

Diss. ETH Nr. 10957

**Identification and localization of molecular markers linked to leaf
rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.)**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
GABRIELE SCHACHERMAYR
Dipl. Ing. Universität für Bodenkultur, Wien
born May 15, 1964

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Klaus Apel, examiner
Dr. Beat Keller, co-examiner

Zürich 1994

I. Summary

The objective of this study was to identify molecular markers linked to leaf rust (*Lr*) resistance genes in wheat. Near-isogenic lines (NILs) for *Lr9*, *Lr24* and *Lr1* conferring leaf rust resistance at the seedling stage were screened for polymorphisms at the DNA level. *Lr9* is derived from *Aegilops umbellulata*, *Lr24* from *Agropyron elongatum* and *Lr1* from hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). RAPD (random amplified polymorphic DNA) as well as RFLP (restriction fragment length polymorphism) markers were used. The *Lr1* NILs were screened with 998 random primers. Thirty-nine primers detecting polymorphisms were tested for linkage with the *Lr1* resistance gene on a subset of two different mapping populations. None of the polymorphic fragments amplified in the resistant NIL was segregating with the resistance gene. Three RAPD and one RFLP marker showed complete linkage with the *Lr9* resistance gene in a segregating F₂ population. A second RFLP marker, known to map to the distal part of chromosome 6BL, was closely linked (8 ± 2.4 cM) to *Lr9*. Thus, the *Lr9* resistance gene maps to the distal region of 6BL. All three PCR markers detected the *Lr9* gene in independently derived breeding lines and varieties, thus proving its general applicability. For the *Lr24* resistance gene the screening of the NILs resulted in six polymorphic RFLP markers. Linkage analysis on a segregating F₂ population showed complete linkage of the RFLP markers to *Lr24*: one was inherited as a codominant marker, one was in coupling phase and four were in repulsion phase. Distorted genotypic segregation was found for the codominant RFLP marker. This can be explained by the occurrence of hemizygous plants. In addition, one RAPD marker showed complete linkage to the *Lr24* gene. Analysis of six additional lines containing *Lr24* revealed that three lines have a smaller chromosomal segment of *Agropyron elongatum*. Only the most distal RFLP marker on chromosome 3DL detected the *Lr24* gene in all six lines. For both resistance genes, *Lr9* and *Lr24*, one of the completely linked polymorphic RAPD fragments was cloned, sequenced and specific primers were synthesized. They produced an amplification product only in the resistant plants. These specific markers (sequence tagged sites, STS) allow a rapid screening of a large number of genotypes and provide a necessary tool for the breeders to efficiently select genotypes that combine both resistance genes.

II. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung molekularer Marker für die Braunrost-resistenzgene *Lr24*, *Lr9* und *Lr1*. Nahe isogene Linien (NILs) wurden mit RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) und RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) Markern auf molekulare Unterschiede untersucht. Die Resistenzgene *Lr9* und *Lr24* stammen aus den Wildgräsern *Aegilops umbellulata* und *Agropyron elongatum*, während das Resistenzgen *Lr1* zuerst in einer hexaploiden Weizensorte (*Triticum aestivum L.*) beschrieben wurde. Die NILs für das Resistenzgen *Lr1* wurden mit 998 Primern untersucht. Neununddreissig polymorphe RAPD Marker wurden an einer Auswahl von F_2 Pflanzen auf Kopplung zum Resistenzgen getestet. Keine der polymorphen RAPD Banden war mit dem *Lr1* Resistenzgen gekoppelt. Drei RAPD Marker und ein RFLP Marker zeigten vollständige Kopplung zum *Lr9* Resistenzgen. Die Kopplungsanalyse wurde an einer für das Resistenzgen spaltenden F_2 Population durchgeführt. Ein weiterer RFLP Marker war eng gekoppelt mit *Lr9* (8 ± 2.4 cM). Dieser Marker wurde im distalen Bereich des langen Arms von Chromosom 6B kartiert. Mit jedem der drei auf der Polymerase Kettenreaktion (PCR) basierenden Marker konnte das Resistenzgen *Lr9* in unabhängig voneinander entwickelten Sorten und Linien nachgewiesen werden. Aus dem Vergleich der NILs für das Resistenzgen *Lr24* resultierten 6 polymorphe RFLP Marker. Die Kopplungsanalyse in einer spaltenden F_2 Population ergab vollständige Kopplung mit *Lr24*. Ein Marker wurde kodominant vererbt, einer in Kopplung und vier in Repulsion zum untersuchten Merkmal. Zusätzlich zeigte ein RAPD Marker vollständige Kopplung zum Resistenzgen *Lr24*. Mit dem kodominanten Marker wurde ein abweichendes genotypisches Spaltungsverhältnis festgestellt. Dies lässt sich durch das Auftreten von hemizygoten Pflanzen erklären. Die Untersuchung von sechs zusätzlichen Linien mit dem *Lr24* Resistenzgen zeigte, dass drei davon eine kleinere *Agropyron elongatum* Translokation besitzen. Nur ein RFLP Marker am distalen Ende von Chromosom 3DL identifizierte *Lr24* in allen sechs Linien. Für die beiden Resistenzgene *Lr9* und *Lr24* wurde eine der vollständig gekoppelten, polymorphen RAPD Banden kloniert und sequenziert, um spezifische Primer zu synthetisieren. Mit den spezifischen Primern wurde nur in den resistenten Pflanzen eine einzelne Bande amplifiziert. Diese spezifischen Marker

(sequence tagged site, STS) erlauben die effiziente Untersuchung von grossen Pflanzenzahlen. Mit den STS Markern für *Lr9* und *Lr24* stehen der praktischen Weizenzüchtung neue Möglichkeiten zur effizienten Kombination von Baunrostresistenzgenen in einem Genotyp zur Verfügung.