowadzanie do uprawy odmian odpornych [Feuillet i Keller 1998, Mebrate i in. 2008, Rosewarne i in. 2012, Rosewarne i in. 2015].

W literaturze opisanych jest 88 genów odporności na rdzę brunatną (*Lr*). Wiele z nich zlokalizowano na określonych chromosomach z wykorzystaniem markerów molekularnych i cytologicznych [Huang i Gill 2001, Marias i in. 2008, Silva i in. 2015]. Geny *Lr21* oraz *Lr34* wykazują znaczną efektywność przeciwko większości patotypów *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Gen *Lr21* został wprowadzony do odmiany pszenicy Thatcher z *Aegilops tauschii*. Fu i in. [2010] sklonowali ten gen. Stanowi go fragment DNA o wielkości 4318 pz, zlokalizowany w dystalnej części ramienia chromosomu 1DS [Fu i in. 2010]. Huang i in. [2003] wykazali, że locus *Lr21* koduje białko NBS-LRR o wielkości 1080 aminokwasów, należące do rodziny białek bogatych w lizynę, warunkujących odporność roślin na choroby.

Dotychczas poznano ponad 77 genów odporności na mączniaka prawdziwego, wśród nich 49 loci zostało zmapowanych na chromosomach pszenicy [Yi i in. 2013, Hao i in. 2015]. W krajach europejskich w hodowli pszenicy wykorzystywanych jest dziewięć genów odporności na mączniaka (*Pm1*, *Pm2*, *Pm3c*, *Pm3d*, *Pm4b*, *Pm5*, *Pm6*, *Pm8*, *Pm9*) [Kowalczyk in. 1998, Peusha i in. 2000]. Gen *Pm4b* do pszenicy zwyczajnej wprowadzony został z *Triticum cathlicum*. Jest on zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 2A [Rong i in. 2000].

Identyfikację ważnych genów odporności w materiałach hodowlanych i odmianach umożliwiają markery molekularne. Są niezwykle przydatnym narzędziem w pracach hodowlanych, ponieważ ich zastosowanie pozwala na prowadzenie bezpośredniej selekcji korzystnych cech we wczesnych fazach rozwoju i w dość krótkim czasie. Markery molekularne znalazły zastosowanie w selekcji wspomaganiej markerami [MAS, ang. marker assisted selection]. Zastosowanie tej metody w hodowli roślin pozwala na skrócenie czasu oraz kosztów otrzymania nowej odmiany [Collard i Mackill 2008].

Jedną z technik opartych na wykorzystaniu markerów molekularnych jest multiplex PCR. Technika ta polega na równoczesnym zastosowaniu kilku par starterów w mieszaninie reakcyjnej, dzięki czemu możliwa jest identyfikacja kilku genów jednocześnie. Zastosowane w tej metodzie markery powinny być dobrane tak, aby możliwa była ich amplifikacja przy jednej temperaturze hybrydyzacji starterów do matrycowego DNA. Dzięki jednoczesnemu wykorzystaniu różnych zestawów starterów technika ta pozwala na dużą oszczędność czasu i pracy, obniżenie kosztów badań, a także zmniejsza ryzyko kontaminacji z zachowaniem wysokiej jakości wyników [Elnifro i in. 2000, Hayden i in. 2008].

Celem niniejszej pracy była jednoczesna identyfikacja genu odporności na rdzę brunatną *Puccinia triticina Lr21* i genu odporności na mączniaka prawdziwego *Blumeria graminis Pm4b* w wybranych odmianach pszenicy zwyczajnej za pomocą metody multiplex PCR.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiot badań stanowiło 30 polskich odmian pszenicy zwyczajnej *Triticum aestivum* L. (tab. 1). DNA wyizolowano z liści pięciodniowych siewek z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody CTAB [Doyle i Doyle 1987]. Stężenie i czystość preparatów DNA określono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Identyfikację genu odporności na rdzę brunatną *Lr21* przeprowadzono z wykorzystaniem starterów Lr21F oraz Lr21R o sekwencjach dostępnych na <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr21/index.html>:

Lr21F: 5'-CGC TTT TAC CGA GAT TGG TC-3'

Lr21R: 5'-TCT GGT ATC TCA CGA AGC CTT -3'.

W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 25 µl wchodziły: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8; 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (Fermentas), 0,3 mM każdego dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 5mM każdego ze starterów, 0,75 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) oraz 60 ng genomowego DNA. Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja 95°C przez 8 min, 35 cykli: 95°C – 30 s, 54°C – 1 min, 72°C – 1 min z końcową elongacją 72°C przez 7 min. Reakcję przeprowadzono z wykorzystaniem termocyklera TProfessional Basic (Biometra).

Identyfikację genu odporności na mączniaka prawdziwego *Pm4b* przeprowadzono, stosując startery Pm4F oraz Pm4R o sekwencjach podanych przez Yi i in. [2008]:

Pm4F: 5'-CTC ATT CTT GTT TTA CTT CCT TCA GT-3'

Pm4R: 5'-GTC TCG TCT TCA GCA TCC TAT ACA -3'.

W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 25 µl wchodziły: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8; 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (Fermentas), 0,2 mM każdego dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 10 pmol każdego ze starterów, 0,75 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) oraz 60 ng genomowego DNA. Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja 95°C przez 5 min, 38 cykli: 95°C – 30 s, 52°C – 30 s, 72°C – 30 s z końcową elongacją 72°C przez 7 min.

Jednoczesną identyfikację genu odporności na rdzę brunatną *Lr21* i genu odporności na mączniaka prawdziwego *Pm4b* w pszenicy zwyczajnej prowadzono, stosując równocześnie startery specyficzne dla obu tych genów. Reakcję amplifikacji przeprowadzono dla dwóch prób każdej odmiany. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 25 µl wchodziły: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8; 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (Fermentas), 0,3 mM każdego dNTP, 2,5 mM MgCl₂, po 20 pmol startera Lr21F i Lr21R, po 10 pmol startera Pm4F i Pm4R, 0,75 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) oraz 60 ng genomowego DNA.

Profil termiczny multiplex PCR składał się z wstępnej denaturacji, po której zastosowano 20 cykli z temperaturą przyłączania starterów 52°C odpowiednią dla *Pm4b*. Następnie zaprogramowano dwa cykle, w których temperatura przyłączania starterów

stopniowo wzrastała od 52°C do 53°C. Potem zaplanowano 15 cykli z temperaturą przyłączenia starterów właściwą dla *Lr21*, czyli 54°C oraz końcową elongację.

Tabela 1. Obecność genu odporności na rdzę brunatną *Lr21* oraz genu odporności na mączniaka prawdziwego *Pm4b* w badanych polskich odmianach pszenicy zwyczajnej

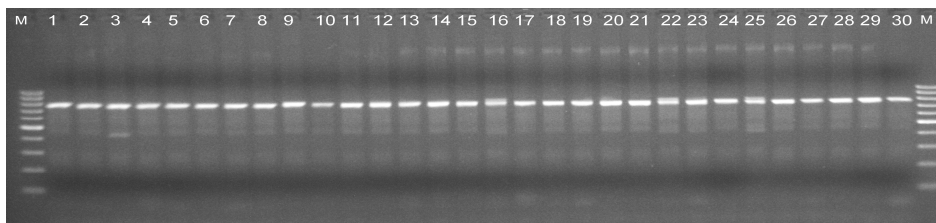
Table 1. Presence of resistance gene to leaf rust *Lr21* and resistance gene to powdery mildew *Pm4b* in analysed Polish common wheat cultivars

Lp. No.	Odmiana Cultivar	Obecność genu <i>Lr21</i> <i>Lr21</i> gene presence	Obecność genu <i>Pm4b</i> <i>Pm4b</i> gene presence
1	Naridana	+	
2	Figura	+	
3	Kohelia	+	
4	Ostroga	+	+
5	Askalon	+	+
6	Bamberka	+	+
7	Natula	+	
8	Bockris	+	
9	Astoria	+	
10	Estivus	+	
11	Praktik	+	+
12	Muszelka	+	+
13	Fidelius	+	+
14	Jantarka	+	
15	KWS Ozon	+	+
16	Forum	+	+
17	KWS Magic	+	
18	Patras	+	
19	Platin	+	+
20	Speedway	+	
21	Tulecka	+	
22	Markiza	+	
23	Forkida	+	
24	Brilliant	+	
25	Julius	+	
26	Arkadia	+	
27	Sailor	+	
28	Lavantus	+	
29	Artist	+	+
30	Baletka	+	

W celu wizualizacji wyników produkty amplifikacji rozdzielono elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym, zawierającym 0,01% bromku etydyny, w buforze $1 \times$ TBE przy napięciu 120 V przez 1,5 godziny. Po tym czasie żel przeniesiono na transiluminator (Vilber Lourmat) oraz wykonano zdjęcia za pomocą systemu dokumentacji żeli PolyDoc.

WYNIKI I DYSKUSJA

Na podstawie reakcji PCR z wykorzystaniem starterów Lr21F i Lr21R uzyskano produkty o wielkości 780 pz świadczące o obecności genu *Lr21* warunkującego odporność na rdzę brunatną. Specyficzne amplikony obserwowano we wszystkich badanych odmianach pszenicy (fot. 1, tab. 1).

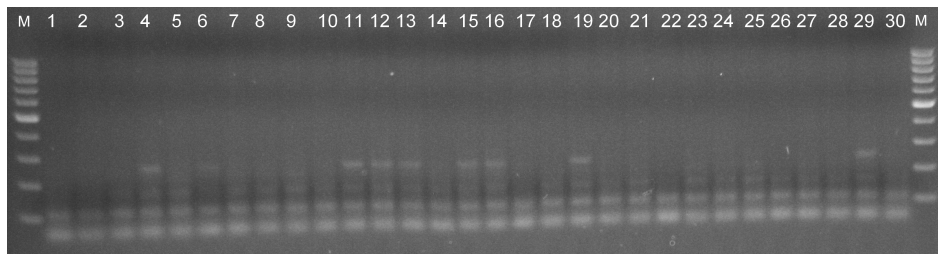


Fot. 1. Obraz elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym produktów PCR uzyskanych za pomocą starterów Lr21F i Lr21R. M – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), 1 – ‘Naridana’, 2 – ‘Figura’, 3 – ‘Kohelia’, 4 – ‘Ostroga’, 5 – ‘Askalon’, 6 – ‘Bamberka’, 7 – ‘Natula’, 8 – ‘Bockris’, 9 – ‘Astoria’, 10 – ‘Estivus’, 11 – ‘Praktik’, 12 – ‘Muszelka’, 13 – ‘Fidelius’, 14 – ‘Jantarka’, 15 – ‘KWS Ozon’, 16 – ‘Forum’, 17 – ‘KWS Magic’, 18 – ‘Patras’, 19 – ‘Platin’, 20 – ‘Speedway’, 21 – ‘Tulecka’, 22 – ‘Markiza’, 23 – ‘Forkida’, 24 – ‘Brilliant’, 25 – ‘Julius’, 26 – ‘Arkadia’, 27 – ‘Sailor’, 28 – ‘Lavantus’, 29 – ‘Artist’, 30 – ‘Baletka’

Phot. 1. PCR products separated in 2% agarose gel after Lr21F and Lr21R primers application. M – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), 1 – ‘Naridana’, 2 – ‘Figura’, 3 – ‘Kohelia’, 4 – ‘Ostroga’, 5 – ‘Askalon’, 6 – ‘Bamberka’, 7 – ‘Natula’, 8 – ‘Bockris’, 9 – ‘Astoria’, 10 – ‘Estivus’, 11 – ‘Praktik’, 12 – ‘Muszelka’, 13 – ‘Fidelius’, 14 – ‘Jantarka’, 15 – ‘KWS Ozon’, 16 – ‘Forum’, 17 – ‘KWS Magic’, 18 – ‘Patras’, 19 – ‘Platin’, 20 – ‘Speedway’, 21 – ‘Tulecka’, 22 – ‘Markiza’, 23 – ‘Forkida’, 24 – ‘Brilliant’, 25 – ‘Julius’, 26 – ‘Arkadia’, 27 – ‘Sailor’, 28 – ‘Lavantus’, 29 – ‘Artist’, 30 – ‘Baletka’

Huang i Gill [2001] w swoich pracach skupili się na mapowaniu genów odporności na rdzę brunatną przeniesionych do pszenicy z *Aegilops tauschii*. Autorzy stwierdzili obecność genu *Lr21* i *Lr40* w różnych odmianach pszenicy i dzikich populacjach *Aegilops tauschii*. Autorzy opracowali marker RFLP KSUD14 zlokalizowany w dystalnej części krótkiego ramienia chromosomu 1D. Marker ten następnie został wykorzystany przez Huang i in. [2003] do opracowania trzech nowych markerów RFLP dla genu *Lr21* KSU936, KSU937 i KSU-027BE590674. Jednak KSUD14 jest markerem położonym najbliżej genu *Lr21*, a jego odległość od tego genu wynosi 0,1 cM. Neelam i in. [2013] uzyskali marker typu KASPar, który oparty jest na wykrywaniu zmiany pojedynczego nukleotydu (SNP).

Na podstawie reakcji PCR z wykorzystaniem starterów Pm4F i Pm4R uzyskano produkty o wielkości 241 pz, świadczące o obecności genu *Pm4b* kodującego odporność na mączniaka prawdziwego. Amplikony obserwowano w próbach pochodzących z odmian pszenicy: Ostroga, Askalon, Bamberka, Praktik, Muszelka, Fidelius, KWS Ozon, Forum, Platin i Artist (fot. 2, tab. 1).



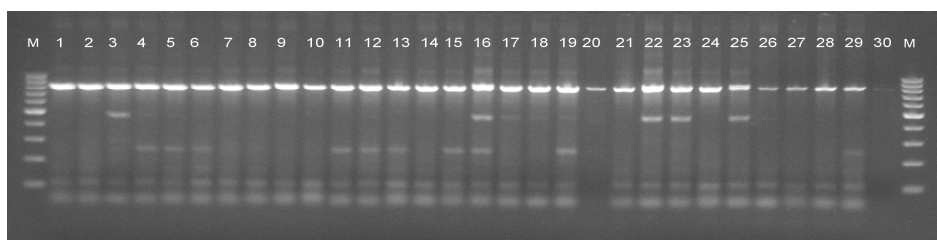
Fot. 2. Obraz elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym produktów PCR uzyskanych za pomocą starterów Pm4F i Pm4R. M – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), 1 – ‘Naridana’, 2 – ‘Figura’, 3 – ‘Kohelia’, 4 – ‘Ostroga’, 5 – ‘Askalon’, 6 – ‘Bamberka’, 7 – ‘Natula’, 8 – ‘Bockris’, 9 – ‘Astoria’, 10 – ‘Estivus’, 11 – ‘Praktik’, 12 – ‘Muszelka’, 13 – ‘Fidelius’, 14 – ‘Jantarka’, 15 – ‘KWS Ozon’, 16 – ‘Forum’, 17 – ‘KWS Magic’, 18 – ‘Patras’, 19 – ‘Platin’, 20 – ‘Speedway’, 21 – ‘Tulecka’, 22 – ‘Markiza’, 23 – ‘Forkida’, 24 – ‘Brilliant’, 25 – ‘Julius’, 26 – ‘Arkadia’, 27 – ‘Sailor’, 28 – ‘Lavantus’, 29 – ‘Artist’, 30 – ‘Baletka’

Phot. 2. PCR products separated in 2% agarose gel after Pm4F and Pm4R primers application. M – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), 1 – ‘Naridana’, 2 – ‘Figura’, 3 – ‘Kohelia’, 4 – ‘Ostroga’, 5 – ‘Askalon’, 6 – ‘Bamberka’, 7 – ‘Natula’, 8 – ‘Bockris’, 9 – ‘Astoria’, 10 – ‘Estivus’, 11 – ‘Praktik’, 12 – ‘Muszelka’, 13 – ‘Fidelius’, 14 – ‘Jantarka’, 15 – ‘KWS Ozon’, 16 – ‘Forum’, 17 – ‘KWS Magic’, 18 – ‘Patras’, 19 – ‘Platin’, 20 – ‘Speedway’, 21 – ‘Tulecka’, 22 – ‘Markiza’, 23 – ‘Forkida’, 24 – ‘Brilliant’, 25 – ‘Julius’, 26 – ‘Arkadia’, 27 – ‘Sailor’, 28 – ‘Lavantus’, 29 – ‘Artist’, 30 – ‘Baletka’

Yi i in. [2008] opracowali metodę identyfikacji genu *Pm4b* przy użyciu markera DNA. W swoich badaniach cytowani autorzy otrzymali fragment o wielkości 241 pz, na podstawie którego opracowali marker STS. Identyfikacji tego genu za pomocą izolatów *B. graminis* sp. *tritici* w polskich odmianach pszenicy dokonali także Kowalczyk i in. [1998], Wiśniewska i Kowalczyk [2005]. Badania własne oraz Kowalczyka i in. [2012] dowodzą, że marker STS₂₄₁ może być wykorzystany w pracach hodowlanych mających na celu przeniesienie genu *Pm4b* do nieodpornych odmian pszenicy.

Jednoczesną identyfikację tych genów prowadzono metodą multiplex PCR, stosując 4 startery STS: Lr21F, Lr21R, Pm4F i Pm4R. Dla odmian: Ostroga, Askalon, Bamberka, Praktik, Muszelka, Fidelius, KWS Ozon, Forum, Platin i Artist otrzymano dwa produkty PCR: jeden o wielkości 780 pz odpowiadający genowi *Lr21* i drugi o wielkości 241 pz, odpowiadający genowi *Pm4b* (fot. 3.). Dla odmian: Naridana, Figura, Kohelia, Natula, Bockris, Astoria, Estivus, Jantarka, KWS Magic, Patras, Speedway, Tulecka, Markiza, Forkida, Brilliant, Julius, Arkadia, Sailor, Lavantus, Baletka otrzymano amplikony o wielkości 780 pz, świadczące o obecności genu odporności na rdzę brunatną *Lr21* (fot. 3, tab. 1).

Metoda multiplex PCR została wykorzystana do identyfikacji w pszenicy patogenów grzybowych m.in. przez Fraaije i in. [2001]. W badaniach tych autorzy identyfikowali cztery



Fot. 3. Obraz elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym produktów multiplex PCR uzyskanych za pomocą starterów Lr21F, Lr21R, Pm4F i Pm4R. M – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), 1 – ‘Naridana’, 2 – ‘Figura’, 3 – ‘Kohelia’, 4 – ‘Ostroga’, 5 – ‘Askalon’, 6 – ‘Bamberka’, 7 – ‘Natula’, 8 – ‘Bockris’, 9 – ‘Astoria’, 10 – ‘Estivus’, 11 – ‘Praktik’, 12 – ‘Muszelka’, 13 – ‘Fidelius’, 14 – ‘Jantarka’, 15 – ‘KWS Ozon’, 16 – ‘Forum’, 17 – ‘KWS Magic’, 18 – ‘Patras’, 19 – ‘Platin’, 20 – ‘Speedway’, 21 – ‘Tulecka’, 22 – ‘Markiza’, 23 – ‘Forkida’, 24 – ‘Brilliant’, 25 – ‘Julius’, 26 – ‘Arkadia’, 27 – ‘Sailor’, 28 – ‘Lavantus’, 29 – ‘Artist’, 30 – ‘Baletka’

Phot. 3. Multiplex-PCR products separated in 2% agarose gel after Lr21F, Lr21R, Pm4F and Pm4R primers application. M – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), 1 – ‘Naridana’, 2 – ‘Figura’, 3 – ‘Kohelia’, 4 – ‘Ostroga’, 5 – ‘Askalon’, 6 – ‘Bamberka’, 7 – ‘Natula’, 8 – ‘Bockris’, 9 – ‘Astoria’, 10 – ‘Estivus’, 11 – ‘Praktik’, 12 – ‘Muszelka’, 13 – ‘Fidelius’, 14 – ‘Jantarka’, 15 – ‘KWS Ozon’, 16 – ‘Forum’, 17 – ‘KWS Magic’, 18 – ‘Patras’, 19 – ‘Platin’, 20 – ‘Speedway’, 21 – ‘Tulecka’, 22 – ‘Markiza’, 23 – ‘Forkida’, 24 – ‘Brilliant’, 25 – ‘Julius’, 26 – ‘Arkadia’, 27 – ‘Sailor’, 28 – ‘Lavantus’, 29 – ‘Artist’, 30 – ‘Baletka’

patogeny jednocześnie. Dowiedli, iż metoda multiplex PCR może być używana do identyfikacji obecności genów odporności na choroby grzybowe w pszenicy. Sumiková i Hanzalová [2010] badały geny odporności na rdzę brunatną *Lr26* i *Lr37*. Stwierdziły, że metoda multiplex PCR może być pożądanym narzędziem w identyfikacji odmian odpornych na tę chorobę. Jest to metoda szybka, która pozwala także w znaczący sposób obniżyć koszty badań. Froidmont [1998] zastosował multiplex PCR zastosowano do identyfikacji translokacji 1BL/1RS w pszenicy, która niesie ze sobą odporność na rdzę żółtą (*Yr9*), rdzę łądygi (*Sr31*), rdzę liściową (*Lr26*), mączniaka prawdziwego (*Pm8*). Autor badał ozime odmiany pszenicy, wykorzystując cztery specyficzne startery. Pierwsza para starterów odpowiadała specyficznym oligonukleotydom dla genu gluteiny o niskiej masie molekularnej (LMW – low molecular weight), znajdującym się na krótkim ramieniu chromosomu pszenicy 1B (locus: *Glu-B3*). Natomiast druga para starterów została specyficznie skonstruowana do amplifikowania sekwencji genu ω-sekaliny (locus: *SEC-1b*), znajdującego się na chromosomie żyta 1R. Przeprowadzone badania wykazały przydatność opracowanej metody multiplex PCR do wykrywania translokacji 1BL/1RS w liniach hodowlanych pszenicy z odróżnieniem heterozygot od homozygot. Multiplex PCR wykorzystano także do detekcji dodatku *Triticum aestivum* w tradycyjnym włoskim makaronie [Arlorio i in. 2003]. Badania prowadzone przez autorów dotyczyły oceny autentyczności tradycyjnego włoskiego makaronu, który według włoskiego prawa nie może zawierać więcej niż 3% dodatku *Triticum aestivum*. Odróżnienie *Triticum aestivum* od *Triticum durum* polegało na wykryciu obecności puroindoliny a i b, których brak u *Triticum durum*. Doświadczenia wykazały skuteczność zastosowanej metody do oceny autentyczności badanego makaronu. Multiplex PCR znalazł też zastosowanie w identyfikacji roślin transgeniczných [Xu i in. 2005].

WNIOSKI

1. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono obecność genu *Lr21* we wszystkich badanych odmianach pszenicy zwyczajnej oraz genu *Pm4b* w 10 badanych odmianach pszenicy zwyczajnej.

2. Badane odmiany mogą być ważnymi donorami genów odporności na rdzę brunatną oraz mączniaka prawdziwego w programach hodowlanych pszenicy.

3. Opracowane warunki multiplex PCR umożliwiają jednoczesną identyfikację genów *Lr21* i *Pm4b* i mogą być wykorzystane w hodowli odpornościowej pszenicy zwyczajnej wspomaganej markerami.

PIŚMIENNICTWO

- Arlorio M., Coisson J., Cereti E., Travaglia F., Papasso M., Martelli A., 2003. Polymerase chain reaction (PCR) of puroindoline b and ribosomal/puroindoline b multiplex PCR for the detection of common wheat (*Triticum aestivum*) in Italian pasta. *Eur. Food Res. Technol.* 216, 253–258.
- Bartoš P., Suchliková E., Hanušová R., 1990. Stem and leaf rust resistance of foreign wheat cultivars from czechoslovak state yield trials. *Genet. Šlecht.* 26(1), 1–6.
- Bennett F.G.A., 1984. Resistance to powdery mildew in wheat: a review of its use in agriculture and breeding programmes. *Plant Pathol.* 33, 279–300.
- Buerstmayr M., Matiasch L., Mascher F., Vida G., Ittu M., Robert O., Holdgate S., Flath K., Neumayer A., Buerstmayr H., 2014. Mapping of quantitative adult plant field resistance to leaf rust and stripe rust in two European winter wheat populations reveals co-location of three QTL conferring resistance to both rust pathogens. *Theor. Appl. Genet.* 127, 2011–2028.
- Collard B.C.Y., Mackill D.J., 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. Roy. Soc. B* 363, 557–572.
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Elnifro E.M., Ashshi A.M., Cooper R.J., Klapper P.E., 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(4), 559–70.
- Feuillet C., Keller B., 1998. Molecular aspects of biotic stress resistance in wheat. *Proc. of the 9th Int. Wheat Genet. Symp.*, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, Oral Presentations 1, 171–177.
- Fraaije B.A., Lovell D.J., Coelho J.M., Baldwin S., Hollomon D.W., 2001. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. *Eur. J. Plant Pathol.* 107(9), 905–917.
- Froidmont de D., 1998. A co-dominant marker for the 1BL/1RS wheat-rye translocation via multiplex PCR. *J. Cereal Sci.* 27, 229–232.
- Fu Y.B., Peterson G.W., McCallum B.D., Huang L., 2010. Population-based resequencing analysis of improved wheat germplasm at wheat leaf rust resistance locus *Lr21*. *Theor. Appl. Genet.* 121(2), 271–81.
- Hao Y., Parks R., Cowger C., Chen Z., Wang Y., Bland D., Murphy J.P., Guedira M., Brown-Guedira G., Johnson J., 2015. Molecular characterization of a new powdery mildew resistance gene *Pm54* in soft red winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 128, 465–476.
- Hayden M.J., Nguyen T.M., Waterman A., Chalmers K.J., 2008. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9, 80.

- 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.
- Huang L., Brooks S.A., Li W., Fellers J.P., Trick H.N., Gill B.S., 2003. Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics* 164(2), 655–664.
- Kowalczyk K., Gruszecka D., Nowak M., Leśniowska-Nowak J., 2011. Resistance of triticale hybrids with *Pm4b* and *Pm6* genes to powdery mildew. *Acta Biol. Cracov., ser. Botanica* 53(1), 57–62.
- 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, 225–236.
- Kowalczyk K., Okoń S., Nowak M., Leśniowska-Nowak J., 2012. Using of DNA markers for selection of common wheat in Polish breeding programmes. *EWAC Newsletter, Proc. of the 15th Int. EWAC Conf., Novi Sad, Serbia*, 59–62.
- Marais G.F., McCallum B., Marais A.S., 2008. Wheat leaf rust resistance gene *Lr59* derived from *Aegilops peregrina*. *Plant Breed.* 127, 340–345.
- McIntosh R.A., 1998. Breeding wheat for resistance to biotic stresses. *Euphytica* 100, 19–34.
- McIntosh R.A., Wellings C.R. Park R.F., 1995. *Wheat rusts an atlas of resistance genes*. CSIRO, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Mebrate S.A., Oerke E.C., Dehne H.W., Pillen K., 2008. Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers. *Euphytica* 162(3), 457–466.
- Neelam K., Brown-Guedira G., Huang Li., 2013. Development and validation of a breeder-friendly KASPar marker for wheat leaf rust resistance locus *Lr21*. *Mol. Breed.* 31(1), 233–237.
- Peusha H., Enno T., Priilinn O., 2000. Chromosomal location of powdery mildew resistance genes and cytogenetic analysis of meiosis in common wheat cultivar Meri. *Hereditas* 132(1), 29–34.
- Rong J.K., Millet E., Manisterski J., Feldman M., 2000. A new powdery mildew resistance gene: Introgression from wild emmer into common wheat and RFLP-based mapping. *Euphytica* 115, 121–126.
- Rosewarne G.M., Li Z.F., Singh R.P., Yang E.N., Herrera-Foessel S.A. Huerta-Espino J., 2015. Different QTLs are associated with leaf rust resistance in wheat between China and Mexico. *Mol. Breed.* 35, 127–138.
- Rosewarne G.M., Singh R.P., Huerta-Espino J., Herrera-Foessel S.A., Forrest K.L., Hayden M.J., Rebetzke G.J., 2012. Analysis of leaf and stripe rust severities reveals pathotype changes and multiple minor QTLs associated with resistance in an Avocet × Pastor wheat population. *Theor. Appl. Genet.* 124, 1283–1294.
- Silva P., Calvo-Salazar V., Condon F., Quincke M., Pritsch C., Gutiérrez L., Castro A., Herrera-Foessel S., von Zitzewitz J., Germán S., 2015. Effects and interactions of genes *Lr34*, *Lr68* and *Sr2* on wheat leaf rust adult plant resistance in Uruguay. *Euphytica* 204, 599–608.
- Sumíková T., Hanzalová A., 2010. Multiplex PCR assay to detect rust resistance genes *Lr26* and *Lr37* in wheat. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 46 (2), 85–89.
- Wiśniewska H., Kowalczyk K., 2005. Resistance of cultivars and breeding lines of spring wheat of *Fusarium culmorum* and powdery mildew. *J. Appl. Genet.* 46(1), 35–40.
- Woźniak-Strzembicka A., Gajda Z., 1995. Struktura populacji rdzy brunatnej pszenicy (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) w Polsce. *Biul. IHAR* 194, 183–187.
- Xu L., Ensor V., Gossain S., Nye K., Hawkey P., 2005. Rapid and simple detection of bla CTX-M genes by multiplex PCR assay. *J. Med. Microbiol.* 54, 1183–1187.
- Yi Y., Li R., Xu H., Wu H., Li S., Zhang J., Yin Y., 2013. Identification of SRAP and RGA markers linked to powdery mildew (*Blumeria graminis*) resistance gene *PmZB90* in common wheat. *AJCS* 7(3), 454–459.

Yi Y.J., Liu H.Y., Huang X.Q., Wang F., Wang X.L., 2008. Development of molecular markers linked to the wheat powdery mildew resistance gene *Pm4b* and marker validation for molecular breeding. *Plant Breed.* 127, 116–120.

Summary. Leaf rust caused by *Puccinia triticina* and powdery mildew *Blumeria graminis* are considered to be one of the most significant diseases of common wheat (*Triticum aestivum* L.). The most efficient method of these diseases control and their effects limitation is breeding and cultivation of cultivars characterized by resistance to these pathogens. The aims of presented study were identification of leaf rust – *Lr21* and powdery mildew – *Pm4b* resistance genes in Polish wheat cultivars, as well as development of multiplex PCR useful for simultaneous identification of these genes. The plant material of present studies were 30 Polish common wheat cultivars. Extracted DNA was amplified using in single reaction primers specific for both analysed genes. On the basis of the conducted research it was shown that the developed multiplex PCR is a technique useful for simultaneous identification of *Lr21* and *Pm4b* genes. Multiplex PCR could be used in resistance breeding of common wheat supported by molecular markers for identification of these genes.

Key words: common wheat, multiplex PCR, powdery mildew, leaf rust, resistance genes