Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
Zakład Struktury i Funkcji Genów

Waldemar Ulaszewski

Transfer chromatyny *Aegilops kotschyi* Boiss., zawierającej geny warunkujące odporność na rdzę brunatną i żółtą, do pszenżyta ozimego (× *Triticosecale* Wittm.)

Rozprawa doktorska
wykonana pod kierunkiem
Prof. UPP dr hab. Michała Kwiatka

Poznań 2021

Składam serdeczne podziękowania:
Panu dr hab. Michałowi Kwiatkowi
za przekazaną wiedzę, cenne uwagi, życzliwość, poświęcony czas
oraz pomoc przy realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Współautorom publikacji za owocną współpracę.

Promotor:

Prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Niniejsza praca doktorska została zrealizowana w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu w latach 2018-2021 podczas studiów doktoranckich realizowanych na Środowiskowym Studium Doktoranckim przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu oraz Międzynarodowych Studiów Doktoranckich IGR PAN.

Badania wykonano w ramach projektu LIDER VIII, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. (*LIDER*, nr 3/0004/L-8/16/NCBR/2017; kierownik Michał Kwiatek).

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem. Stwierdzam, że praca spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

dr hab. Michał Kwiatek

Data: 19 maja 2021 r. ..... KIEROWNIK PROJEKTU LIDER/3/0004/L-8/16/NCBR/2017 .....

Podpis promotora

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt. „Transfer chromatyny *Aegilops kotschyi* Boiss., zawierającej geny warunkujące odporność na rdzę brunatną i żółtą, do pszenżyta ozimego (× *Triticosecale* Wittm.)" została napisana przeze mnie samodzielnie pod kierunkiem promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam też, że niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data: 17.05.2021 ..... Waldemar Maszewski .....

Podpis autora rozprawy

Forma rozprawy doktorskiej została przygotowana zgodnie z wytycznymi zawartymi w „Regulaminie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora, doktora habilitowanego i tytułu profesora w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, Tryb II" (Załącznik do Uchwały Nr 5K/2019 Rady Naukowej IGR PAN z dnia 30 września 2019 r.)

Wyniki badań uzyskane podczas realizacji rozprawy doktorskiej zostały przedstawione w trzech publikacjach:

1. Waldemar Ulaszewski, Michał T. Kwiatek (2020), ***Aegilops*** **Species for the Improvement of the Leaf and Stripe Rust Resistance in Cultivated Triticale (×*Triticosecale* Wittmack)**. *Agronomy* 10(12), 1991., doi: https://doi.org/10.3390/agronomy10121991
2. Michał T. Kwiatek, Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Dylan Phillips, Roksana Skowrońska, Aleksandra Noweiska, Halina Wiśniewska (2020). **Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^{k} Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss**:, Frontiers in Plant Science, doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481
3. Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Halina Wiśniewska, Joanna Szymczak, Roksana Skowrońska, Dylan Phillips, Michał T. Kwiatek (2019). **Recovery of 2R.2Sk Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations.** Agronomy, 9(10), 646, doi: https://doi.org/10.3390/agronomy9100646

Każda z wymienionych powyżej publikacji zawiera odrębny wstęp, opis materiału roślinnego, zastosowanych metod badawczych, uzyskanych wyników oraz dyskusję i wnioski. W niniejszym podsumowaniu zostały zamieszczone najważniejsze wyniki każdej z publikacji oraz podsumowanie i wnioski przedstawione łącznie dla wymienionych prac.

Spis treści

Wykaz zastosowanych skrótów: 8
1. Streszczenie 10
2. Summary 11
3. Wstęp 12
3.1. Charakterystyka pszenżyta uprawnego 12
3.2 Rdza żółta i rdza brunatna pszenżyta 14
3.3 Hodowla linii introgresywnych 15
3.4 Kozieńce jako źródło genów odporności na rdzę 20
5. Hipotezy badawcze oraz cel pracy 21
6. Materiał roślinny 22
7. Najważniejsze wyniki 23
7.1 Wykorzystanie kozieńców w podnoszeniu odporności pszenżyta uprawnego na rdzę brunatną i żółtą (Publikacja nr 1) 23
7.2 Analiza monosomicznych linii substytucyjnych $2S^k(2R)$ (Publikacja nr 2) 23
7.2.1 Selekcja monosomicznych roślin addycyjnych $2S^k$, wywodzących się ze sztucznych amfiploidów pszenżyto-*Aegilops kotschyi*. 23
7.2.2 Otrzymywanie monosomicznych roślin substytucyjnych $2S^k(2R)$, wywodzących się ze sztucznych amfiploidów pszenżyto-*Aegilops kotschyi*. 24
7.2.3 Analiza molekularna za pomocą markerów SSR loci *Lr54* + *Yr37* 24
7.2.4 Ewaluacja odporności linii substytucyjnej na rdzę brunatną i żółtą. 24
7.3 Otrzymywanie linii translokacyjnych (Publikacja nr 3) 25
7.3.1 Segregacja chromosomów u pszenżyta 40 + $M2S^k$ + M2R 25
7.3.2 Segregacja chromosomów u pszenżyta 40 + $M2S^k$ + M2RS + M2RL 26
7.3.3 Analiza molekularna za pomocą markerów SSR loci *Lr54* + *Yr37* 26
8. Podsumowanie i wnioski: 28
9. Spis literatury 30
10. Publikacja nr 1 35
10.1 Tekst publikacji 35
10.2 Oświadczenia współautorów 44
11. Publikacja nr 2 47
11.1 Tekst publikacji 47

11.2 Oświadczenia współautorów 62
12. Publikacja nr 3: 70
12.1 Tekst publikacji 70
12.2 Oświadczenia współautorów 83

Wykaz zastosowanych skrótów:

1n (n) – haploidalna liczba chromosomów

2n – diploidalna liczba chromosomów

2R– chromosom 2R pszenżyta

2S^{k} – chromosom 2S *Aegilops kotschyi* Boiss.

2S^{k}(2R) – substytucyjna linia pszenżyta z chromosomem 2S^{k} zastępującym jeden z chromosomów 2R

2S^{k}L – długie ramię chromosomu 2S^{k}

2S^{k}S – krótkie ramię chromosomu 2S^{k}

Ae. kotschyi– *Aegilops kotschyi* Boiss.

Ae. ovata – *Aegilops ovata* Roth.

BC – krzyżowanie wsteczne (ang. backcross)

DH – podwojony haploid (ang. Double haploid)

Dt2RS i Dt2RL – ditelosomiczna linia pszenżyta 2RS i 2RS

FISH – fluoroscencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. Fluorescence *in situ* hybridization)

Gc – gen gametocydalny

GISH – genomowa hybrydyzacja *in situ* (ang. Genomic *in situ* hybridization)

Kr – gen krzyżowalności

Lr54 – gen odporności na rdzę brunatną

M2R – monosomiczna linia pszenżyta pod względem chromosomu 2R

M2RL –długie ramię chromosomu 2S w postaci monosomicznej

M2RS –krótkie ramię chromosomu 2R w postaci monosomicznej

M2S^{k} – monosomiczna linia pszenżyta pod względem chromosomu 2S^{k}

M2S^{k}(M2R) – substytucyjna linia pszenżyta z chromosomem 2S^{k} zastępującym jeden z chromosomów 2R

M2S^{k}S – krótkie ramię chromosomu 2S^{k} w postaci monosomicznej

M2S^{k}L –długie ramię chromosomu 2S^{k} w postaci monosomicznej

MA2S^{k} – monosomiczna addycyjna linia pszenżyta z dodatkowym chromosomem 2S^{k}

N2R – linia nullisomiczna pszenżyta pod względem pary chromosomów 2R

Ph – gen *Ph* (ang. Pairing homeologous)

PHT – pierwszorzędowe heksaploidalne pszenżyto

RobT – translokacja robertsonowska

SHT – drugorzędowe heksaploidalne pszenżyto (ang. *Secondary Hexaploid Triticale*)

T – translokacja

T2DS.2S^{k}L – translokacja robertsonowska długiego ramienia chromosomu 2S *Aegilops kotschyi* Boiss. w chromosomie 2D pszenicy

T2R.2S^{k} – translokacja robertsonowska długiego ramienia chromosomu 2S *Aegilops kotschyi* Boiss. w chromosomie 2R pszenżyta

T2RS.2S^{k}L – translokacja robertsonowska długiego ramienia chromosomu 2S *Aegilops kotschyi* Boiss. w chromosomie 2R pszenżyta.

T2S^{k}S.2RL – translokacja robertsonowska krótkiego ramienia chromosomu 2S *Aegilops kotschyi* Boiss. w chromosomie 2R pszenżyta

x – genomowa liczba chromosomów

Yr37 – gen odporności na rdzę żółtą

1. Streszczenie

Zboża towarzyszyły człowiekowi nieprzerwanie od czasu przejścia ludzkości od gospodarki łowiecko-zbierackiej do rolnictwa. Pula genetyczna uprawnych gatunków zbóż została jednak zawężona na przestrzeni tysięcy lat udomawiania i hodowli. Wobec powyższego, dzikie gatunki spokrewnione z pszenicą uprawną (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, AABBDD) są cennym źródłem genów oraz ich alleli w procesie hodowli pszenicy, a także pszenżyta (×*Triticosecale* Wittmack, $2n = 6x = 42$, AABBRR). Linie introgresywne uprawnych gatunków zbóż, obejmujące linie addycyjne i substytucyjne, stały się cennym narzędziem inżynierii chromosomowej, pozwalającym na wzbogacenie zmienności genetycznej uprawnych gatunków zbóż poprzez wprowadzanie genów pochodzących od gatunków blisko spokrewnionych.

Ciągła ewolucja nowych ras grzybów patogenicznych *Puccinia triticina* Eriks. oraz *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Westend., wywołujących odpowiednio rdzę brunatną oraz rdzę żółtą, jest czynnikiem powodującym spadek globalnej produkcji pszenżyta. Wiele istotnych genów, pochodzących od dzikich spokrewnionych gatunków, a warunkujących odporność na rdzę brunatną i żółtą, zostało już wprowadzonych do genomu pszenicy uprawnej. Proces wprowadzenia obcych genów przeprowadzano poprzez manipulacje chromosomowe, prowadzące do integracji w genomie pszenicy obcej chromatyny, niosącej pożądane geny.

Głównym celem niniejszej pracy było wprowadzenie segmentu chromatyny pochodzącej z chromosomu $2S^k$ *Aegilops kotschyi* Boiss., obejmującej *loci* dwóch istotnych genów odporności na rdzę brunatną oraz rdzę żółtą (odpowiednio *Lr54* oraz *Yr37*) do chromosomu 2R pszenżyta ozimego odmiany Sekundo. Linia substytucyjna $2S^k$(2R) została wyprowadzona poprzez skrzyżowanie linii nullisomicznej 2R (N2R, $2n = 40$) z addycyjną linią pszenżyta (MA$2S^k$; $2n = 43$). Translokacja $2S^k$.2R została uzyskana poprzez skrzyżowanie substytucyjnej linii pszenżyta $2S^k$(2R) z linią ditelosomiczną Dt2RS i Dt2RL (pozyskaną z kolekcji Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu), w której długie i krótkie ramiona chromosomów 2R występowały w postaci telosomicznej. Rośliny z introgresją chromatyny *Ae. kotschyi* wykazywały w testach inokulacyjnych podwyższoną odporność na rdzę brunatną (wywołaną przez patogeniczny grzyb *P. triticina*) w porównaniu do roślin z grupy kontrolnej.

2. Summary

While cereals have continuously accompanied man since the rise of early agriculture, as a crucial source of nutrients, the gene pool of cultivated species of cereals has been narrowed throughout to thousands years of cultivation and domestication. Thus, the wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L., 2*n* = 6*x* = 42, AABBDD) are potential sources of genes and their alleles for bread wheat and triticale (×*Triticosecale* Wittmack, 2*n* = 6*x* = 42, AABBRR). Over the recent years, introgression lines of cultivated cereals, encompassing both addition and substitution lines, have become valuable tools for chromosome engineering, allowing the enrichment of the genetic variability of cultivated cereal species by introducing genes, from closely related wild taxa, into the genomes of widely cultivated species.

The continuous evolution of new races of pathogenic fungi *Puccinia triticina* Eriks. and *Puccinia striiformis* f. sp. tritici Westend., causing respectively brown and yellow rusts, is a factor causing a significant decline in global triticale production. Several important genes for resistance to leaf rust and yellow rust have already been introduced into the bread wheat genome by chromosome manipulations, leading to integration of an alien chromatin fragment, carrying desirable genes, into the genome of wheat.

The main goal of this study was to induce the same effect on the 2R chromosome of winter triticale and introduce there, by means of a Robertsonian translocation, the long arm of the $2S^k$ chromosome. The arm, originating from the non-cultivated species of goatgrass - (*Aegilops kotschyi* Boiss), carried two valuable genes of resistance to leaf rust and stripe rust – *Lr54* and *Yr37*, respectively. The substitution line was derived by crossing the nullisomic line 2R (N2R, 2n = 40) with the monosomic addition line of triticale ($MA2S^k$; 2n = 43). Chromosome translocation was obtained by crossing the substitution line of triticale $2S^k$(2R) with ditelosomic line Dt2RS and Dt2RL (derived from Institute of Plant Genetics PAS Poznan), in which the long and short arms of the 2R chromosomes were in telosomic condition. Introgression plant carrying the chromatin of *Ae. kotschyi* revealed high level of leaf rust resistance, comparing to control samples.

3. Wstęp

3.1. Charakterystyka pszenżyta uprawnego

Heksaploidalne pszenżyto (×*Triticosecale* Wittmack, 2*n* = 6*x* = 42, AABBRR) jest otrzymanym przez człowieka zbożem zaliczanym do plemienia *Triticeae.* Pszenżyto uzyskano poprzez skrzyżowanie pszenicy (*Triticum* sp.), jako komponentu żeńskiego, z żytem (*Secale cereale* L.) w charakterze zapylacza. Łączy ono w sobie cechy jakościowe i wysoki potencjał plonowania pszenicy ze zdolnościami adaptacyjnymi żyta, zawierając w swoim genomie korzystne allele obu gatunków rodzicielskich. Zboże to jest heksaploidalnym allopoliploidem, o genomie składającym się z trzech subgenomów: pochodzących z pszenicy A i B oraz żytniego subgenomu R (Mergoum i in., 2009).

Pierwsza próba otrzymania pszenżyta miała miejsce w 1875 roku w Szkocji. Jej rezultatem były sterylne rośliny (Stace, 1987). Pierwsze płodne rośliny mieszańcowe otrzymał Wilhelm Rimpau w Niemczech, w 1888 roku poprzez skrzyżowanie heksaploidalnej pszenicy z żytem oraz spontaniczne podwojenie zestawu chromosomów sterylnych mieszańców (Mergoum i in., 2009). W latach pięćdziesiątych XX w., na Węgrzech, Arpad Kiss odkrył, że heksaploidalne formy pszenżyta bardziej nadają się do użytku rolniczego niż ich oktoploidalne odpowiedniki (AABBDDRR; Bona Lajos, 2016). Kiss sformułował następujące określenia: „pierwszorzędowe heksaploidalne pszenżyto" PHT (Primary Hexaploid Triticale) oraz „drugorzędowe heksaploidalne pszenżyto" SHT (Secondary Hexaploid Triticale), w celu rozróżnienia linii wywodzących się z różnych kombinacji krzyżowań. W zakres PHT wchodzą heksaploidalne oraz oktoploidalne linie pszenżyta, otrzymane przez skrzyżowanie 4x pszenicy z 2x żytem lub 6x pszenicy z 2x żytem, gdzie genomy A i B pochodzą z tetraploidalnej (AABB) i heksaploidalnej (AABBDD) pszenicy. Zakres SHT obejmuje heksaploidalne linie pszenżyta otrzymane przez skrzyżowanie 8x pszenżyta z 6x pszenżytem, gdzie genomy A i B wywodzą się z tetraploidalnej i heksaploidalnej pszenicy. Do roku 1970 Kiss otrzymał ponad dziesięć drugorzędowych linii heksaploidalnego pszenżyta (Bona Lajos, 2016; Lorenz i Pomeranz, 1974; Ulaszewski i Kwiatek, 2020). Pierwotne formy pszenżyta charakteryzowały się obniżoną płodnością oraz pomarszczonymi ziarniakami. Jednak wieloletnie programy hodowlane z powodzeniem wyeliminowały te ograniczenia. Pierwsze komercyjne odmiany tego zboża („T-No.57" oraz „T-No.6") pojawiły się na rynku w latach 60. XX wieku. W późniejszych latach, pszenżyto stało się na glebach marginalnych tak samo konkurencyjne jak żyto (Bona Lajos, 2016; Hills i in., 2007). W maju 1969 r. odmiany "Rosner" heksaploidalnego pszenżyta została

zarejestrowana w Kanadzie jako nowe zboże uprawne (Lorenz i Pomeranz, 1974). Sukcesy Kissa w udoskonalaniu pszenżyta zmotywowały naukowców z Europy Środkowej do prac zmierzających w kierunku dalszego udoskonalania tego zboża (Zillinsky, 1974). W Polsce badania nad pszenżytem rozpoczęto w latach sześćdziesiątych XX wieku. W 1982 roku, zarejestrowano w Polsce pierwszą odmianę pszenżyta o korzystnej kombinacji parametrów użytkowych - odmianę "Lasko". W późniejszych latach, odmianę tę zaczęto uprawiać w innych krajach (Wolski i Tymieniecka, 1983).

Pszenżyto jest jedną z niewielu sztucznie otrzymanych roślin, uprawianych na szeroką skalę. Globalna powierzchnia upraw tego zboża zwiększa się na przestrzeni dekad (2,101,405 ha w 1996; 3,662,363 ha w 2006 oraz 3,809,192 ha w 2018; *FAOSTAT*). Jedną z istotnych przyczyn, jest relatywnie wysoka zawartość białka w ziarniakach, wahająca się w zakresie 12-22%. Eksperymenty z udziałem zwierząt hodowlanych wykazały również, że pszenżyto jest bardziej strawne w porównaniu z pszenicą i żytem (Lorenz i Pomeranz, 1974). Podobnie, eksperymenty z udziałem ludzi pokazały wyższą przyswajalność białek z pszenżyta (Lorenz i Pomeranz, 1974). Ziarno pszenżyta wykorzystywane jest głównie w produkcji pasz. Jednakże ostateczne przeznaczenie tego zboża zależy od cech charakterystycznych danej odmiany i jest w dużym stopniu zdeterminowane przez biochemiczny skład roślin, który bardziej zbliżony jest do pszenicy niż żyta i wynika z proporcji subgenomów rodzicielskich. Ziarno pszenżyta ma zatem podobną wartość odżywczą do ziarna pszenicy, ale charakteryzuje się wyższą zawartością lizyny (Glamoclija i in., 2018).

Pochodzenie poszczególnych odmian pszenżyta wpływa na ich przeznaczenie (McGoverin i in., 2011). Odmiany o dużych i jednorodnych ziarniakach, zawierające więcej białka niż skrobi, wykorzystywane są do produkcji pasz treściwych dla drobiu, przeżuwaczy oraz zwierząt monogastrycznych. Odmiany tworzące duże ilości biomasy, tak jak żyto, są wypasane lub zbierane na kiszonkę, zielonkę i siano (Glamoclija i in., 2018). Od samego początku użytkowania tego zboża, pszenżyto wykorzystywane jest do skarmiania zwierząt gospodarskich, jednakże jego potencjał nie został jeszcze wykorzystany w pełni. Zboże to znajduje ostatnio zastosowanie w przemyśle żywieniowym, szczególnie piekarniczym (Pattison i Trethowan, 2013) i browarniczym (Rakha i in., 2011). Pszenżyto stanowi też surowiec w produkcji bioetanolu (Meale i McAllister, 2015) oraz biopaliwa (McGoverin i in., 2011).

Pszenżyto przez długi czas, z racji swojego mieszańcowego charakteru, było odporne na choroby wywoływane przez większość patogenów zbóż. W pewnym momencie, wskutek ciągle zwiększającego się areału zasiewów tego zboża, nastąpiło załamanie tej odporności. Obecnie pszenżyto jest narażone na ekspansję patogenów, których pierwotnymi żywicielami były pszenica i żyto. Pierwszą chorobą, która pojawiła się na tym zbożu w skali epidemicznej w Australii (Arseniuk, 1996) była rdza źdźbłowa, wywoływana przez patogeniczny grzyb *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Następnie pszenżyto zaczęło być porażane przez rdzę brunatną i rdzę żółtą, wywoływane odpowiednio przez *Puccinia triticina* Eriks f. sp. *tritici*, (syn. *P. recondita f. sp. tritici*) oraz *P. striiformis* f. sp. *tritici* Westend, na całym obszarze uprawy tego zboża (Arseniuk, 1996).

3.2 Rdza żółta i rdza brunatna pszenżyta

Rdzowce (*Pucciniales)* to rząd biotroficznych grzybów należący do klasy rdzy (*Pucciniomycetes*), pasożytujących na przedstawicielach wszystkich grup roślin naczyniowych. Grzyby te powodują poważne straty w plonach różnych roślin uprawnych na całym świecie. Przypuszcza się, że rdzowce równolegle ewoluowały wraz ze swoimi roślinnymi gospodarzami, względem których poszczególne gatunki/*formae speciales* wykazują specyficzność (Lorrain i in., 2019). Choroby wywoływane przez *Puccinia* sp. to rdze, nazwane tak ze względu na pomarańczowo-brązowo-czerwone skupiska owocników, pojawiające się na powierzchni roślin w jednym lub więcej stadium rozwojowym rdzowców. Na przestrzeni tysiącleci patogeniczne grzyby powodowały rdzę zbóż na skalę epidemiczną, będąc jednym z istotnych czynników ograniczających rozwój cywilizacji (Park i Wellings, 2011). Z powodu biotroficznego charakteru rdzowców (całkowitej zależności od dostępności żywych tkanek roślinnego gospodarza), a co za tym idzie braku możliwości hodowli na sztucznych pożywkach, wiele aspektów biologii tych grzybów pozostaje niejasnych (Lorrain i in., 2019). W środowisku naturalnym dla *P. triticina* i *P. striiformis*, poszczególne populacje tych grzybów obejmują wiele ras (patotypów) o różnym stopniu wirulencji. Zarówno możliwość rozprzestrzeniania zarodników przez wiatr, jak i skłonność do zwiększania różnorodności genetycznej przez mutacje i selekcje są czynnikami umożliwiającymi rdzowcom szybkie rozwinięcie wirulencji przeciwko konkretnym odmianom pszenżyta o określonym zestawie głównych genów (R) odporności na rdzę powodowaną przez najbardziej rozpowszechnione rasy *P. triticina* i *P. striiformis* w danym regionie (Prasad i in., 2020; Schwessinger i in., 2020).

Wraz z rozwojem upraw i poszerzeniem areału zasiewów pszenżyta, patogeny wyewoluowały, przystosowując się do nowego żywiciela. Pojawiły się nowe rasy *Puccinia,* niosące nowe geny wirulencji. Nowe patotypy grzyba, uprzednio wyspecjalizowane do bytowania na pszenicy i życie, istotnie poszerzyły zakres roślinnych gospodarzy, kolonizując pszenżyto (Arseniuk, 1996). Zarówno rdza żółta, jak i brunatna, powodują poważne straty ekonomiczne poprzez obniżenie plonu nawet o 40% (Arseniuk i Góral, 2015). Trwa zatem pilna i uzasadniona potrzeba przezwyciężenia tego problemu oraz ciągłego zwiększania odporności na wymienione choroby z wykorzystaniem wszystkich dostępnych nauce i hodowli narzędzi (Tang i in., 2018).

3.3 Hodowla linii introgresywnych

Istnieje wiele sposobów ograniczania negatywnych skutków oddziaływania patogenów na organizmy roślinnych gospodarzy. Jednym z nich jest zwiększenie genetycznej różnorodności roślin uprawnych poprzez wprowadzenie genów odporności z dzikich, pokrewnych gatunków wykorzystując krzyżowania oddalone. Krzyżowanie oddalone przeprowadza się ręcznie na zasadzie kastracji kłosów z pylników oraz zapyleniu ich pyłkiem rośliny spokrewnionej w warunkach szklarniowych. Wynik krzyżowania zależy od wielu czynników takich jak gatunek, odmiana lub genotyp, do którego mają zostać wprowadzone określone geny (Hills i in., 2007). Możliwość otrzymania płodnego potomstwa pomiędzy gatunkami ograniczona jest przez szereg barier prezygotycznych i postzygotycznych oraz przez potencjalnie złożony charakter interakcji (Widmer i in., 2009).

Do barier prezygotycznych można zaliczyć między innymi izolację geograficzną, rozbieżny czas kwitnienia, różnice w anatomii kwiatów (np. kształt lub kolor płatków; Lowry i in, 2008.; Tonosaki i in., 2016). Zarówno u pszenicy jak i pszenżyta, istnieje prezygotyczny mechanizm zmniejszający efektywność krzyżowania tych zbóż z gatunkami spokrewnionymi, opierający się na ekspresji dominujących alleli genów krzyżowalności z rodziny *Kr* (*Kr_1*, *Kr_2*, *Kr_3*, *Kr_4*). Krzyżowalność jest u obu gatunków cechą ilościową (Alfares i in., 2009; Manickavelu i in., 2009). Mechanizm działania genów *Kr* najlepiej poznano u pszenicy. Najważniejszą rolę w zmniejszaniu efektywności hybrydyzacji międzygatunkowej odgrywa gen *Kr1*, zlokalizowany w chromosomie 5B. Efekty działania genów *Kr_2*, *Kr_3*, *Kr_4*, zlokalizowanych odpowiednio w chromosomach 5A, 5D, oraz 1A są słabsze. Ekspresja dominujących alleli genów *Kr* prowadzi do zahamowania wzrostu łagiewki pyłkowej do zalążni (Manickavelu i in., 2009).

Bariery postzygotyczne pojawiają się po uformowaniu zygoty. Ich obecność może prowadzić do śmierci zarodka lub nieprawidłowego rozwoju bielma, co znacznie utrudnia zabiegi hodowlane (Florez-Rueda i in., 2016). Różne mechanizmy genetyczne decydują o powodzeniu lub niepowodzeniu prawidłowego uformowania się zdolnych do kiełkowania nasion, a wiele szlaków epigenetycznych ma kluczowe znaczenie w rozwoju ziarniaków. Nieprawidłowa regulacja ekspresji genów, które podlegają piętnowaniu rodzicielskiemu (inaczej zjawisku imprintingu genomowego), może prowadzić do zaburzenia równowagi genomów rodzicielskich (Han i in., 2019; Kinoshita, 2007). Poziomy ekspresji dwóch alleli tego samego genu różnią się więc w zależności od tego, od którego komponentu rodzicielskiego pochodzą. U roślin kwitnących zjawisko to przeważnie zachodzi w triploidalnym bielmie (Jahnke i Scholten, 2009; Rodrigues i Zilberman, 2015). U rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) przykładami genów, które podlegają piętnowaniu w triploidalnym bielmie są *FIS2* (*FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2*) i *MEA* (*MEDEA*). *FIS2* i *MEA* kodują składowe kompleksu PRC2 (Polycomb repressive complex 2). Geny te kodują białka z grupy Polycomb będące ważnymi regulatorami transkrypcyjnymi w procesie formowania nasion (Han i in., 2019; Tonosaki i in., 2016). Zaburzony wzorzec imprintingu genów, kodujących składowe kompleksów Polycomb, może więc prowadzić do obniżenia żywotności nasion nowo otrzymanych amfiploidów (Bushell i in., 2003; Chen, 2007). Nie jest przy tym do końca jasne, w jaki sposób szlaki genetyczne oraz epigenetyczne współgrają w procesie rozwoju nasion. Oczywiście istnieją różnice w procesach rozwoju nasion *A. thaliana* oraz zbóż.

U rzodkiewnika bielmo ma charakter efemeryczny i zaczyna ulegać rozkładowi, kiedy tylko liścienie staną się głównym organem spichrzowym. U zbóż znaczna część bielma jest trwalsza i dłużej dostarcza materiałów budulcowych rozwijającemu się zarodkowi Yang i in. (2018) zbadali specyficzne wzorce ekspresji genów, w zależności od komponentu rodzicielskiego, u diploidalnego kozieńca – *Ae. tauschii* (DD), tetraploidalnej pszenicy (AABB) oraz heksaploidalnej pszenicy (AABBDD). Zidentyfikowali odpowiednio 91, 135 oraz 146 genów, których ekspresja była regulowana przez piętnowanie w zależności komponentu matczynego lub ojcowskiego. Dowiedli ponadto, że geny heksaploidalnej pszenicy, które podlegają piętnowaniu, są nierównomiernie rozłożone w genomach A, B i D (55, 69, i 19 odpowiednio dla A, B i D), przy czym najmniej piętnowanych genów umiejscawia się w genomie D. Można przypuszczać, że wyżej wymienione różnice wynikają ze zredukowanej zmienności genetycznej pszenicy, będącej skutkiem procesu jej

udomowienia i ewolucji. Możliwe, że interakcje pomiędzy subgenomami heksaploidalnej pszenicy miały wpływ na proces genomowego imprintingu. Wiele wzorców piętnowania, w zależności od komponentu matczynego oraz ojcowskiego, pojawiłoby się więc dopiero po uformowaniu heksaploidalnej pszenicy (Yang i in., 2018). Dotychczas nie przeprowadzono podobnych badań na pszenżycie uprawnym.

Proces tworzenia mieszańców oddalonych może utrudnić także ekspresja genów *Ph*. *Locus Ph1*, zlokalizowany w długim ramieniu chromosomu 5B. Uczestniczy w prawidłowym formowaniu się biwalentów, w trakcie mejozy, u poliploidalnej pszenicy i prawdopodobnie pszenżyta. Działanie tego mechanizmu zapobiega parowaniu chromosomów niehomologicznych, w konsekwencji utrudniając rekombinację chromosomów homeologicznych. Co istotne, mechanizm zapobiega również rekombinacji chromosomów biorcy z obcymi chromosomami, pochodzącymi od innych przedstawicieli plemienia *Triticeae*, a wprowadzonymi do genomu pszenicy lub pszenżyta technikami inżynierii chromosomowej (Kwiatek i in., 2015; Lukaszewski i Kopecký, 2010; Glombik i in., 2020).

Synteza form amfiploidalnych, poprzez międzygatunkowe lub międzyrodzajowe krzyżowania, niesie ryzyko otrzymania niepłodnego potomstwa. Dzieje się tak wskutek zaburzonej koniugacji chromosomów podczas mejozy, wynikającej najczęściej z obecności niehomologicznych haploidalnych zestawów chromosomów. Przeszkodę w postaci sterylności pokolenia F_1 najczęściej można przezwyciężyć drogą podwojenia liczby chromosomów poprzez zaburzenie cyklu komórkowego przy użyciu związków chemicznych takich jak kolchicyna, oryzalina lub trifluralina. Substancje te zaburzają cykl komórkowy poprzez dezorganizację mikrotubul, przemieszczających chromosomy do przeciwnych biegunów w trakcie podziału komórkowego (Dhooghe i in., 2011). Pozyskiwanie linii podwójnych haploidów (DH) tradycyjnie przeprowadzane jest *in vivo* poprzez traktowanie siewek roztworem kolchicyny. W przypadku pszenżyta, linie DH najczęściej otrzymuje się poprzez zanurzenie zregenerowanej haploidalnej tkanki roślinnej w roztworze kolchicyny (Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Ślusarkiewicz-Jarzina i in., 2017). Haploidy oraz podwójne haploidy pszenżyta można więc otrzymać poprzez androgenezę indukowaną w pylnikowych kulturach *in vitro* (Ślusarkiewicz-Jarzina i in., 2017).

Kolejnym krokiem w hodowli, istotnym dla uzyskania stabilizacji genomu mieszańców oddalonych, jest ograniczenie ilości chromatyny, pochodzącej z gatunku, którego materiał genetyczny jest introdukowany, do absolutnego minimum, czyli do

fragmentu chromosomu z pożądanym *locus* lub *loci* genów. Cel ten osiąga się za pomocą krzyżowań wstecznych (ang. backcrossing, BC), czyli zabiegów polegających na krzyżowaniu nowo otrzymanych mieszańców oddalonych z osobnikami rodzicielskimi, posiadającymi genom rodzicielski rośliny, do której wprowadza się obcą chromatynę. Wyhodowana linia, która posiada w swoim kariotypie tylko jeden dodatkowy, obcy chromosom w postaci monosomicznej nazywana jest linią addycyjną. Linia, która posiada w swoim kariotypie obcy chromosom pochodzący od dawcy (zazwyczaj gatunku dzikiego) zamiast chromosomu rośliny biorcy (zazwyczaj odmiany uprawnej), który jest jego homeologicznym odpowiednikiem, nazywana jest linią substytucyjną (Marais i in., 2005).

Następnym krokiem, po zredukowaniu liczby chromosomów, jest indukcja translokacji pomiędzy chromosomami gatunku biorcy i gatunku dawcy. W hodowli zbóż precyzyjna inżynieria chromosomowa, przy użyciu mechanizmu rekombinacji homologicznej, wykorzystywana jest do kontrolowanego wprowadzania określonych fragmentów chromatyny, niosących pożądane geny lub *loci*, do jądrowego DNA roślin uprawnych (Lukaszewski, 2016). W przypadku wprowadzania obcych fragmentów chromatyny do pszenżyta, w celu indukowania translokacji, można wykorzystać różne techniki takie jak modyfikacja systemu koniugacji chromosomów (*locus Ph* w chromosomie 5B), wykorzystanie zmienności somaklonalnej, promieniowanie jonizujące, mutageny chemiczne, czy też wykorzystanie mechanizmu działania genów *Gc* (Kwiatek i Nawracała, 2018). Możliwe jest również wykorzystanie mechanizmu działania CRISPR-Cas9. Do tej pory udało się zaindukować tą metodą dziedziczną translokację pomiędzy heterologicznymi chromosomami rzodkiewnika (Beying i in., 2020).

Wadą zastosowania fizycznych (np. promieniowanie X, promieniowanie gamma) i chemicznych mutagenów jest losowy charakter powstającej translokacji. Rearanżacje chromosomowe, wywołane przez mutageny, są zazwyczaj niekompensujące i mogą przekładać się na brak stabilności genomowej w kolejnych pokoleniach. Jednakże zaletą indukcji translokacji przez mutageny jest teoretyczna możliwość wprowadzenia segmentu dowolnego chromosomu do genomu biorcy. Ponadto, efektywność wprowadzania segmentów na tej drodze nie zależy od zdolności parowania chromosomów. Techniką indukcji translokacji przez promieniowanie można otrzymać wiele rodzajów translokacji (Sears i Gustafson, 1993; Szakacs i in., 2010).

Chromosomy w postaci monosomicznej nie formują biwalentów z homologicznymi odpowiednikami w trakcie podziału mejotycznego i pozostają w postaci uniwalentów. Uniwalenty w trakcie mejozy mają skłonność do pękania w rejonie centromerowym. Taki rozłam daje początek dwóm chromosomom telocentrycznym, które, w trakcie tego samego podziału, mogą w sposób losowy ulec fuzji w rejonie centromerowym. Przy znajomości grupy homeologicznej wprowadzanego chromosomu oraz grupy homeologicznej chromosomu docelowego, możliwe jest zaindukowanie kompensacyjnej translokacji poprzez fuzje komplementarnych ramion chromosomów z tej samej grupy homeologicznej (Marais i in., 2005). Taki rodzaj translokacji, gdzie fuzji ulegają całe ramiona chromosomów nazywany jest translokacją robertsonowską (RobT; Robertson, 1916).

W hodowli mieszańców oddalonych użyteczne jest również zastosowanie genów gametocydalnych (*Gc*), zlokalizowanych w chromosomach z genomów C, S, S^l, lub M, najczęściej z grup homeologicznych: 2, 3 i 4 gatunków z rodzaju *Aegilops*. Geny *Gc* zapewniają preferencyjną transmisję chromosomów, na których są zlokalizowane poprzez indukcję pęknięć chromosomów, na których nie ma *loci* tych genów. Do pęknięć dochodzi, kiedy roślina jest heterozygotyczna pod względem *Gc*. Gameta, na skutek działania genów *Gc*, może obumrzeć albo, jeśli uszkodzenia nie są zbyt groźne, przeżyć. Jeżeli gameta, w której zadziałał mechanizm *Gc* jest w stanie brać udział w zapłodnieniu, pocięte fragmenty chromosomu mogą zostać użyte w programach hodowlanych pszenicy (Kishii, 2019) jak i też pszenżyta (Kwiatek i in., 2016; Kwiatek i in., 2017). Uzyskane w ten sposób chromosomy telocentryczne mają szanse na fuzję z komplementarnymi chromosomami telocentrycznymi pochodzącymi od ich homeologicznych odpowiedników, np. uzyskanymi poprzez mejotyczny rozłam uniwalentów.

Ostatecznym celem hodowli linii introgresywnych jest ulepszenie wartości danej rośliny uprawnej poprzez wprowadzenie do jej genomu konkretnych genów, warunkujących pożądane cechy. Z powodu wąskiej zmienności genetycznej pszenżyta, istnieje ciągła konieczność jej poszerzenia poprzez wprowadzenie dodatkowych cech takich jak odporność na patogeny (Kwiatek i Nawracała, 2018). Cennym źródłem genów odporności na choroby – w tym rdzę brunatną i żółtą – są dzikie gatunki traw z rodzaju *Aegilops* (McIntosh i in. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*).

3.4 Kozieńce jako źródło genów odporności na rdzę

Gatunki traw z rodzaju kozieńców (*Aegilops*) są blisko spokrewnione z pszenicą uprawną (a w konsekwencji z pszenżytem). Wysoki poziom zmienności genetycznej kozieńców czyni je wartościowym rezerwuarem użytecznych genów, które potencjalnie można wprowadzić do genomów pszenicy oraz pszenżyta (McIntosh i in. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*). Wiele genów odporności na rdzę brunatną (*Lr*) oraz rdzę żółtą (*Yr*) zostało wprowadzonych do genomu pszenicy. Tylko niektóre spośród tych genów wprowadzono dotychczas do genomu pszenżyta uprawnego. Z *Aegilops tauschii* wprowadzono do genomu pszenżyta *Lr22a* (2Ds), *Lr32* (3D) oraz *Lr39* (2DS; Kwiatek i in., 2015; Majka i in., 2018). W ramach niniejszej pracy, z *Aegilops kotschyi* wprowadzono *Lr54* ($2S^kL$) oraz *Yr37* ($2S^kL$). Krokiem pośrednim do wprowadzenia pożądanych genów do genomów wymienionych uprawnych zbóż, jest uzyskanie sztucznych amfiploidów pszenica-*Aegilops* lub pszenżyto-*Aegilops*, a następnie wyprowadzenie linii addycyjnych, substytucyjnych oraz translokacyjnych (Prażak, 2014; Schneider i in., 2008).

Aegilops kotschyi Boiss. (UUSS) jest tetraploidalnym gatunkiem, którego naturalny zasięg występowania obejmuje tereny Afryki Północnej, Bliskiego Wschodu oraz Azji zachodniej (Prażak i Paczos-Grzęda, 2010). *Ae. kotschyi* jest szczególne interesującym gatunkiem z punktu widzenia hodowli introgresywnej, jako potencjalne źródło genów odporności na choroby, genów tolerancji stresów środowiskowych oraz z powodu wysokiej zawartości białka i lizyny. Ponadto, cytoplazma tego gatunku stanowi potencjalną podstawę do indukcji męskiej sterylności i haploidalności (Lukaszewski, 2017).

Geny *Lr54* oraz *Yr37*, zlokalizowane są w długim ramieniu chromosomu $2S^k$ *Ae. kotschyi* (Marais i in., 2005). Antonow i Marais (1996) potwierdzili odporność *Ae. kotschyi* na szeroki zakres patotypów *P. triticina* oraz wprowadzili odcinek chromatyny *Ae. kotschyi*, związany z odpornością na rdzę brunatną, do genomu pszenicy (Antonov i Marais, 1996). Marais i in. (2003) wykazali odporność introgresywnych form pszenicy na rdzę brunatną i żółtą w stadium rozwojowym siewki (Marais i in., 2003). Marais i in. (2005), wykorzystali mechanizm nierozdzielania się oraz pękania uniwalentu $2S^k$ w rejonie centromerowym w trakcie podziału mejotycznego. Długie ramię chromosomu, na którym zlokalizowane są geny *Lr54* i *Yr37*, uległo translokacji na chromosom 2D w trakcie tego samego podziału. Uzyskana została w ten sposób kompensacyjna linia translokacyjna T2DS.$2S^kL$ (Marais i in., 2005).

5. Hipotezy badawcze oraz cel pracy

W niniejszej pracy doktorskiej przyjęto następujące hipotezy badawcze:

1. Wprowadzenie chromosomu $2S^k$, niosącego geny *Lr54* oraz *Yr37* do genomu pszenżyta uprawnego prowadzi do zwiększenia odporności tego zboża na rdzę brunatną i żółtą.
2. Poprzez samozapylenie monosomicznej pod względem $2S^k$ oraz ditelosomicznej pod względem 2RS oraz 2RL linii pszenżyta (40 + M2RS + M2RL + $M2S^k$) możliwe jest wyprowadzenie translokacyjnej linii T2R.$2S^k$

Wobec powyższego, przyjęto następujący cel pracy:

1. Wprowadzenie do genomu uprawnego pszenżyta (× *Triticosecale* Wittmack) segmentu chromosomu $2S^k$L, pochodzącego z *Aegilops kotschyi* Boiss. i niosącego geny odporności na rdzę żółtą i brunatną przy zastosowaniu metod inżynierii chromosomowej.
    - Wyprowadzenie substytucyjnych form pszenżyta z chromosomem $2S^k$(2R) w formie monosomicznej.
    - Ewaluacja odporności roślin, posiadających chromosom $2S^k$, na rdzę brunatną, powodowaną przez *P. triticina*
    - Ewaluacja odporności roślin, posiadających chromosom $2S^k$, na rdzę żółtą, powodowaną przez *P. striiformis*
    - Wyprowadzenie form translokacyjnych pszenżyta T2R.$2S^k$

6. Materiał roślinny

Materiał roślinny wykorzystany w ramach niniejszej pracy obejmował:

- monosomiczną addycyjną linię pszenżyta (MA2S^k; 2*n* = 43) (kolekcja IGR PAN),
- nullisomiczną linię pszenżyta 2R (N2R, 2*n* = 40) (kolekcja IGR PAN),
- ditelosomiczną liniię pszenżyta Dt2RS i Dt2RL (kolekcja IGR PAN),
- substytucyjną linię pszenżyta 2S^k(2R) (wyprowadzona w ramach niniejszej pracy doktorskiej).
- linę ditelosomiczno-monosmoiczną pszenżyta (40+M2RL+M2RS+M2S^k) (wyprowadzona w ramach niniejszej pracy doktorskiej).
- Formy pszenżyta z translokacjami T2R2S^k

W trakcie wcześniejszych prac prowadzonych w Zespole Genomiki Zbóż Instytutu Genetyki Roślin PAN otrzymano linie sztucznych amfiploidów *Aegilops kotschyi* × *Secale cereale* (2n=6x=42; U^{k}U^{k}S^{k}S^{k}RR) (Wojciechowska i Pudelska, 2002) otrzymanych poprzez skrzyżowanie *Ae. kotschyi* Boiss. z diploidalnym żytem odmiany „Dankowskie Złote", nullisomiczną linię pszenżyta (N2R, 2*n* = 40) (Kwiatek i in., 2016) oraz ditelosomiczną linię pszenżyta (Dt2RS i Dt2RL) (Kwiatek i in., 2017).

Uzyskane linie amfiploidów *Aegilops kotschyi* × *Secale cereale* użyte zostały jako forma pomostowa do wprowadzenia genów *Lr54* i *Yr37* do genomu pszenżyta uprawnego odmiany Sekundo. Pszenżyto tej odmiany użyte zostało w charakterze dawcy pyłku w krzyżówkach z amfiploidem *Aegilops kotschyi* × *Secale cereale* oraz w pięciu krzyżowaniach wstecznych, których ostatecznym rezultatem było otrzymanie roślin addycyjnych z dodatkowym chromosomem 2S^k (Kwiatek, 2013; Kwiatek i in., 2013).

7. Najważniejsze wyniki

7.1 Wykorzystanie kozieńców w podnoszeniu odporności pszenżyta uprawnego na rdzę brunatną i żółtą (Publikacja nr 1)

Pszenżyto oraz spokrewnione z nim gatunki kozieńców posiadają homeologiczne genomy (x=7 dla każdego genomu). Pokrewieństwo to umożliwia wprowadzenie do pszenżyta pożądanych cech, którymi wykazują się kozieńce. Dzięki zastosowaniu odpowiedniego programu tworzenia syntetycznych amfiploidów pszenżyto-kozieniec oraz dalszych krzyżówek wstecznych możliwa jest jednoczesna eliminacja z genomu pszenżyta chromosomów, które nie niosą konkretnych pożądanych cech oraz końcowa selekcja roślin o najstabilniejszych kariotypach z minimalną ilością obcej chromatyny.

Należy podkreślić, że jakkolwiek wiele genów odporności na rdze brunatną i żółtą wprowadzono z różnych gatunków kozieńców do uprawnej pszenicy, jedynie kilka wprowadzono dotychczas do pszenżyta. Do tej pory udało się wprowadzić do pszenżyta geny *Lr22a*, *Lr32* i *Lr39* z *Ae. tauschii* oraz *Lr54* i *Lr37* z *Ae. kotschyi* (Ulaszewski i Kwiatek, 2020).

7.2 Analiza monosomicznych linii substytucyjnych $2S^k$(2R) (Publikacja nr 2)

7.2.1 Selekcja monosomicznych roślin addycyjnych $2S^k$, wywodzących się ze sztucznych amfiploidów pszenżyto-*Aegilops kotschyi*.

Wstępne analizy sześciu pokoleń mieszańców pszenżyta odmiany Sekundo × (*Aegilops kotschyi* × *Secale cereale*), w tym F_1 i pięciu krzyżowań wstecznych z Sekundo przy użyciu metod molekularnych (markery SSR) i cytogenetycznych (odpowiednio: fluorescencyjna i genomowa hybrydyzacja *in situ*; FISH i GISH) pozwoliły wyselekcjonować genotypy, w których, na skutek krzyżowania wstecznego, doszło do eliminacji chromosomów *Ae. kotschyi*, nie niosących *loci* genów *Lr54* i *Yr39*.

Za pomocą metod cytogenetyki molekularnej (FISH i GISH) przeanalizowano kariotypy 100 losowo wybranych roślin BC_5F_1, z czego 99 posiadało dodatkowy chromosom $2S^k$ (2*n*=43). Wyselekcjonowane rośliny, posiadające dodatkowy chromosom, pochodzący od *Ae. kotschyi* zostały użyte do krzyżowań w celu otrzymania linii substytucyjnych $2S^k$(2R).

7.2.2 Otrzymywanie monosomicznych roślin substytucyjnych $2S^k$(2R), wywodzących się ze sztucznych amfiploidów pszenżyto-*Aegilops kotschyi*.

Skrzyżowawszy nullisomiczną linię pszenżyta z N2R (2n=40) z monosomiczną linią addycyjną MA$2S^k$, otrzymano tylko 1 typ rekombinanta $2S^k$(2R), w liczbie 468 ziarniaków, z 42 chromosomami oraz chromosomami $2S^k$ i 2R w formie monosomików. W tym celu zapylono 6486 kwiatów N2R pyłkiem roślin MA$2S^k$. Ostatecznie efektywność krzyżowania wynosiła 7,22% i otrzymano 468 roślin. Cytogenetyczne analizy kariotypów wszystkich otrzymanych roślin wykazały, że każda z nich posiadała 42 chromosomy, wliczając $2S^k$ oraz 2R w postaci monosomicznej.

7.2.3 Analiza molekularna za pomocą markerów SSR loci *Lr54 + Yr37*

Celem potwierdzenia obecności *loci* genów *Lr54 + Yr37* prowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem markera S14-410, o długości 410 pz. Reakcję przeprowadzono na matrycy DNA *Ae. kotschyi* (kontrola pozytywna), pszenżyta uprawnego odmiany „Sekundo" (kontrola negatywna) oraz substytucyjnych M$2S^k$(M2R) oraz nullisomicznych N2R (2n = 40) linii pszenżyta, a na jej podstawie dokonano selekcji roślin o pożądanych kariotypach. Ten sam protokół dotyczył analizy obecności badanych *loci* w genomach kolejnych krzyżówek wstecznych, które miały za zadanie wyeliminować obce chromosomy, nie niosące pożądanych genów. Produkt amplifikacji DNA S14-410 zanotowano dla kontroli pozytywnej oraz dla wszystkich roślin, które wywodziły się z krzyżówki pszenżyta odmiany „Sekundo" z amfiploidem (*Aegilops kotschyi* × *Secale cereale*) oraz czterech kolejnych krzyżówek wstecznych (do BC_4F_1). Analiza 100 roślin z BC_5F_1 wykazała obecność DNA markera S14-410 w genomowym DNA 99 roślin. Podobną analizę przeprowadzono na materiale pochodzącym z 468 roślin, będących efektem krzyżówki nullisomicznej linii pszenżyta N2R z linią addycyjną MA$2S^k$. Produkt amplifikacji markera obserwowano dla wszystkich badanych roślin z tej grupy.

7.2.4 Ewaluacja odporności linii substytucyjnej na rdzę brunatną i żółtą.

Przeprowadzono ewaluację odporności roślin z substytucyjnej linii pszenżyta $2S^k$(2R) na rdzę brunatną oraz rdzę żółtą. W tym celu, w fitotronie dokonano inokulacji dwóch grup po 80 roślin w stadium siewki mieszaniną zarodników *Puccinia*. Pierwszą z grup potraktowano roztworem inokulacyjnym z zarodnikami *P. triticina*, drugą - roztworem inokulacyjnym z zarodnikami *P. striiformis*. Jako grupy kontrolnej użyto akceptorowej i

podatnej na infekcje odmiany pszenżyta „Sekundo". Średnie wartości porażenia dla dwóch powtórzeń roślin z grupy kontrolnej na poziomie (6.40 +/- 0.73 i 6.43 +/- 0.75) pokazały, że mieszanina zarodników powoduje efektywne porażenie rdzą pszenżyta odmiany „Sekundo". Analiza fenotypów roślin $2S^k(2R)$ w dwóch powtórzeniach i odstępach czasowych 10, 15, 20 dni po infekcji zarodnikami *P. triticina* wykazała porażenie roślin na podobnym poziomie (2.96 +/- 0.42 i 2.97 +/- 0.48). Poziom istotności różnic był na poziomie $\alpha = 0.01$. Nie było istotnych różnic w poziomie odporności pomiędzy powtórzeniami $2S^k(2R)$ na rdzę źdźbłową. W przypadku inokulacji roślin $2S^k(2R)$ mieszaniną zarodników *P. striiformis,* nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy roślinami $2S^k(2R)$ a roślinami z grupy kontrolnej w odpowiedzi na infekcje. Wartość porażenia przez rdzę żółtą dla 2 powtórzeń z grupy kontrolnej wynosiła (3.24 +/- 0.79 i 3.33 +/- 0.85) oraz (3.21 +/- 0.79 i 3.29 +/- 0.77) dla roślin z substytucją $2S^k$. Analiza statystyczna z użyciem testu ANOVA wykazała brak statystycznie istotnej różnicy w odporności, pomiędzy roślinami z linii $2S^k(2R)$ a roślinami z grupy kontrolnej.

7.3 Otrzymywanie linii translokacyjnych (Publikacja nr 3)

7.3.1 Segregacja chromosomów u pszenżyta $40 + M2S^k + M2R$

W ramach eksperymentu kontrolnego przeprowadzono analizę podziałów komórek macierzystych pyłku u 10 roślin ($40 + M2S^k + M2R$) w celu identyfikacji anafaz i metafaz pierwszego podziału mejotycznego. W kariotypie wszystkich 100 analizowanych komórek macierzystych pyłku zaobserwowano chromosomy $2S^k$ w postaci uniwalentu. W 9 przypadkach chromosom $2S^k$ uległ, w trakcie pierwszej anafazy, rozłamowi w rejonie centromerowym, a powstałe w ten sposób chromosomy telosomiczne rozdzielone zostały do przeciwległych biegunów.

Następnie przeprowadzono analizę GISH 289 roślin powstałych z samozapylenia pszenżyta $40 + M2S^k + M2R$. W 185 analizowanych przypadkach (63.1%) stwierdzono obecność chromosomu $2S^k$ w postaci monosomicznej. Kariotypy 104 pozostałych roślin (36,9%) nie zawierały chromosomu $2S^k$. Nie stwierdzono żadnego przypadku translokacji robertsonowskiej.

7.3.2 Segregacja chromosomów u pszenżyta 40 + M2S^k + M2RS + M2RL

Głównym założeniem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie pszenżyta z introgresją segmentu chromosomu 2S^k w chromosomie 2R pszenżyta. W tym celu, w kolejnym kroku badań, skrzyżowano monosomiczną linie substytucyjną (40 + M2R + M2S^k) z podwójnie ditelosomiczną linia pszenżyta (D2RS i D2RL), tak aby otrzymać potrójnie monosomiczną linię (40 + M2RS + M2RL + M2S^k). Uzyskane rośliny posiadały w swoim kariotypie, w obrębie drugiej grupy homeologicznej S i R: jedno pojedyncze ramię 2RS, jedno pojedyncze ramię 2RL oraz chromosom S^k. Ostatecznie zapylono 13457 kwiatów roślin z linii ditelosomicznej pyłkiem pochodzącym z roślin o kariotypach monosomicznych substytucyjnych M2S^k (M2R) i otrzymano 3464 ziarniaki z wydajnością krzyżowania na poziomie 25,74%. Spośród tych 3464 ziarniaków wysiano 100 i przeprowadzono analizy cytomolekularne w celu zbadania struktury chromosomalnej. W obrębie badanych roślin otrzymano:

- 38 potrójnych monosomików (40 + M2RS + M2RL + M2S^k)
- 35 roślin bez chromosomu 2R (40 + N2R + M2S^k)
- 15 ditelosomików (40 + M2RS + M2RL)
- 12 podwójnych telosomików (40 + D2RL).

Następnie 68 kłosów z 38 potrójnych monosomików (40 + M2RS + M2RL + M2S^k) poddano samozapyleniu i otrzymano 3489 ziarniaków, spośród których przeanalizowano 100 losowo wybranych pod kątem struktury chromosomalnej. W obrębie badanych roślin z powodzeniem zidentyfikowano:

- 11 roślin z translokacją robertsonowską, w tym 1 roślinę z podwójną translokacją (RobT-T2RS.2S^{k}L i T2S^{k}S.2RL), 6 z T2RS.2S^{k}L oraz 4 z T2S^{k}S.2RL
- 2 rośliny telosomiczne z chromosomem 2R w postaci ramion (2RS i 2RL) oraz dodatkowym ramieniem 2S^{k}S
- 56 roślin, w których nastąpiła całkowita eliminacja chromosomu S^k
- 31 roślin z całym chromosomem S^k

7.3.3 Analiza molekularna za pomocą markerów SSR loci *Lr54 + Yr37*

Obecność produktu amplifikacji DNA metodą PCR z wykorzystaniem markera S14-410 została ponownie sprawdzona u wyprowadzonych roślin. Produktu amplifikacji nie

stwierdzono u linii podwójnie ditelosomicznych D2RS + D2RL, linii telosomicznych M2RS + M2RL + M2S^{k}S oraz linii z pojedynczą translokacją robertsonowską T2S^{k}S.2RL. Potwierdzono obecność loci u linii podwójnie monosomicznych (40 + M2R + M2S^{k}), linii podwójnie translokacyjnych T2RS.2S^{k}L i T2S^{k}S.2RL oraz linii z pojedynczą translokacją robertsonowską T2RS.2S^{k}L.

8. Podsumowanie i wnioski:

- Chromosom $2S^k$ jest preferencyjnie przekazywany w następujących po sobie pokoleniach. Możliwe jest zatem, że $2S^k$ jest nośnikiem genów gametocydalnych. Jak wykazały analizy kariotypów roślin mieszańcowych, pochodzących z krzyżowań zmierzających do wyselekcjonowania genotypów addycyjnych z pokolenia BC_5F_1, 99% badanych roślin posiadało dodatkowy chromosom $2S^k$. Według literatury, mechanizm, który odpowiada za preferencyjną transmisję genów gametocydalnych uszkadza chromosomy, na których nie występują *loci* genów *Gc*. W zależności od skali uszkodzeń chromosomów, gamety, które nie posiadają obcego chromosomu, niosącego *locus Gc*, mogą wykazywać na tyle lekkie uszkodzenia chromosomów, że możliwy jest ich udział w zapłodnieniu. Rozległe uszkodzenia chromosomów mogą skutkować sterylnością gamet. Analiza kariotypu jednej z roślin BC_5F_1wykazała brak chromosomu $2S^k$ oraz niewielkie aberracje innych chromosomów. Można zatem przypuszczać, że gamety nie niosące chromosomu $2S^k$ mogą uczestniczyć w zapłodnieniu i prowadzić do uformowania się roślin, z aberracjami chromosomowymi, ale pod warunkiem, że żaden fragment chromosomu nie został utracony. Mechanizm Gc jest zjawiskiem genetycznym, ważnym z punktu widzenia hodowców. Związek *loci* genów *Gc* z położeniem w chromosomie $2S^k$ genów odporności na rdze brunatną i żółtą – odpowiednio *Lr54* oraz *Yr37* – potencjalnie może zapewnić zachowanie oraz transmisję tych cech w następujących po sobie pokoleniach pszenżyta, bez potrzeby selekcji. Jednakże, z drugiej strony, linie pszenżyta z chromosomami rozdzielonymi w okolicy centromeru przez ekspresję genów *Gc*, mogą być wykorzystane w programach hodowlanych do otrzymywania translokacji robertsonowskich.
- Prawdopodobieństwo indukcji translokacji robertsonowskich zależy od częstości pękania chromosomów w rejonie centromerowym, a w konsekwencji powstawania chromosomów teocentrycznych w trakcie podziału mejotycznego. W wyniku samozapylenia roślin z monosomiczną substytucją (40 + M2R + $M2S^k$) nie obserwowano translokacji robertsonowskich pomiędzy chromosomami pszenżyta i *Ae. kotschyi*. Mogło to być związane z brakiem homeologicznych i komplementarnych względem siebie chromosomów telosomicznych w trakcie mejozy.

- Zastosowanie linii ditelosomicznej Dt2RS i Dt2RL pozwoliło zwiększyć szanse na uzyskanie linii translokacyjnych. Ponadto, w ramach niniejszej pracy, uzyskano zarówno translokacje robertsonowskie typu $2S^kS.2RL$ jak i $2RS.2S^kL$. Rośliny z translokacją $2S^kS.2RL$ mogą nieść w krótkim ramieniu chromosomu $2S^k$ inne geny, potencjalnie ważne punktu widzenia hodowli pszenżyta.
- Analizy cyto-molekularne form translokacyjnych pszenżyta ozimego potwierdziły lokalizację *loci* genów *Lr54* i *Yr37* w długim ramieniu chromosomu $2S^k$ ($2S^kL$).
- Pszenżyto w stadium siewki z wprowadzonym genem *Lr54*, pochodzącym od *Ae. kotschyi*, wykazuje podwyższoną odporność na rdzę brunatną. Rośliny, w stadium siewki, posiadające w swoim kariotypie cały chromosom $2S^k$, wykazywały w testach inokulacyjnych podwyższoną odporność na rdzę brunatną (wywołaną przez patogeniczny grzyb *P. triticina*) w porównaniu z roślinami z grupy kontrolnej.
- Pszenżyto, w stadium siewki, z wprowadzonym genem *Yr37*, pochodzącym od *Ae. kotschyi*, nie wykazuje podwyższonej odporności na rdzę żółtą w porównaniu z roślinami z grupy kontrolnej. Ogółem, pszenżyto jest bardziej odporne na rdzę żółtą porównaniu do pszenicy. Ponadto, przebieg infekcji pszenżyta przez *P. stiiformis* w dużym stopniu zależy od stadium rozwoju rośliny, jak i rasy patogenu. Możliwe jest, że odmiana pszenżyta Sekundo posiada częściowa odporność na rdzę brunatną i wprowadzenie genu *Yr37* nie przyczyniło się do wzrostu tej odporności.
- Otrzymane formy translokacyjne pszenżyta $T2R.2S^k$ posłużą jako materiał do dalszych krzyżowań, w hodowli pszenżyta uprawnego, celem podwyższenia odporności tego zboża na rdzę brunatną.

.

9. Spis literatury:

1. Alfares, W., Bouguennec, A., Balfourier, F., Gay, G., Bergès, H., Vautrin, S., Sourdille, P., Bernard, M., i Feuillet, C. (2009). Fine mapping and marker development for the crossability gene SKr on chromosome 5BS of hexaploid wheat (Triticum aestivum L.). *Genetics*, *183*(2), 469-463. https://doi.org/10.1534/genetics.109.107706
2. Antonov, A., i Marais, G. (1996). Identification of leaf rust resistance genes in Triticum species for transfer to common wheat. *South African Journal of Plant and Soil*, *13*, 55-60. https://doi.org/10.1080/02571862.1996.10634376
3. Arseniuk, E. (1996). Triticale Diseases - a Review. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey, i V. P. Carnide (Eds.), *Triticale: Today and Tomorrow* (499-525). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0329-6_65
4. Arseniuk, E., i Góral, T. (2015). Triticale Biotic Stresses—Known and Novel Foes. In F. Eudes (Ed.), *Triticale* (83-108). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22551-7_5
5. Beying, N., Schmidt, C., Pacher, M., Houben, A., i Puchta, H. (2020). CRISPR–Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in Arabidopsis. *Nature Plants*, *6*(6), 638-645. https://doi.org/10.1038/s41477-020-0663-x
6. Bona Lajos, C. K. V. (2016). *9Th International Triticale Symposium. Szeged, Hungary. May 23-27, 2016. Book Of Abstracts*. Zenodo. https://zenodo.org/record/1288521
7. Bushell, C., Spielman, M., i Scott, R. J. (2003). The basis of natural and artificial postzygotic hybridization barriers in Arabidopsis species. *The Plant cell*, *15*(6), 1430-1442. https://doi.org/10.1105/tpc.010496
8. Chen, Z. J. (2007). Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annual Review of Plant Biology*, *58*(1), 377-406. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103835
9. Dhooghe, E., Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., i Huylenbroeck, J. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *104*, 359-373. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5
10. *FAOSTAT*. http://www.fao.org/faostat/en/#home
11. Florez-Rueda, A. M., Paris, M., Schmidt, A., Widmer, A., Grossniklaus, U., i Städler, T. (2016). Genomic Imprinting in the Endosperm Is Systematically Perturbed in Abortive Hybrid Tomato Seeds. *Molecular biology and evolution*, *33*(11), 2935-2946. https://doi.org/10.1093/molbev/msw175
12. Glamoclija, N., StarČEviĆ, M., Ćirić, J., Sefer, D., Glisic, M., Baltic, M., Markovic, R., SpasiĆ, M., i GlamoČLija, Đ. (2018). The Importance of Triticale in Animal Nutrition. *ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ*, *18*, 84-94 https://doi.org/10.7251/VETJEN1801073G
13. Glombik, M., Bačovský, V., Hobza, R., i Kopecký, D. (2020). Competition of Parental Genomes in Plant Hybrids. *Frontiers in plant science*, *11*. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00200

14. Han, Q., Bartels, A., Cheng, X., Meyer, A., An, Y.-Q. C., Hsieh, T.-F., i Xiao, W. (2019). Epigenetics Regulates Reproductive Development in Plants. *Plants (Basel, Switzerland)*, *8*(12), 564. https://doi.org/10.3390/plants8120564

15. Hills, M. J., Hall, L. M., Messenger, D. F., Graf, R. J., Beres, B. L., i Eudes, F. (2007). Evaluation of crossability between triticale (X *Triticosecale* Wittmack) and common wheat, durum wheat and rye. *Environ. Biosafety Res.*, *6*(4), 249-257. https://doi.org/10.1051/ebr:2007046

16. Jahnke, S., i Scholten, S. (2009). Epigenetic resetting of a gene imprinted in plant embryos. *Curr Biol*. 19(19), 1677-168, https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.053

17. Kinoshita, T. (2007). Reproductive barrier and genomic imprinting in the endosperm of flowering plants. *Genes i Genetic Systems*, *82*(3), 177-186. https://doi.org/10.1266/ggs.82.177

18. Kishii, M. (2019). An Update of Recent Use of Aegilops Species in Wheat Breeding. *Frontiers in plant science*, *10*, 585. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00585

19. Kwiatek, M. (2013). *Analiza cytogenetyczna form pszenżyta ozimego (x Triticosecale Wittm.) z introgresją chromatyny Aegilops spp.* IGR PAN].

20. Kwiatek, M., Majka, M., Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Ponitka, A., Pudelska, H., Belter, J., i Wiśniewska, H. (2016). Transmission of the *Aegilops ovata* chromosomes carrying gametocidal factors in hexaploid triticale (×*Triticosecale* Wittm.) hybrids. *Journal of applied genetics*, *57*(3), 305-315. https://doi.org/10.1007/s13353-015-0332-3

21. Kwiatek, M., Majka, M., Wiśniewska, H., Apolinarska, B., i Belter, J. (2015). Effective transfer of chromosomes carrying leaf rust resistance genes from *Aegilops tauschii* Coss. into hexaploid triticale (X *Triticosecale* Witt.) using *Ae*. *tauschii* × *Secale cereale* amphiploid forms. *Journal of applied genetics*, *56*(2), 163-168. https://doi.org/10.1007/s13353-014-0264-3

22. Kwiatek, M., Wiśniewska, H., i Apolinarska, B. (2013). Cytogenetic analysis of *Aegilops* chromosomes, potentially usable in triticale (X *Triticosecale* Witt.) breeding. *Journal of applied genetics*, *54*(2), 147-155. https://doi.org/10.1007/s13353-013-0133-5

23. Kwiatek, M. T., i Nawracała, J. (2018). Chromosome manipulations for progress of triticale (×*Triticosecale*) breeding. *Plant Breeding*, *137*(6), 823-831. https://doi.org/10.1111/pbr.12652

24. Kwiatek, M. T., Wiśniewska, H., Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Majka, J., Majka, M., Belter, J., i Pudelska, H. (2017). Gametocidal Factor Transferred from Aegilops geniculata Roth Can Be Adapted for Large-Scale Chromosome Manipulations in Cereals. *Frontiers in plant science*, *8*, 409-409. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00409

25. Lorenz, K., i Pomeranz, Y. (1974). The history, development, and utilization of triticale. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, *5*(2), 175-280. https://doi.org/10.1080/10408397409527174

26. Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K. C., Germain, H., Hecker, A., i Duplessis, S. (2019). Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist*, *222*(3), 1190-1206. https://doi.org/10.1111/nph.15641

27. Lowry, D. B., Modliszewski J. L., Wright, K. M., Wu C. A. i Wills J. H. (2008) The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants, Phil. *Trans. R. Soc. B* 363, 3009–3021 https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0064

28. Lukaszewski, A. J. (2016). Manipulation of Homologous and Homoeologous Chromosome Recombination in Wheat. In S. F. Kianian i P. M. A. Kianian (Eds.), *Plant Cytogenetics: Methods and Protocols* (77-89). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3622-9_7

29. Lukaszewski, A. J. (2017). Chromosomes 1BS and 1RS for control of male fertility in wheats and triticales with cytoplasms of *Aegilops kotschyi*, *Ae. mutica* and *Ae. uniaristata*. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(12), 2521-2526. https://doi.org/10.1007/s00122-017-2973-6

30. Lukaszewski, A. J., i Kopecký, D. (2010). The Ph1 locus from wheat controls meiotic chromosome pairing in autotetraploid rye (*Secale cereale* L.). *Cytogenet Genome Res.* 129, 117-123. https://doi.org/10.1159/000314279

31. Majka, M., Serfling, A., Czembor, P., Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Kwiatek, M. T., Ordon, F., i Wiśniewska, H. (2018). Resistance of (*Aegilops tauschii* × *Secale cereale*) × *Triticosecale* Hybrids to Leaf Rust (*Puccinia triticina*) Determined on the Macroscopic and Microscopic Level. *Frontiers in plant science*, *9*, 1418-1418. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01418

32. Manickavelu, A., Koba, T., Mishina, K., i Sassa, H. (2009). Molecular characterization of crossability gene *Kr1* for intergeneric hybridization in *Triticum aestivum* (Poaceae: Triticeae). *Plant Systematics and Evolution*, 278, 125-131. https://doi.org/10.1007/s00606-008-0139-3

33. Marais, G. F., McCallum, B., Snyman, J. E., Pretorius, Z. A., i Marais, A. S. (2005). Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr54* and *Yr37* transferred to wheat from *Aegilops kotschyi*. *Plant Breeding*, *124*(6), 538-541. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01116.x

34. Marais, G. F., Pretorius, Z. A., Marais, A. S., i Wellings, C. R. (2003). Transfer of rust resistance genes from Triticum species to common wheat. *South African Journal of Plant and Soil*, *20*(4), 193-198. https://doi.org/10.1080/02571862.2003.10634934

35. McGoverin, C. M., Snyders, F., Muller, N., Botes, W., Fox, G., i Manley, M. (2011). A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(7), 1155-1165. https://doi.org/10.1002/jsfa.4338

36. McIntosh, R., Dubcovsky, J., Rogers, W. J., Morris, C., i Xia, X. C. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Dostęp online: https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp (26.12.2020)*

37. Meale, S. J., i McAllister, T. A. (2015). Grain for Feed and Energy. In F. Eudes (Ed.), *Triticale* (167-187). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22551-7_9

38. Mergoum, M., Singh, P. K., Peña, R., Lozano, A., Cooper, K. V., Salmon, D. F., i Macpherson, H. (2009). Triticale: A "New" Crop with Old Challenges. In (267-287). https://doi.org/10.1007/978-0-387-72297-9_9

39. Park, R. F., i Wellings, C. R. (2011). Somatic Hybridization in the Uredinales. *Annual Review of Phytopathology*, *50*(1), 219-239. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095405

40. Pattison, A. L., i Trethowan, R. M. (2013). Characteristics of modern triticale quality: commercially significant flour traits and cookie quality. *Crop and Pasture Science*, *64*(9), 874-880. https://doi.org/10.1071/CP13056

41. Prasad, P., Savadi, S., Bhardwaj, S. C., i Gupta, P. K. (2020). The progress of leaf rust research in wheat. *Fungal Biology*, *124*(6), 537-550. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.013

42. Prażak, R. (2014). The role of *Aegilops* species in the origin and improvement of common wheat. *Acta Agrobotanica*, *66*(4), 7-14. https://doi.org/10.5586/aa.2013.046

43. Prażak, R., i Paczos-Grzęda, E. (2010). Gene transfer from *Aegilops kotschyi* Boiss. to *Triticum aestivum* L. *Adv. Agric. Sci. Probl.*, *555*, 613–620.

44. Rakha, A., Åman, P., i Andersson, R. (2011). Dietary fiber in triticale grain: Variation in content, composition, and molecular weight distribution of extractable components. *Journal of Cereal Science*, *54*(3), 324-331. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.06.010

45. Robertson, W.-M. R. B. (1916). Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of tettigidae and acrididae: V-shaped chromosomes and their significance in acrididae, locustidae, and gryllidae: Chromosomes and variation. *J. Morph. , 27*, 179–331. https://doi.org/10.1002/jmor.1050270202

46. Rodrigues, J. A., i Zilberman, D. (2015). Evolution and function of genomic imprinting in plants. *Genes i development*, *29*(24), 2517-2531. https://doi.org/10.1101/gad.269902.115

47. Schneider, A., Molnár, I., i Molnár-Láng, M. (2008). Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*, *163*(1), 1-19. https://doi.org/10.1007/s10681-007-9624-y

48. Schwessinger, B., Chen, Y.-J., Tien, R., Vogt, J. K., Sperschneider, J., Nagar, R., McMullan, M., Sicheritz-Ponten, T., Sørensen, C. K., Hovmøller, M. S., Rathjen, J. P., i Justesen, A. F. (2020). Distinct Life Histories Impact Dikaryotic Genome Evolution in the Rust Fungus *Puccinia striiformis* Causing Stripe Rust in Wheat. *Genome biology and evolution*, *12*(5), 597-617. https://doi.org/10.1093/gbe/evaa071

49. Sears, E. R., i Gustafson, J. P. (1993). Use of Radiation to Transfer Alien Chromosome Segments to Wheat Crop Sci., 33, 897–901. https://doi.org/https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300050004x

50. Stace, C. A. (1987). TRITICALE: A CASE OF NOMENCLATURAL MISTREATMENT. *TAXON*, *36*(2), 445-452. https://doi.org/10.2307/1221447

51. Szakacs, E., Kruppa, K., Istvan, M., i Molnar-Lang, M. (2010). Induction of wheat/barley translocations by irradiation and their detection using fluorescence in situ hybridization. *Acta Agronomica Hungarica*. *58*(3), 203-209. https://doi.org/10.1556/AAgr.58.2010.3.2

52. Ślusarkiewicz-Jarzina, A., i Ponitka, A. (2003). Efficient Production of Spontaneous and Induced Doubled Haploid Triticale Plants Derived from Anther Culture. *Cereal Research Communications*, *31*(3), 289-296. https://doi.org/10.1007/BF03543356

53. Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Pudelska, H., Woźna, J., i Pniewski, T. (2017). Improved production of doubled haploids of winter and spring triticale hybrids via combination of colchicine treatments on anthers and regenerated plants. *Journal of applied genetics*, *58*(3), 287-295. https://doi.org/10.1007/s13353-016-0387-9

54. Tang, C., Xu, Q., Zhao, M., Wang, X., & Kang, Z. (2018). Understanding the lifestyles and pathogenicity mechanisms of obligate biotrophic fungi in wheat: The emerging genomics era. *The Crop Journal*, *6*(1), 60-67. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.11.003

55. Tonosaki, K., Osabe, K., Kawanabe, T., i Fujimoto, R. (2016). The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breeding science*, *66*(3), 333-349. https://doi.org/10.1270/jsbbs.15114

56. Ulaszewski, W., Kwiatek, M. T. (2020). *Aegilops* Species for the Improvement of the Leaf and Stripe Rust Resistance in Cultivated Triticale (×*Triticosecale* Wittmack). *Agronomy*, *10*(12). https://doi.org/10.3390/agronomy10121991

57. Widmer, A., Lexer, C., i Cozzolino, S. (2009). Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity*, *102*(1), 31-38. https://doi.org/10.1038/hdy.2008.69

58. Wojciechowska, B., i Pudelska, H. (2002). Production and morphology of the hybrids *Aegilops kotschyi* x *Secale cereale* and *Ae. biuncialis* x *S. cereale*. *Journal of applied genetics*, *43*, 279-285.

59. Wolski, T., i Tymieniecka, E. W. A. (1983). The first Polish triticale variety. *Cereal Research Communications*, *11*(2), 139-141. http://www.jstor.org/stable/23781480

60. Yang, G., Liu, Z., Gao, L., Yu, K., Feng, M., Yao, Y., Peng, H., Hu, Z., Sun, Q., Ni, Z., i Xin, M. (2018). Genomic Imprinting Was Evolutionarily Conserved during Wheat Polyploidization. *The Plant cell*, *30*(1), 37-47. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00837

61. Zillinsky, F. J. (1974). The Development of Triticale. In N. C. Brady (Ed.), *Advances in Agronomy*, 26, 315-348. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60875-5

10. Publikacja nr 1

10.1 Tekst publikacji

1. Waldemar Ulaszewski, Michał T. Kwiatek (2020), ***Aegilops* Species for the Improvement of the Leaf and Stripe Rust Resistance in Cultivated Triticale (×*Triticosecale* Wittmack)**. *Agronomy* 10(12), 1991. doi: https://doi.org/10.3390/agronomy10121991

agronomy

MDPI

Review

Aegilops Species for the Improvement of the Leaf and Stripe Rust Resistance in Cultivated Triticale (×*Triticosecale* Wittmack)

Waldemar Ulaszewski [1] and Michał Tomasz Kwiatek [2,*]

[1] Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34 str., 60-479 Poznań, Poland; wula@igr.poznan.pl

[2] Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-637 Poznań, Poland

* Correspondence: michal.kwiatek@up.poznan.pl; Tel.: +48-6184-87-760

Received: 26 October 2020; Accepted: 16 December 2020; Published: 18 December 2020

Abstract: Hexaploid triticale (×*Triticosecale* Wittmack, 2*n* = 6*x* = 42 chromosomes, AABBRR) is a cultivated hybrid, which combines wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.) properties. It has a better ability to be grown on poor soils, compared to wheat. Mainly, triticale is produced for forage feed and bioethanol. Considering the limited diversity of this human-made crop, there is a need to widen its genetic variability, especially to introduce new genes, responsible for agronomic traits, such as resistance to biotic stresses. Leaf rust caused by *Puccinia triticina* Eriks. and stripe rust caused by *Puccinia striiformis* Westend are the most destructive foliar diseases of triticale and related cereals. Developing resistant triticale varieties is an important strategy for the control of these diseases. A number of leaf and stripe rust resistance genes have been already introduced into bread wheat from related species using chromosome manipulations. Exploitation of related species conferring desirable loci is the most effective non-GMO way of improving the rust resistance of triticale. The procedure encompasses chromosome doubling of obtained hybrids followed by a number of backcrosses to eliminate unnecessary alien chromatin and to reduce the linkage drag. In this review, we show the recent status of pre-breeding studies, which are focused on transfer of leaf and stripe rust resistance genes from *Aegilops* species into cultivated triticale using distant crossing and chromosome engineering.

Keywords: *Aegilops*; triticale; leaf rust; stripe rust; yellow rust; resistance; *Puccinia*

1. Introduction

The hexaploid triticale (×*Triticosecale* Wittmack, 2*n* = 6*x* = 42, AABBRR), a small grain cereal, is a man-made crop developed by crossing *Triticum* species as a female parent and rye (*Secale cereale* L.) as a male parent. In principle, triticale was intended to combine the nutritional value of the wheat and the rapid growth, cold tolerance, and hardiness of rye. Cultivated hexaploid triticale exhibits amphiploidy with respect to wheat (AABB) and rye (RR) genomes. Triticale is one of few artificial crops cultivated at a large scale. In general for the last decades the global harvested area of triticale has been constantly increasing (2,101,405 ha in 1996; 3,662,363 ha in 2006; and 3,809,192 ha in 2018) [1]. The major importance of this cereal is based on the protein content in seeds. It may vary from 12 to 22%. Feeding experiments involving farm animals have shown that triticale seem to be more digestible in comparison with parental species [2]. The primary end-use of triticale is forage production. However, growing demand for food resources and biofuel has led to an increased interest in development of this cereal. The end-use of triticale depends of the characteristics of its cultivar and is largely determined by its chemical composition. Cultivars of large and uniform grains containing more

proteins than starch are used as concentrated feed for poultry, ruminants, and monogastrics. Cultivars forming high amount of biomass, like rye, are grazed or harvested for silage, green-feed, and hay [2,3]. At first triticale has mostly been used as animal feed, and its potential still has not been fully utilized at a large scale. Recently this crop has found application in food industry, including baking [4] and brewing [5]. Triticale has also been used as a substrate for bioethanol and biofuel production [6].

The genetic variability of triticale is limited due to lack of natural speciation, narrow genepool of parental forms (wheat and rye) and development of new breeding techniques, which induce high homozyosity (i.e., double haploid production) [7]. The first attempt to obtain triticale was completed by Wilhelm Rimpau in Germany in 1888 by crossing hexaploid wheat and rye and inducing spontaneous chromosome doubling of the sterile hybrid that is produced using conventional plant breeding hybridizing techniques between wheat and rye [8]. In the 1950s Arpad Kiss discovered that hexaploid forms of triticale would be more agronomically appropriate than its octoploid forms [9]. The same researcher coined the terms "Secondary Hexaploid Triticale" (SHT) and "Primary Hexaploid Triticale" (PHT) to distinguish lines derived from different combination of crosses [8]. PHT encompasses hexaploid lines of triticale obtained by crossing 6× triticale with 6× triticale where A and B genomes derive from tetraploid wheat. SHT encompasses hexaploid lines of triticale obtained by crossing 8× triticale with 6× triticale where A and B genomes are recombined from tetraploid and hexaploid wheat [7]. The first commercial cultivars of hexaploid triticale came onto the market in the late 1960s as T-No.57 and T-No.6 [9]. This cereal was as competitive as rye on marginal soils but contained 30–50% more protein. In May 1969 triticale became recognized as a new crop of commerce in Canada with the licensing of the hexaploid triticale cv Rosner [10]. The properties of triticale has motivated breeders to include triticale in their cereal breeding program. In Poland, which is now the biggest producers of triticale modern breeding and research of this crop started in 1960s. In 1982 the variety "Lasko", representing a favorable combination of yield potential, was the first cultivar of triticale registered in Poland and played a significant role in popularization of this new crop in Europe [11]. Currently, triticale breeding programs are aimed at the selection of highly yielding population varieties with increased resistance to fungal diseases (especially to leaf and stripe rust) [12].

2. Current Status of Triticale Resistance against Leaf and Stripe Rusts

Until the breakdown of resistance, triticale had not been prone to harmful effects of various pathogens. Currently, this cereal meets pathogens and pests deriving both from wheat and rye. The first triticale disease which occurred in epidemic proportions was stem rust (*Pucinia graminis* f.sp. *tritici*) in Australia [2]. Then, leaf rust (syn. brown rust, caused by *Puccinia triticiana* Eriks) and stripe rusts (syn. yellow rust, caused by *P. striiformis* f.sp. *tritici*) began to affect this crop everywhere it grows. As triticale started to expand into new production areas, new hybrid pathotypes of *Puccinia*, carrying virulence genes have evolved and broadened their range of hosts, moving from wheat and rye into triticale [13]. Both leaf and stripe rust are able to cause economic losses and decrease the grain yield even by 40% [2]. There is an urgent need to overcome this problem and enhance the resistance to these diseases.

The rust fungi (Pucciniales) (previously known as Uredinales) are the obligate, biotrophic basidiomycete fungal plant pathogens, infecting the representants of all vascular plant groups. The rust fungi are one of the most devastating threats to agricultural crops worldwide [14]. They are typified by the orange-brown-red rust color of one or more spore stages. Many aspects of biology of Pucciniales remain unclear. The research on these fungi is complicated due to their absolute dependence on the host and thus lack of possibility to culture them on artificial media [15]. In natural environment of *Puccinia triticina* and *P. striiformis*, individual populations of these fungi include many physiological races (pathotypes) with different levels of virulence. The airborne nature of these rust fungi as well as their tendency to increase its genetic variability by mutations and selection are factors allowing the pathogenic fungus to develop virulence against different cultivars carrying one or more resistance (R) genes against the most prevalent races of *P. triticina* and *P. striiformis* in a given region. Some estimates suggests that resistance against a specific rust resistance gene does not last more than 5–7 years;

therefore, an introgression of new and effective resistance genes is a regular activity in breeding programs of cereals [16].

There are over 70 leaf rust and stripe rust resistance genes, securing either race-specific resistance or non-race specific adult-plant resistance (APR), that have been identified in Triticae [17] and some of them have already been transferred from related species into the wheat genetic background [18]. Each of these genes confers excellent resistance to some pathotypes, but none of them can be expected to work against all pathotypes. The secondary gene pools as a source of effective leaf rust (*Lr*) resistance and stripe rust (*Yr*) resistance genes for triticale are wild relatives of wheat such as *Aegilops*, *Thinopyrum,* and *Triticum* species [18]. There are, in general, three categories of rust resistance in plants: race-specific seedling resistance, also known as all-stage resistance; race-specific adult plant resistance (race-specific APR); and race non-specific APR, also known as slow-rusting or partial resistance [16]. Particular races of rust fungi are specialized in different cereal host species. For example, *P. triticina* is able to successfully infect different small grain cereal species. *Puccinia triticina* f.sp. *tritici* is specialized in wheat [16]. *P. triticina* f.sp. *secalis* attacks rye [19]. Triticale is usually resistant to leaf rust of rye. The isolates of leaf rust from triticale in the field are usually wheat leaf rust [2]. Potentially, there is a possibility of somatic hybridization of rust fungi, which originally lived on wheat and rye and have moved into triticale. Evidences provided by Park and Wellings [20] suggest that some pathotypes of *P. triticina* may have arisen from somatic hybridization of different strains. It has been already confirmed that phylogenetically related fungal pathogen strains of triticale deriving from wheat and triticale, separately, have fused and adapted to live in new host plants [2].

Both hexaploid triticale and hexaploid wheat possess A and B genomes. The difference is that wheat has the additional D genome and triticale has the R genome instead. It is known that the presence of genes located on the chromosomes from D-genome downregulates the expression of leaf and stem rust resistance genes [21]. Potential of triticale as a crop lies in its ability to withstand several environmental stresses more effective than wheat. Moreover, the resistance of triticale to common wheat diseases is higher [22]. The newly formed triticale had been resistant to most of pathogens attacking wheat and rye until the breakdown of this resistance. Triticale as a hybrid plant has inherited leaf and stripe rust resistance from both progenitor species. The leaf rust isolated from triticale in the field is usually wheat leaf rust *P. triticina* [2]. Triticale is usually resistant to leaf and yellow rust of rye (*P. tritici* f.sp. *secalis*), and is a source of *Lr25*, *Lr26*, *Lr45*, *Yr9,* and *Yr83* effective genes [23,24].

There is relatively small number of reports on *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*, the causal agent of yellow rust. However, recently this pathogen in cereals becomes a production problem worldwide. However, the new triticale yellow rust pathotype, called "Jackie 143 E16 A+ J+" has appeared in 2007. It is virulent for the gene *Yr9*, a stripe rust resistance gene derived from cereal rye, common in most triticale varieties [24].

In general, hexaploid and octoploid triticales were initially resistant or moderately resistant to leaf rust [12]. The resistance however started to be broke down by new races of *Puccinia*. Tyryshkin et al. [25] selected only 24 highly resistant, at the seedling stage, accessions out of 471 tested. Mikhailova et al. [26] tested 416 triticale accessions and found only 17 leaf rust resistant triticale accessions. Manninger [27] tested the resistance of eight winter triticale accessions to leaf rust at seedling and adult stage. Cultivars Presto, Tricolor, Disco, GK Bogo, Kitaro, and Pongo were proven resistant at the seedling stage to three pathotypes of wheat leaf rust and susceptible only to one pathotype. Only two cultivars Presto and Tricolor have been proved to be resistant to leaf rust at adult stage. Manninger tested also resistance of wheat to leaf rust. Most pathotypes identified were virulent to resistant genes (*Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr21,* and *Lr26*). Pathotypes from triticale were virulent only to *Lr2b*, *Lr2c,* and *Lr11*. Czajkowski et al. [28] conducted an analysis of susceptibility of 250 lines of winter triticale to *P. triticina* in the 2007/2008 and 2012/2013 growing seasons. They showed that at a seedling stage 28% of examined genotypes were slightly affected by pathogen deriving from triticale and 83.2% by fungus isolated from wheat. It may indicate that the pathogen has specialized against specific sets of *Lr* genes. Adult stage analyses after manual inoculation showed that 56.8% of triticale forms were slightly

affected by pathogen, whereas only 4.8% were strongly and 38.4% moderately affected. Analysis of susceptibility of triticale in the natural inoculation conditions showed that slightly affected genotypes turned to be predominant (79.2%). Only 3.2% of genotypes were strongly and 17.6% moderately affected. Grzesik and Strzembicka [29], in order to determine identity of genes taking part in resistance of triticale against leaf rust, crossed resistant cultivars: Presto, Ugo, and Vero in all combinations. The greenhouse and field inoculation trials of F1 and F2 showed that all plants were resistant against 65a/95 *P. triticina* strain, similarly as parental forms. Results of this experiment indicate that this resistance is determined by *Lr* genes of the same mechanism of action. Presto and Vero cultivars are similar and derive from Hungarian material developed by Kiss basing on the *Triticum turgidum* plasma and American developed by Jenkins and basing on *Triticum durum* plasma. Ugo cultivar has also *T. durum* plasma-deriving material in its ancestry. The resistance of many *T. durum* bases on the *Lr23* gene and in some cases also *Lr3*, *Lr10* and *Lr13*. Previous study of Grzesik and Strzembicka [30] revealed that resistance of triticale to *Puccinia recondita* (Eriks. & E.Henn.) D.M.Henderson 65a/95 strain in the seedling stage in Presto and Ugo cultivars is determined by two leaf rust resistance genes and in Vero cultivar by one dominant *Lr* gene. In the adult stage the resistance was determined by 1–3 *Lr* genes. The interaction between *Puccinia* and triticale is very dynamic. Species of pathogenic rust fungi deriving from both wheat and rye hosts are able to evolve by favorable single-step mutations within their genomes or somatic hybridization, acquiring new characteristics [2]. Therefore, resistance to leaf and stripe rust, in the present day, needs to be enhanced. The most economic, and environmentally friendly, safe and effective way to control the disease and to minimize losses is growing resistant cultivars. Wild relatives of wheat and triticale have been used as a secondary gene pool and source of leaf and stripe rust resistance genes.

3. The Use of *Aegilops* Species for Improvement Leaf and Stripe Rust Resistance in Hexaploid Triticale

High genetic variability of *Aegilops* species makes them valuable secondary gene pool for wheat and triticale to improve. There is a number of *Lr* and *Yr* genes identified in *Aegilops* species [17]. Many of them have already been introduced into wheat and some into triticale [31–33] (Table 1). Kwiatek et al. [34] initiated a scientific project, which aimed to transfer of chromosome segments of wild goatgrasses (*Aegilops* sp.) carrying genes responsible for resistance against fungal diseases into triticale. The intermediate step of introducing desirable genes from *Aegilops* into triticale genome was to develop amphiploid lines between triticale and certain *Aegilops* ssp. carrying desirable trait [7]. Considering that additional genome/s may negatively impact on the hybrid development and decrease the crop yield, subsequent backcrossing were performed in order to reduce the genetic linkage-drag (Figure 1).

Table 1. Leaf and stripe rust resistance genes transferred from *Aegilops* species into triticale genome through distant hybridization followed by back-crossing.

Species	Resistance Genes (Chromosomal Location)	References
Ae. tauschii	*Lr22a* (2DS)	[31,33]
	Lr32 (3D)	[31]
	Lr39 (2DS)	[31,33]
Ae. kotschyi Boiss.	*Lr54* ($2S^kL$)	[32,34]
	Yr37 ($2S^kL$)	[32,34]

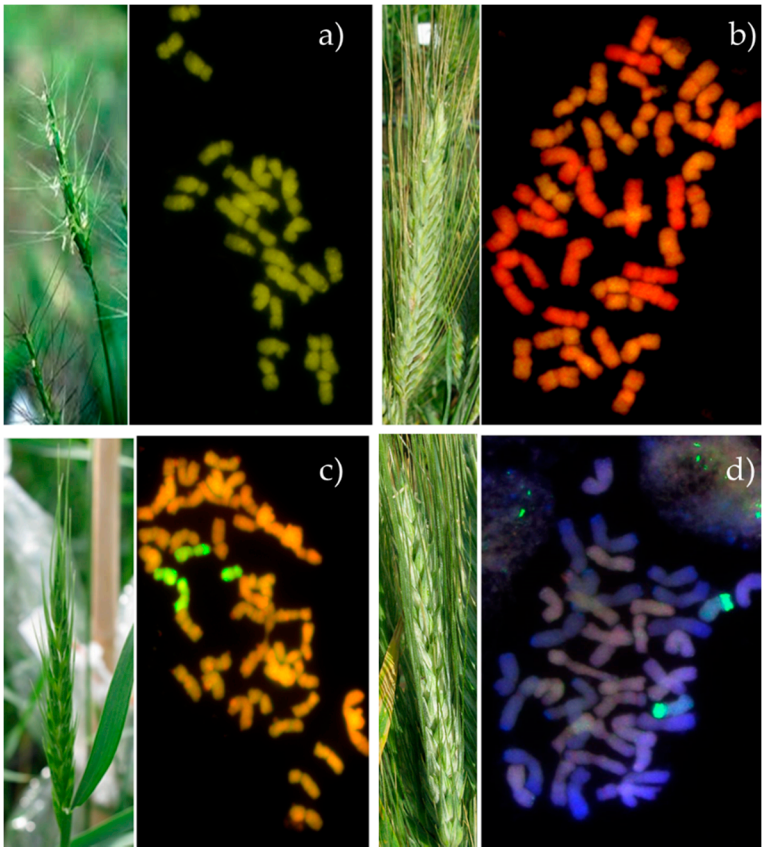

Figure 1. Transfer of alien chromatin segment from (**a**) *Aegilops kotschyi* (green) into triticale (**b**) through subsequent backcrossing, which results in development of (**c**) addition and (**d**) translocation lines. On the left—pictures of spikes; on the right—karyotypes revealed by genomic in situ hybridization.

The next step was to develop addition, substitution and translocation lines carrying desirable gene or group of genes associated only with the minimal amount of chromatin [7,35]. *Ae tauschii* is a rich source of leaf rust resistance genes. Kwiatek et al. [31] have used *Aegilops tauschii* × *Secale cereale* (DDRR, $2n = 4x = 28$) amphiploid forms as a bridge between wild and cultivated forms to develop two monosomic addition lines of triticale cv Bogo carrying $2D^t$ (with *Lr22a* and *Lr39*) and $3D^t$ (with *Lr32*) chromosomes. Both genes were already utilized for improvement of wheat leaf rust resistance. *Lr22a* is an adult plant resistance gene, which was introgressed from *Aegilops tauschii* [36]. *Lr39* gene was also transferred into wheat (cultivar Wichita) from *Aegilops tauschii* accession TA 1675 [37]. Furthermore, Majka et al. [33] analyzed the leaf rust resistance of monosomic $2D^t$ addition lines of cv. Bogo genotypes at the macroscopic and microscopic level at the seedling. A board spectrum of *P. triticiana* was used including isolates virulent to both *Lr22a* and *Lr39* genes. The results showed, that hybrid plants revealed a moderate level of leaf rust resistance at the seedling stage. It was also reported, that triticale cv. Bogo is already very resistant and the introgression of complete $2D^t$ chromosome with *Lr39* gene showed no additional effect. Following observations showed increasing resistance level at later stages of plant development. This indicates that monosomic $2D^t$ addition plants exhibited APR resistance conferred by *Lr22a* introgressed from *Ae. tauschii*. Moreover, Majka et al. [33] used this material to produce 26 doubled haploid lines with doubled additional chromosomes 2D of *Ae. tauschii*, which can be used for further breeding to increase leaf rust resistance of cultivated triticale. Moreover, Kwiatek et al. (in press) developed translocation lines of triticale cv. Bogo with *Lr39* locus; however, leaf rust resistance was similar to cv. Bogo.

In another study, Kwiatek et al. [34] obtained monosomic addition and monosomic substitution lines of the triticale carrying $2S^k$ chromosome from *Aegilops kotchyi* Boiss., which harbors *Lr54* + *Yr37* leaf and stripe rust resistant gene loci, respectively. These genes were discovered and transferred into

wheat [38]. Marais et al. [38] mapped the translocation of *Ae. kotschyi* chromosome segment to wheat chromosome arm 2DL and reported an improvement of resistance against to eight *P. triticina* pathotypes and two *P. striiformis* pathotypes endemic to South Africa. Kwiatek et al. [36] analyzed five subsequent backcrossing generations and showed that $2S^k$ chromosome was preferentially transmitted, which allowed to develop a monosomic $2S^k$ addition (MA2Sk) line of triticale cv. Sekundo. Moreover, $2S^k$(2R) substitution plants were obtained by crossing MA$2S^k$ with the nullisomic (N2R) plants of triticale. Disease evaluation for the reaction to leaf and stripe rust infection showed significant improvement of leaf rust resistance severity of monosomic substitution plants compared to control ("Sekundo"). In contrast, the introgression of the *Lr54* + *Yr37* loci did not lead to improvement of stripe rust resistance. Ulaszewski et al. [32] crossed monosomic $2S^k$(2R) plants with ditelosomic lines of triticale carrying long and short arms of 2R (2RS and 2RL) chromosome separately. The efficiency of production of ditelosomic lines of triticale with chromosome $2S^k$ of *Ae. kotschyi* carrying leaf and stripe rust resistance genes was at the level of 7.21%. Then, obtained outcross was self-pollinated. Among 100 plants 13% of $2S^k$ univalents have been broken in the centromeres at first anaphase of meiosis into long and short arms. In 11% of analyzed plants observed both $2S^k$S.2RL and 2RS.$2S^k$L Robertsonian translocation (RobTs) which is a fusion of arms from different genomes during the interkinesis of the second meiotic division of self-pollinated outcross [32]. The inoculation tests in growing chambers showed significant improvement of leaf resistance for translocation lines, comparing to cv. Sekundo (Kwiatek—in press).

4. Conclusions

Distant crosses are very laborious and time consuming but only non-GM breeding techniques aimed for introduction of alien chromatin into a donor crop. Above-described studies showed, that secondary genepool of wheat could be successfully introduced into genome of triticale. Addition, substitution, and translocation lines of triticale are unique genetic stocks and can be used as a pre-breeding material for development of leaf and stripe resistant varieties. This type of pre-breeding research is extremely important considering homogeneity of triticale varieties, which reflects greater susceptibility for pathogens, recently. Genetic uniformity of triticale may be increasing on a global scale because of the widespread adoption of modern varieties with similar genetic backgrounds across continents. Moreover, susceptibility to environmental stresses, including diseases can have a real impact on the food supply and regional economy. Hence, utilization of wild species is one of the ways of decreasing crop susceptibility to natural stresses.

Author Contributions: Conceptualization, W.U.; formal analysis, W.U.; writing—original draft preparation, W.U. and M.T.K.; writing—review and editing, W.U. and M.T.K.; supervision, M.T.K.; project administration, M.T.K.; funding acquisition, M.T.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research and the APC were funded by NATIONAL CENTRE FOR RESEARCH AND DEVELOPMENT, Poland (Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Polska), grant number LIDER/3/0004/L-8/16/NCBR/2017, PI—Michał Tomasz Kwiatek.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the administrative support provided by the Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. OECD/FAO. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018–2027*; OECD/FAO: Rome, Italy, 2018; ISBN 978-92-64-06203-0.
2. Arseniuk, E. Triticale Abiotic Stresses—An Overview. In *Triticale*; Eudes, F., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 69–81, ISBN 978-3-319-22551-7.
3. Ayalew, H.; Kumssa, T.T.; Butler, T.J.; Ma, X.-F. Triticale Improvement for Forage and Cover Crop Uses in the Southern Great Plains of the United States. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1130. [CrossRef] [PubMed]
4. Woś, H.; Brzeziński, W. Triticale for Food—The Quality Driver. In *Triticale*; Eudes, F., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 213–232, ISBN 978-3-319-22551-7.

5. Glatthar, J.; Heinisch, J.J.; Senn, T. The Use of Unmalted Triticale in Brewing and its Effect on Wort and Beer Quality. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2003**, *61*, 182–190. [CrossRef]
6. Klikocka, H.; Kasztelan, A.; Zakrzewska, A.; Wyłupek, T.; Szostak, B.; Skwaryło-Bednarz, B. The Energy Efficiency of the Production and Conversion of Spring Triticale Grain into Bioethanol. *Agronomy* **2019**, *9*, 423. [CrossRef]
7. Kwiatek, M.T.; Nawracała, J. Chromosome manipulations for progress of triticale (×*Triticosecale*) breeding. *Plant Breed.* **2018**, *137*, 823–831. [CrossRef]
8. Mergoum, M.; Gómez-Macpherson, H. Triticale improvement and production. In *FAO Plant Production and Protection Papers*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2004; p. 179.
9. Kiss, A. Kreuzungsversuche mit Triticale [Crossing experiments with Triticale]. *Züchter Genet. Breed. Res.* **1966**, *36*, 249–255. [CrossRef]
10. Larter, E.N.; Shebeski, L.H.; McGinnis, R.C.; Evans, L.E.; Kultsikes, P.J. Rosner, a hexaploid triticale cultivar. *Can. J. Plant Sci.* **1970**, *50*, 122–124. [CrossRef]
11. Niedziela, A.; Orłowska, R.; Machczyńska, J.; Bednarek, P.T. The genetic diversity of triticale genotypes involved in Polish breeding programs. *Springerplus* **2016**, *5*, 355. [CrossRef]
12. Arseniuk, E. Triticale Diseases—A Review. In *Triticale: Today and Tomorrow*; Springer Science & Business Media: Cham, Switzerland, 1996; pp. 499–525, ISBN 978-94-010-6634-1.
13. Kolmer, J.A. Wheat Rusts. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*; Goodman, R.M., Ed.; Routledge: Abingdon, UK, 2004.
14. Lorrain, C.; dos Santos, K.C.G.; Germain, H.; Hecker, A.; Duplessis, S. Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytol.* **2019**, *222*, 1190–1206. [CrossRef]
15. Prasad, P.; Savadi, S.; Bhardwaj, S.C.; Gupta, P.K. The progress of leaf rust research in wheat. *Fungal Biol.* **2020**, *124*, 537–550. [CrossRef]
16. Schwessinger, B.; Chen, Y.J.; Tien, R.; Vogt, J.K.; Sperschneider, J.; Nagar, R.; McMullan, M.; Sicheritz-Ponten, T.; Sørensen, C.K.; Hovmøller, M.S.; et al. Distinct Life Histories Impact Dikaryotic Genome Evolution in the Rust Fungus *Puccinia striiformis* Causing Stripe Rust in Wheat. *Genome Biol. Evol.* **2020**, *12*, 597–617. [CrossRef]
17. McIntosh, R.; Dubcovsky, J.; Rogers, W.J.; Morris, C.; Xia, X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Available online: https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp (accessed on 10 October 2020).
18. Gill, B.S.; Friebe, B.R.; White, F.F. Alien introgressions represent a rich source of genes for crop improvement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7657–7658. [CrossRef] [PubMed]
19. Swiecicka, M.; Dmochowska-Boguta, M.; Orczyk, W.; Gradzielewska, A.; Stochmal, A.; Kowalczyk, M.; Bolibok, L.; Rakoczy-Trojanowska, M. Changes in benzoxazinoid contents and the expression of the associated genes in rye (*Secale cereale* L.) due to brown rust and the inoculation procedure. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0233807. [CrossRef] [PubMed]
20. Park, R.F.; Wellings, C.R. Somatic hybridization in the uredinales. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2012**, *50*, 219–239. [CrossRef] [PubMed]
21. Bai, D.; Knott, D. Suppression of rust resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by D-genome chromosomes. *Genome* **2011**, *35*, 276–282. [CrossRef]
22. Rodriguez-Algaba, J.; Sørensen, C.K.; Labouriau, R.; Justesen, A.F.; Hovmøller, M.S. Susceptibility of Winter Wheat and Triticale to Yellow Rust Influenced by Complex Interactions between Vernalisation, Temperature, Plant Growth Stage and Pathogen Race. *Agronomy* **2020**, *10*, 13. [CrossRef]
23. Li, J.; Dundas, I.; Dong, C.; Li, G.; Trethowan, R.; Yang, Z.; Hoxha, S.; Zhang, P. Identification and characterization of a new stripe rust resistance gene *Yr83* on rye chromosome 6R in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **2020**, *133*, 1095–1107. [CrossRef]
24. Wellings, C. Global status of stripe rust. In Proceedings of the BGRI 2010 Technical Workshop Oral Presentations, St Petersburg, Russia, 30–31 May 2010; pp. 34–35.
25. Tyryshkin, L.G.; Kurbanova, P.M.; Kurkiev, K.U.; Sarukhanov, I.G.; Kurkiev, U.K. Effective juvenile resistance to brown rust in hexaploid triticale. *Zaščita Karantin Rastenij* **2008**, *10*, 25.
26. Mikhailova, L.A.; Merezhko, A.F.; Funtikova, E.Y. Triticale diversity in leaf rust resistance. *Russ. Agric. Sci.* **2009**, *35*, 320–323. [CrossRef]
27. Manninger, K. Physiological Specialization of *Puccinia triticina* on Wheat and Triticale in Hungary in 2004. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* **2006**, *41*, 93–100. [CrossRef]

28. Czajkowski, G.; Karska, K.; Strzembicka, A. Characteristic of winter triticale breeding lines in term of the degree of infestation by *Puccionia triticiana* and *Blumeria graminis*. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Roślin* **2013**, *268*, 59–67.
29. Grzesik, H.; Strzembicka, A. Resistance of some winter triticale varieties to leaf rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*). *Biul. Inst. Hod. Aklim. Roślin* **2003**, *230*, 171–175.
30. Grzesik, H.; Strzembicka, A. Studies on inheritance of the resistance to leaf rust (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) of winter triticale varieties at the seedling and adult plant stages. *Plant Breed. Seed Sci.* **1999**, *43*, 85–89.
31. Kwiatek, M.; Majka, M.; Wiśniewska, H.; Apolinarska, B.; Belter, J. Effective transfer of chromosomes carrying leaf rust resistance genes from *Aegilops tauschii* Coss. into hexaploid triticale (X *Triticosecale* Witt.) using *Ae. tauschii* × *Secale cereale* amphiploid forms. *J. Appl. Genet.* **2015**, *56*, 163–168. [CrossRef] [PubMed]
32. Ulaszewski, W.; Belter, J.; Wiśniewska, H.; Szymczak, J.; Skowrońska, R.; Phillips, D.; Kwiatek, M. Recovery of 2R.2S^{k} Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations. *Agronomy* **2019**, *9*, 646. [CrossRef]
33. Majka, M.; Serfling, A.; Czembor, P.; Ślusarkiewicz-Jarzina, A.; Kwiatek, M.T.; Ordon, F.; Wiśniewska, H. Resistance of (*Aegilops tauschii* × *Secale cereale*) × *Triticosecale* Hybrids to Leaf Rust (*Puccinia triticina*) Determined on the Macroscopic and Microscopic Level. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1418. [CrossRef]
34. Kwiatek, M.T.; Wiśniewska, H.; Belter, J.; Ulaszewski, W.; Phillips, D. Development and cytomolecular identification of monosomic alien addition and substitution of 2S^{k} chromosome from *Aegilops kotschyi* to triticale (×*Triticosecale* Wittmack). *Front. Plant Sci.* **2020**. [CrossRef]
35. Kwiatek, M.T.; Kurasiak-Popowska, D.; Mikołajczyk, S.; Niemann, J.; Tomkowiak, A.; Weigt, D.; Nawracała, J. Cytological markers used for identification and transfer of *Aegilops* spp. chromatin carrying valuable genes into cultivated forms of *Triticum*. *Comp. Cytogenet.* **2019**, *13*, 41–59. [CrossRef]
36. Rowland, G.G.; Kerber, E.R. Telocentric mapping in hexaploid wheat of genes for leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa*. *Can. J. Genet. Cytol.* **1974**, *16*, 137–144. [CrossRef]
37. Gill, B.S.; Raupp, W.J.; Browder, L.E.; Cox, T.S. Registration of KS86WGRC02 Leaf Rust Resistant Hard Red Winter Wheat Germplasm. *Crop Sci.* **1988**, *28*, 207. [CrossRef]
38. Marais, G.F.; McCallum, B.; Marais, A.S. Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr54* and *Yr37* transferred to wheat from *Aegilops kotschyi*. *Plant Breed.* **2005**, *124*, 538–541. [CrossRef]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

10.2 Oświadczenia współautorów

Poznań, 20.05.2021

Mgr Waldemar Ulaszewski

Zakład Struktury i Funkcji Genów

Instytut Genetyki Roślin

Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w ramach pracy:

Waldemar Ulaszewski, Michał T. Kwiatek (2020), ***Aegilops* Species for the Improvement of the Leaf and Stripe Rust Resistance in Cultivated Triticale (×*Triticosecale* Wittmack)**. *Agronomy* 10(12), 1991., doi: https://doi.org/10.3390/agronomy10121991

- zaproponowałem tytuł oraz wybrałem zagadnienia omawiane w publikacji
- uczestniczyłem w przygotowaniu pierwotnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu
- brałem udział w edycji manuskryptu

Waldemar Ulaszewski

Podpis

Poznań, 20.05.2021

Prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Waldemar Ulaszewski, Michał T. Kwiatek (2020), ***Aegilops* Species for the Improvement of the Leaf and Stripe Rust Resistance in Cultivated Triticale (×*Triticosecale* Wittmack)**. *Agronomy* 10(12), 1991., doi: https://doi.org/10.3390/agronomy10121991

byłem zaangażowany w:

- przygotowanie pierwotnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu.
- nadzór realizacji
- pozyskanie środków finansowych na wydanie publikacji.

.....

Podpis

11. Publikacja nr 2

11.1 Tekst publikacji

1. Michał T. Kwiatek, Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Dylan Phillips, Roksana Skowrońska, Aleksandra Noweiska, Halina Wiśniewska (2020). **Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^{k} Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss**:, Frontiers in Plant Science. doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481

frontiers in Plant Science

ORIGINAL RESEARCH
published: 14 December 2020
doi: 10.3389/fpls.2020.509481

Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^k Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss

Michał T. Kwiatek[1], Waldemar Ulaszewski[1], Jolanta Belter[1], Dylan Phillips[2], Roksana Skowrońska[3], Aleksandra Noweiska[3] and Halina Wiśniewska[1]*

[1] Department of Genomics, Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences, Poznañ, Poland, [2] Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, Aberystwyth, United Kingdom, [3] Department of Genetics and Plant Breeding, Poznañ University of Life Sciences, Poznañ, Poland

OPEN ACCESS

Edited by:
Geoffrey Meru, University of Florida, United States

Reviewed by:
Zujun Yang, University of Electronic Science and Technology of China, China
Rudolph Fredua-Agyeman, University of Alberta, Canada

***Correspondence:**
Michał T. Kwiatek
michal.kwiatek@up.poznan.pl
orcid.org/0000-0001-9442-3124

Specialty section:
This article was submitted to Plant Breeding, a section of the journal Frontiers in Plant Science

Received: *01 November 2019*
Accepted: *14 October 2020*
Published: *14 December 2020*

Citation:
Kwiatek MT, Ulaszewski W, Belter J, Phillips D, Skowrońska R, Noweiska A and Wiśniewska H (2020) Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×Triticosecale Wittmack) With 2S^k Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From Aegilops kotschyi Boiss. Front. Plant Sci. 11:509481. doi: 10.3389/fpls.2020.509481

Alien chromosome introgression has become a valuable tool to broaden the genetic variability of crop plants via chromosome engineering. This study details the procedure to obtain monosomic addition and monosomic substitution lines of the triticale carrying 2S^k chromosome from *Aegilops kotchyi* Boiss., which harbors *Lr54* + *Yr37* leaf and stripe rust-resistant gene loci, respectively. Initially, *A. kotschyi* × *Secale cereale* artificial amphiploids (2*n* = 6*x* = 42 chromosomes, UUSSRR) were crossed with triticale cv. "Sekundo" (2*n* = 6*x* = 42, AABBRR) in order to obtain fertile offspring. Cytomolecular analyses of five subsequent backcrossing generations revealed that 2S^k chromosome was preferentially transmitted. This allowed for the selection of monosomic 2S^k addition (MA2S^k) lines of triticale. Finally, the 2S^k(2R) substitution plants were obtained by crossing MA2S^k with the nullisomic (N2R) plants of triticale. The presence of 2S^k chromosome in subsequent generations of plants was evaluated using SSR markers linked to *Lr54* + *Yr37* loci. Disease evaluation of the monosomic 2S^k(2R) substitution plants for the reaction to leaf and stripe rust infection were carried out under controlled conditions in a growth chamber. The results showed significant improvement of leaf rust resistance severity of monosomic substitution plants compared with control ("Sekundo"). In contrast, the introgression of the *Lr54* + *Yr37* loci did not lead to improvement of stripe rust resistance. In summary, the creation of monosomic addition and monosomic substitution lines of triticale is the starting point for the precise and guided transfer of *Lr54* + *Yr37* loci. The results showed that the developed materials could be exploited for the development of triticale varieties with resistance to leaf rust.

Keywords: back-cross, fluorescence in situ hybridization, molecular markers, monosomic, resistance genes, triticale 2, Aegilops kotschyi

INTRODUCTION

Wild relatives and related species with homoeologous genomes are important for broadening the genetic variability of crop plants. For many crops, wild relatives provide a vast reservoir for most of agronomically important traits. A large number of the highest yielding wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars carry portions of alien chromatin introgression from related crops (*Secale cereale* L.) or weedy species (*Aegilops* sp., *Dasypyrum* sp., *Elymus* sp. *Haynaldia* sp.) (Gill et al., 2011). The *Aegilops* genus is the closest wild relative of bread wheat (*T. aestivum*; $2n = 6x = 42$ chromosomes; AABBDD) or triticale (× *Triticosecale* Wittmack; $2n = 6x = 42$; AABBRR). It contains 11 diploid, 10 tetraploid, and 2 hexaploid species and provides a vast reservoir of valuable genes, which were eliminated during the domestication and breeding of cultivated cereals.

Aegilops kotschyi Boiss. ($U^kU^kS^kS^k$, $2n = 4x = 28$) is valuable from genetic and breeding point of view as it carries genes associated with disease resistance, drought, heat, salt tolerance, as well as other beneficial traits (Schneider et al., 2008). Rawat et al. (2009) utilized *A. kotschyi* as a source of genes to increase the iron and zinc content in seeds of wheat. *A. kotschyi* was crossed as a male parent with bread wheat line "Chinese Spring" lacking the *Ph1* locus, which is a suppressor of homeologous pairing in wheat (Riley and Chapman, 1958). The aim of their study was to bring the genes associated with increased iron and zinc content in seeds, harbored in the $2S^k$ and $7U^k$ chromosomes of *A. kotschyi*, into the genome of wheat. They obtained only a $2S^k$ and $7U^k$ chromosome substitution line, which were not very suitable for commercial exploitation due to linkage drag. It is also reported that chromosome $2S^k$ of *A. kotschyi* possess leaf and stripe rust-resistant loci of *Lr54* and *Yr37* genes (Marais et al., 2005; Prażak and Paczos-Grzęda, 2013). Marais et al. (2005) have introduced *A. kotschyi*-derived leaf and stripe rust-resistant genes *Lr54* and *Yr37* to the wheat genome by the induction of $2DS.2S^kL$ chromosome translocation.

Polyploids, such as of cultivated forms wheat or triticale, contain multiple sets of chromosomes and have highly buffered genotypes that are more permissive to benefit from alien introgression than diploids (Qi et al., 2007). Monosomic alien addition lines (MAALs) contain only one alien chromosome in addition to the receptor background chromosomes. The production of monosomic addition lines rely on backcrosses with an acceptor crop (Faris et al., 2002; Brar and Dhaliwal, 2004; Wulff and Moscou, 2014; Kwiatek and Nawracała, 2018). In traditional breeding of intraspecific hybrids, the recurrent backcrossing is commonly employed to transfer alleles at one or more loci from a donor to an elite variety (Veatch-Blohm, 2007). The expected recurrent parent genome recovery would be 99.2% at the end of six backcrossing, which is most similar to improved variety. The proportion of the recurrent parent genome is recovered at a rate of $1 - (1/2)^{t+1}$ for each of the generations of backcrossing (Singh and Singh, 2015). When generating interspecific hybrids, backcrossing is required to generate addition, substitution, and translocation lines. In wheat and triticale, chromosome pairing between homologous chromosomes is strictly regulated by the expression of *Ph1* and *Ph2* loci (Riley and Chapman, 1958; Sears, 1977). Thus, subsequent backcrosses eliminate the alien chromatin gradually. However, the alien chromosome can be transmitted to the offspring preferentially, which contributes to the saturation of specific chromosomes (Endo, 2007).

Some *Aegilops* chromosomes were reported to be transmitted preferentially to the offspring in the process of backcrossing to produce alien chromosome addition lines of wheat (Endo, 2007) and triticale (Kwiatek et al., 2016c). The gametocidal activity of genes located on chromosome $4S^{sh}$ from *A. sharonensis* Eig is an example of when a chromosome is preferentially eliminated (Endo, 1990). Such chromosomes were reported to carry gametocidal factors (*Gc*s) (Endo, 1985). These chromosomes are known to remain in host plants in a "selfish" way. The preferential transmission of *Gc* chromosomes result from the elimination of gametes that lack them, while the gametes with the *Gc* chromosomes remain fertile (Nasuda et al., 1998). *Gc* factors cause extensive chromosome breakage, which results in the induction of non-functional gametes and exclusive transmission of the *Gc* chromosome to the offspring (Nasuda et al., 1998). *Gc*s have been reported in *A. geniculata*, *A. triuncialis*, *A. caudata*, *A. cylindrica, A. longissima*, *A. sharonensis*, and *A. speltoides*. Their activity is mostly confined to 2, 3, and 4 homeologous groups of C, S, S^1, S^{sh}, and M^g genomes. It has been reported that *Gc* genes can be constructively utilized for development of addition, deletion and translocation stocks in wheat (Endo, 2007) and triticale (Kwiatek et al., 2017b).

Monosomic alien addition and substitution lines (MAALs and MASLs) are widely used as linking bridges for the transfer of desirable genes from wild species into elite cultivars. For example, wheat-rye addition, substitution, and translocation lines are used as pre-breeding materials for the improvement of wheat (Lukaszewski, 2000, 2016) and triticale (Lukaszewski, 2006). MASLs can be used to identify favorable genes in wild species, allowing for more accurate and rapid transfer of such genes to create introgression lines. Such initiatives provide the opportunity to examine the effect of specific alien (Edet et al., 2018) and to construct the physical maps of specific chromosomes (Kynast et al., 2001). MASLs are produced by crossing monosomic or nullisomic acceptors with appropriate addition lines (Sears, 1972). The missing chromosome of acceptor plant is substituted by the donor homoeologue. The production of substitution lines for alien chromosomes is the initial step for direct introgression of specific alien chromosome segments into the acceptor genome (Lukaszewski, 2000, 2017). One of the most common procedures that reduce the amount of alien chromosome present is the induction of crop-alien Robertsonian translocations (RobTs). This approach requires a set of specific genetic stock plants, including MAALs or MASLs as a donor, and monosomic plants with a single acceptor chromosome (Kwiatek et al., 2017b).

The main aim of this study was to generate the monosomic addition and substitution line of triticale with introgression of alien $2S^k$ chromosome derived from *A. kotschyi*, which could be used for efficient study and transfer of genes responsible for leaf and stripe rust resistance.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

An artificial amphidiploid line of *Aegilops kotschyi* × *Secale cereale* (2*n* = 6*x* = 42; $U^kU^kS^kS^kRR$) (**Figure 1**) was obtained by Wojciechowska and Pudelska (2002) from a cross between *A. kotschyi* Boiss. (no. 14,808; kindly provided from Prof. Taihachi Kawahara, Kyoto University, Kyoto, Japan; **Figures 2a,b**), and diploid rye "Dankowskie Złote" (Danko Hodowla Roślin sp. z o.o.). Triticale "Sekundo" (Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o.) was used as a pollinator for F_1 seed production and five subsequent backcrosses (**Figure 3**). Nullisomic (N2R) line of triticale were developed by Kwiatek et al. (2016c) and used for crossing with monosomic alien addition of $2S^k$ chromosome to produce monosomic $2S^k$(2R) substitution plants of triticale (**Figure 3**). Cross-hybridization was made in greenhouse of the Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences. Anthers of maternal plants were emasculated and spikes isolated using paper bags, in order to avoid uncontrolled pollination. Mature stigmas were pollinated with the pollen of triticale "Sekundo." Crossing efficiency percentage was calculated by dividing of the total amount of seeds with total number of pollinated flowers.

Cytogenetic Studies

Accumulation of cells at mitotic metaphase and fixation was carried out according to Kwiatek et al. (2017b). Root meristems were digested at 37°C for 2 h and 40 min in an enzymes solution containing 0.2% (*v*/*v*) Cellulase Onozuka R-10 and Calbiochem cytohelicase (1:1 ratio) and 20% pectinase (Sigma), in 10 mM citrate buffer (pH 4.6). Digested root tips were placed on slides with a drop of ice-cold 60% acetic acid and squashed. The coverslips were removed with a razor after liquid nitrogen treatment.

Probe Preparation and Fluorescence *in situ* Hybridization

Total genomic DNA was purified using GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland). DNA of *Aegilops sharonensis* Eig (a progenitor of the S^k-genome of *A. kotschyi*; PI 551020, U.S. National Plant Germplasm System) and *A. umbellulata* (a progenitor of the U^k-genome of *A. kotschyi*; PI 298905, U.S. National Plant Germplasm System) were labeled by nick translation with Atto-488NT and Atto-550NT kits (Jena Bioscience, Jena, Germany), respectively. Blocking DNA from triticale "Sekundo" was prepared by boiling for 30–45 min (1:50 probe:block ratio). Chromosomes were identified using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with the repetitive sequences from pTa-86, pTa-535, pTa-103 (centromere specific), and pTa-k374 (homologous to ribosomal DNA sequence 28S) clones described by Komuro et al. (2013). Clones were amplified from genomic DNA of "Chinese Spring" wheat (Kwiatek et al., 2016b; Goriewa-Duba et al., 2018) and labeled using Atto-488NT, Atto-550NT, and Atto-647NT nick translation kits (Jena Bioscience, Germany). FISH/genomic *in situ* hybridization (GISH) experiments were performed according to Kwiatek et al. (2017b). Slides were examined with the Olympus BX 61 automatic epifluorescence microscope equipped with Olympus XM10 CCD camera. Image processing was performed using Olympus Cell-F (version 3.1; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH: Münster, Germany). Chromosomes of *Aegilops* and triticale were identified by comparing the signal patterns of the probes (Badaeva et al., 2004; Komuro et al., 2013; Kwiatek et al., 2013; Ruban and Badaeva, 2018).

SSR Marker Analysis

The SSR marker S14-410 (forward primer: 5′-ACCAATT CAACTTGCCAAGAG-3′; reverse primer: 5′-GAGTAACATG CAGAAAACGACA-3; Smit, 2013) closely linked to the *Lr54* + *Yr37* loci on the $2S^k$ chromosome was used to genotype genomic DNA of the plant materials. Genomic DNA of *Aegilops kotschyi*, triticale "Sekundo" and the hybrid plants were isolated using Plant DNA Purification Kit (EurX Ltd., Gdańsk, Poland). PCR reactions were performed in a LabCycler thermal cycler (SensoQuest Biomedizinische Elektronik, Goettingen, Germany). The PCR reaction consisted of 150 nM each primer (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 0.2 mM of each nucleotide, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 units of Taq-DNA hot-start polymerase (TaqNovaHS, Blirt, Gdańsk, Poland), and 50 ng of genomic DNA as a template. The PCR conditions were as follows: 5 min at 95°C, then 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 61°C, 1 min at 72°C, and 5 min at 72°C. Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe) was added to each amplification product and analyzed by gel electrophoresis on 2% agarose gel (LabEmpire, Poznań, Poland). Gels were visualized and photographed using EZ GelDoc System (BioRad, Hercules, CA, United States).

Evaluation of Leaf Rust Symptoms in Growth Chamber

Evaluation of the response of monosomic substitution plants on leaf rust infection was conducted in the growth chamber (at IPG PAS) using leaf and stripe rust urediniospores, which were collected separately from triticale fields in three localizations in Wielkopolska region: IPG PAS Experimental Station in Cerekwica, Poland (52° 31′ 16″ N, 16° 41′ 30″ E); Experimental Station of the Poznań University of Life Sciences (PULS), Dłoń, Poland (51°41′22″N 17°04′23″E); and Experimental Garden of the Department of Genetics and Plant Breeding (PULS) in Poznań (52° 25′ 26″ N, 16° 54′ 07″ E). The leaf and stripe rust symptoms were scored in two independent and separate experiments (**Figure 4**). Both experiments were repeated. Each experiment repeat included forty monosomic $2S^k$(2R) substitution plants and forty control plants ("Sekundo"), which were sprayed with leaf rust urediniospore solution containing 0.1% Tween 20, at three-leaf stage. Another 160 plants were sprayed with stripe rust urediniospore solution. The inoculated plants were then incubated in a humid growth chamber free from light for 10 days. After inoculation, the plants were maintained under a day/night photoperiod of 18/6 h, a temperature of 16–22°C. Winter triticale cv. "Sekundo" was taken as the susceptible control. The infection type of each individual was scored at three timepoints [10, 15, and 20 days post-inoculation (*dpi*)] using an

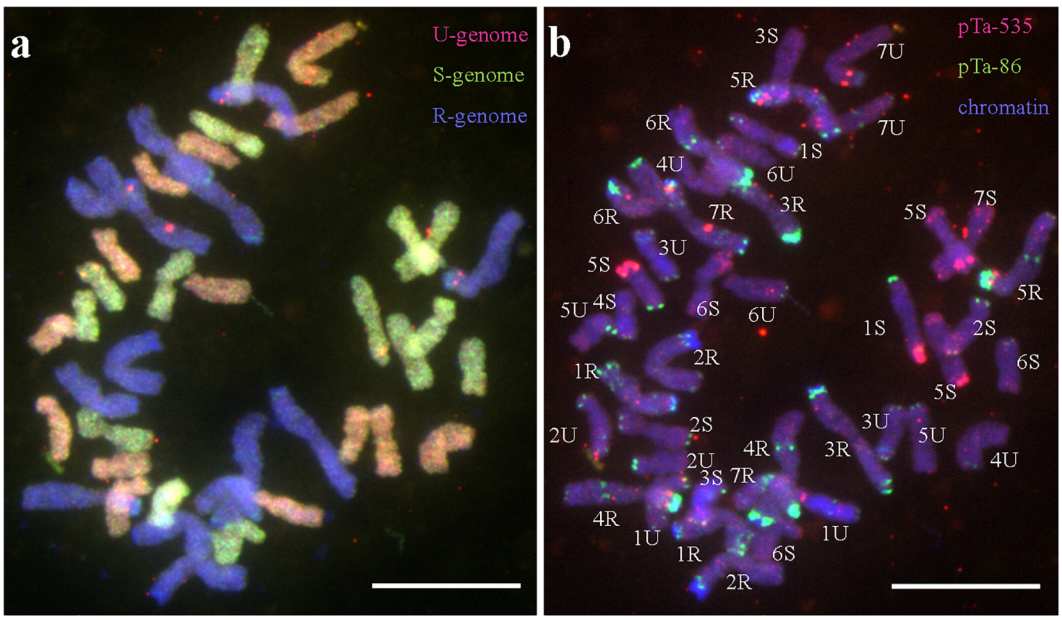

FIGURE 1 | Flourescence/genomic *in situ* hybridization performed on mitotic chromosomes of *A. kotschyi* × *S. cereale* amphiploid. **(a)** U^k- and S^k-genome chromosomes are labeled with Atto-550 (red) and Atto-488 (green), respectively. R-genome chromosomes labeled with DAPI (blue). **(b)** Probes pTa-535 and pTa-86 are labeled with Atto-550 (red) and Atto-488 (green), respectively. Chromosomes counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μm.

infection scale adapted from Roelfs (1988) and transformed into nine-grade scale (1, high resistance; 9, susceptibility, **Tables 2**, **3**; McNeal et al., 1971). The phenotypic data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's highest significant difference (HSD) test.

RESULTS

Production of Monosomic $2S^k$ Addition Plants From Triticale-*A. kotschyi* Hybrids

Seven F_1 plants were produced from a cross between hexaploid triticale "Sekundo" ($2n = 6x = 42$ chromosomes; AABBRR) and hexaploid *A. kotschyi* × *S. cereale* ($2n = 6x = 42$; UUSSRR; **Figure 2c**) hybrid, as a pollen donor. All seven F_1 plants possessed 42 chromosomes including a complete haploid set of chromosomes of *A. kotschyi* (**Figure 5a** and **Table 1**). The number of R-genome chromosomes was 14. Fifteen BC_1F_1 seeds were obtained from 375 flowers of F_1 plants, which were backcrossed using triticale pollen. FISH experiments revealed that chromosomes $1U^k$, $2U^k$, and $7S^k$ were eliminated (**Figure 5b** and **Table 1**). Fiftyone BC_2F_1 seeds were obtained by subsequent backcrossing of BC_1F_1 with triticale "Sekundo." Fifty BC_2F_1 plants were karyotyped (**Table 1**), with the progressive elimination of *Aegilops* chromosomes was observed. The number of U-genome chromosomes varied between 1 and 2. The number of S^k-genome chromosomes was much more diversified and varied between 2 and 6 (**Figure 5c** and **Table 1**). However, two chromosomes ($2S^k$ and $4S^k$) were present in all 50 BC_2F_1 plants (**Table 1**). The BC_2F_1 plants were pollinated with triticale "Sekundo" pollen, and a total number of 234 seeds were obtained. FISH was carried out on 100 BC_3F_1, revealing that chromosome $7U^k$ was present in all plants. Chromosome number of S^k-genome varied between 2 and 3 (**Figure 5d**). As before, chromosomes $2S^k$ and $4S^k$ were present in all 100 BC_3F_1 plants (**Table 1**). Fifty randomly selected plants of 93 BC_4F_1 hybrids were karyotyped using FISH and GISH techniques. Chromosomes of U^k-genome were completely eliminated, but surprisingly chromosomes $2S^k$ and $4S^k$ were present in all 50 BC_4F_1 plants (**Figure 5e** and **Table 1**). The last backcross resulted in formation of 216 BC_5F_1 seeds (**Table 1**). One hundred plants were karyotyped and 99 of them carried additional $2S^k$ chromosomes ($2n = 43$) (**Figure 5f** and **Table 1**). Chromosome $2S^k$ was not present in one BC_5F_1 plant ($2n = 42$) (**Table 1**), and this plant showed centric breaks in three pairs chromosomes (**Figure 6**). Therefore, an investigation of six generations of triticale Sekundo × (*A. kotschyi* × *S. cereale*) hybrids (F_1 to BC_5F_1) by means of molecular cytogenetic methods (FISH and GISH) revealed subsequent elimination of *Aegilops* chromosomes.

Production of Monosomic $2S^k$(2R) Substitution Plants From Triticale-*A. kotschyi* Hybrids

A total number of 468 seeds were obtained from a cross between nullisomic N2R triticale plants ($2n = 40$; **Figures 7a,b**) and monosomic $2S^k$ addition line ($MA2S^kAL$) of triticale (**Figures 7c,d**), as a pollen donor. 6,486 flowers of N2R plants were emasculated and pollinated with $MA2S^k$ pollen. The

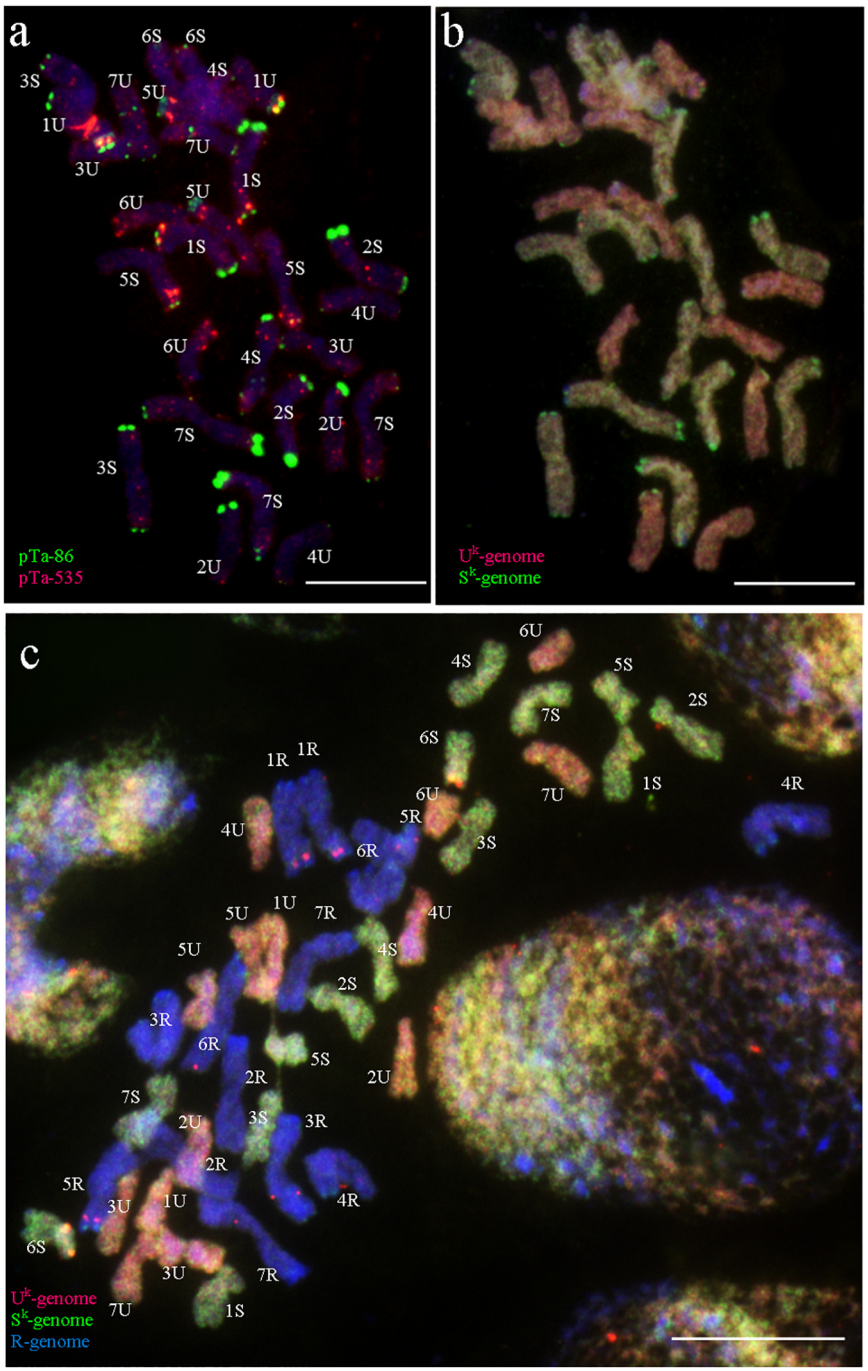

FIGURE 2 | Fluorescence/genomic *in situ* hybridization performed on mitotic chromosomes of *A. kotschyi* Boiss (2*n* = 6*x* = 42; $U^kU^kS^kS^k$; no. 14808 using **(a)** pTa-86 (Atto-488, green), pTa-535 (Atto-550, red). Genomic *in situ* hybridization using U-genome (Atto-550, red) and S-genome (Atto-488, green) probes performed on mitotic chromosomes of **(b)** *A. kotschyi* and **(c)** *Aegilops kotschyi* × *Secale cereale* (2*n* = 6*x* = 42; UUMMRR). **(a,c)** Chromosomes counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μm.

crossing efficiency was 7.22%, and 468 plants were obtained. The FISH/GISH analyses revealed that each offspring plant carried 42 chromosomes, including 2R and $2S^k$ chromosomes, which were in monosomic condition (**Figure 7e,f**). The presence of monosomic or nullisomic 2R chromosome was not observed.

Lr54 + Yr37 SSR Markers Analysis

PCR with SSR marker S14-410, linked to *Lr54* + *Yr37* loci, was conducted on *A. kotschyi*, triticale "Sekundo," the monosomic substitution $M2S^k$ (M2R) line and nullisomic N2R triticale plants (2*n* = 40). The same protocol was used to examine

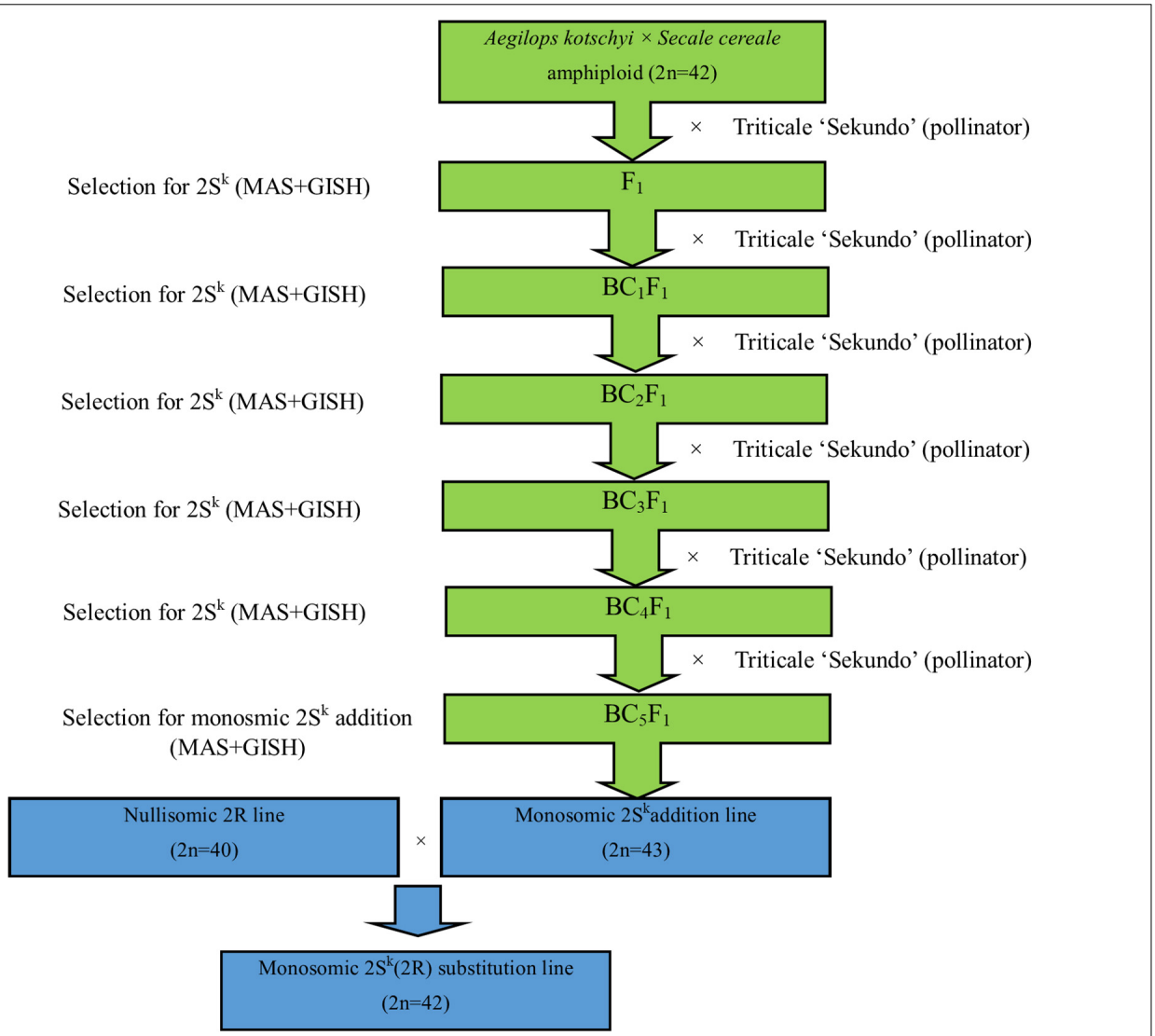

FIGURE 3 | Pedigree of monosomic 2S^k(2R) substitution plants of triticale "Sekundo."

TABLE 1 | Frequencies of individual *Aegilops kotschyi* chromosomes in five subsequent generations of backcrossing with triticale.

Generation	Pedegree	Number of pollinated flowers	Number of seeds	Number of plants (FISH)	Number of plants with												
					U-genome chromosomes							S-genome chromosomes					
					1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
F_1	Sekundo × AkSc*	710	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
BC_1F_1	F1 × Sekundo	375	15	15	0	0	13	2	11	13	15	1	15	12	15	5	1	0
BC_2F_1	BC_1F_1 × Sekundo	488	51	50	0	0	0	42	0	0	50	5	50	41	50	23	36	0
BC_3F_1	BC_2F_1 × Sekundo	715	234	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	23	0
BC_4F_1	BC_3F_1 × Sekundo	480	94	50	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	50	0	0	0
BC_5F_1	BC4F_1 × Sekundo	487	216	100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0

**AkSc, Aegilops kotschyi × Secale cereale amphiploid (2n = 6x = 42 chromosomes, $U^kU^kS^kS^kRR$).*

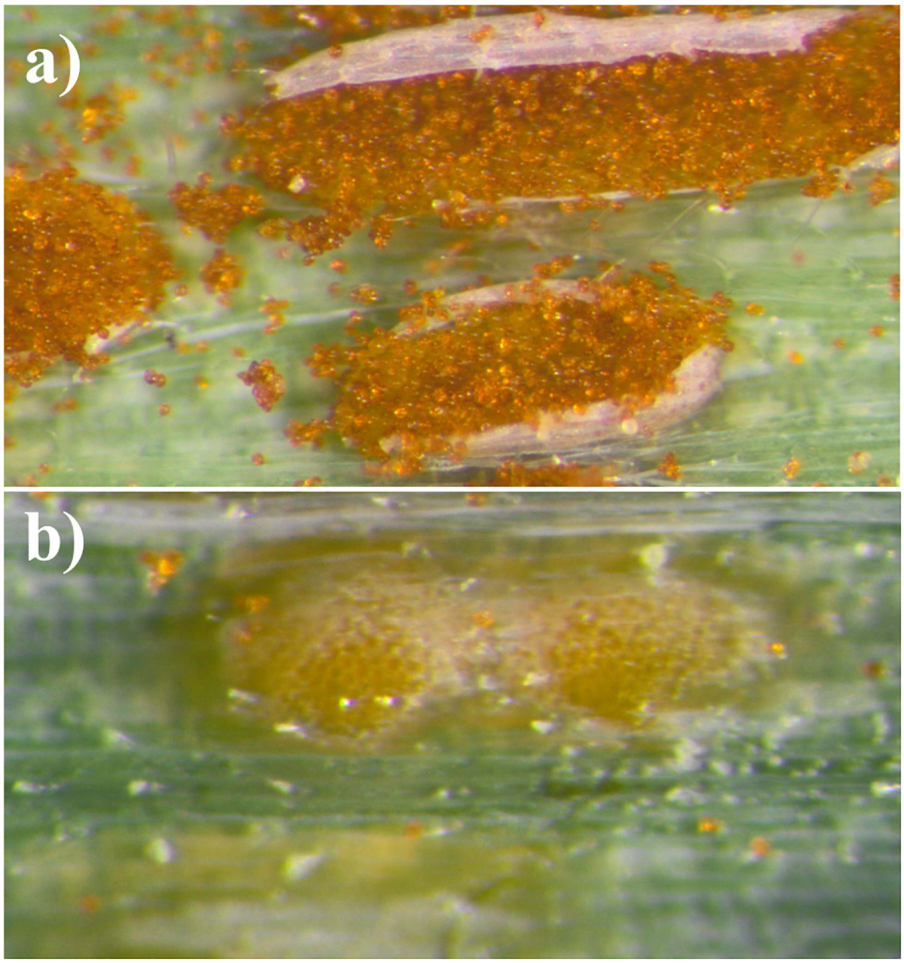

FIGURE 4 | Symptoms of **(a)** leaf rust and **(b)** stripe rust observed on leaves of triticale "Sekundo."

TABLE 2 | Means of leaf rust infection levels scored 10, 15, and 20 days post-inoculation (dpi).

Plant material	Experiment	No of plants tested	Means of infection levels			
			10 dpi	15 dpi	20 dpi	Mean ± SD
Monosomic 2S^{k}(2R) substitution plants	1	40	2.60	3.00	3.30	2.97 ± 0.48
Triticale cv. "Sekundo"	1	40	5.90	6.43	6.88	6.40 ± 0.73
Monosomic 2S^{k}(2R) substitution plants	2	40	2.70	2.98	3.20	2.96 ± 0.42
Triticale cv. "Sekundo"	2	40	5.86	6.45	6.95	6.43 ± 0.75

*F ratio = 1,267.62 (**Supplementary Table 1**).*

TABLE 3 | Means of stripe rust infection levels scored 10, 15, and 20 days post-inoculation (dpi).

Plant material	Experiment	No of plants tested	Means of infection levels			
			10 dpi	15 dpi	20 dpi	Mean ± SD
Monosomic 2S^{k}(2R) substitution plants	1	40	2.85	3.18	3.85	3.29 ± 0.77
Triticale cv. "Sekundo"	1	40	2.73	3.20	3.80	3.24 ± 0.79
Monosomic 2S^{k}(2R) substitution plants	2	40	2.70	3.15	3.78	3.21 ± 0.79
Triticale cv. "Sekundo"	2	40	2.67	3.30	4.00	3.33 ± 0.85

*F ratio = 0.5 (**Supplementary Table 2**).*

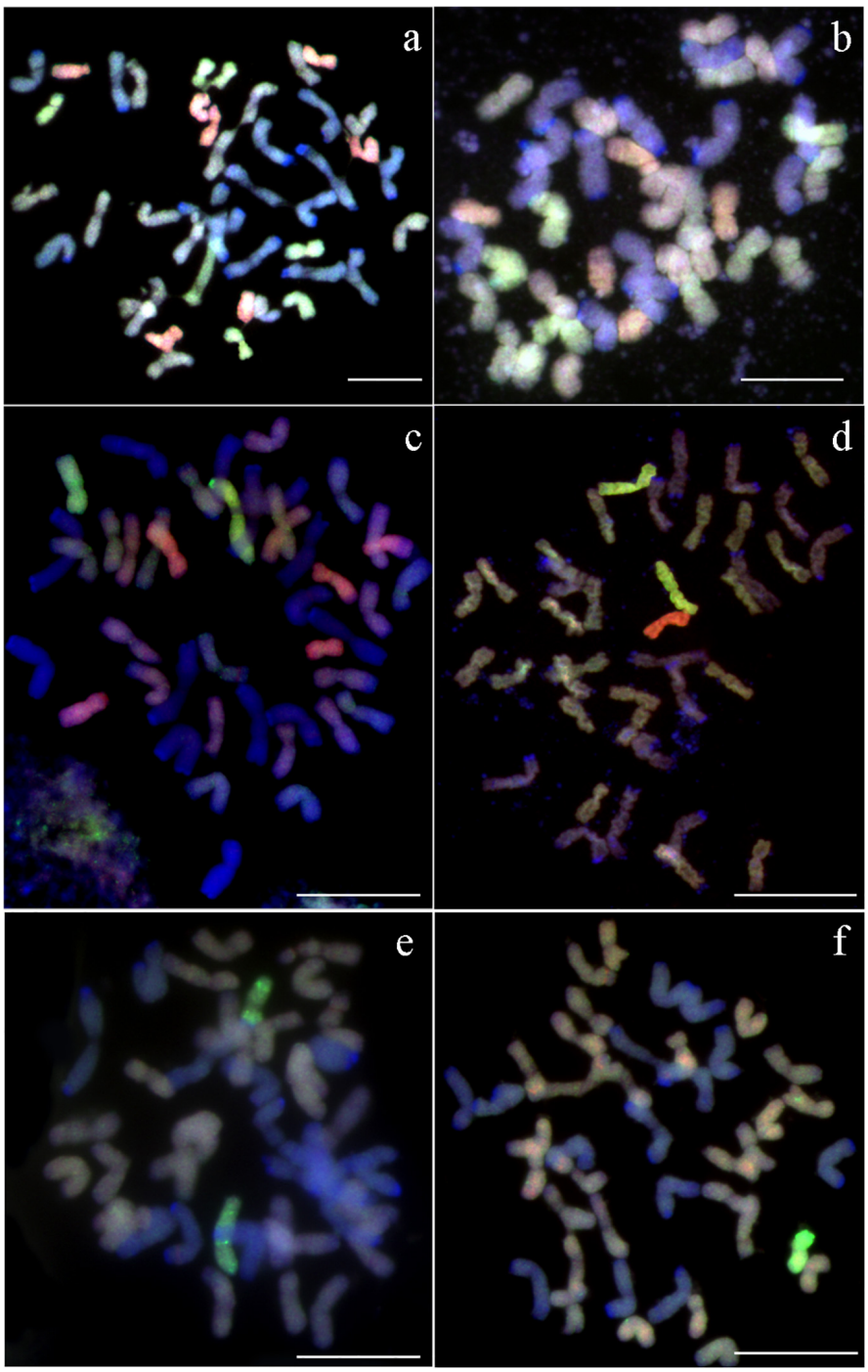

FIGURE 5 | Genomic *in situ* hybridization performed on mitotic chromosomes of **(a)** F_1, **(b)** BC_1F_1, **(c)** BC_2F_1, **(d)** BC_3F_1, **(e)** BC_4F_1, and **(f)** BC_5F_1 triticale-*Aegilops* introgression plants. A- and B-genome chromosomes are labeled with DAPI (light blue), as well as R-genome chromosomes (dark blue). U^k- and S^k-genome chromosomes are labeled with Atto-550 (red) and Atto-488 (green), respectively. Scale bar, 10 μm.

the offspring derived by subsequent backcrossing. A 410-bp amplicon for the S14-410 marker was identified in the control sample of *A. kotschyi* and in all hybrid plants of F_1 to BC_4F_1 generations (**Figure 8**). Screening for the presence of the S14-410 marker in 100 BC_5F_1 plants showed that 410 bp amplicon was present in 99 plants. Similar screening was carried out in 468 plants, created by cross-hybridization of N2R triticale plants ($2n$ = 40) and M2S^{k}AL plants ($2n$ = 43). PCR reaction with the genomic DNA of all recombinant plants yielded a 410-bp fragment.

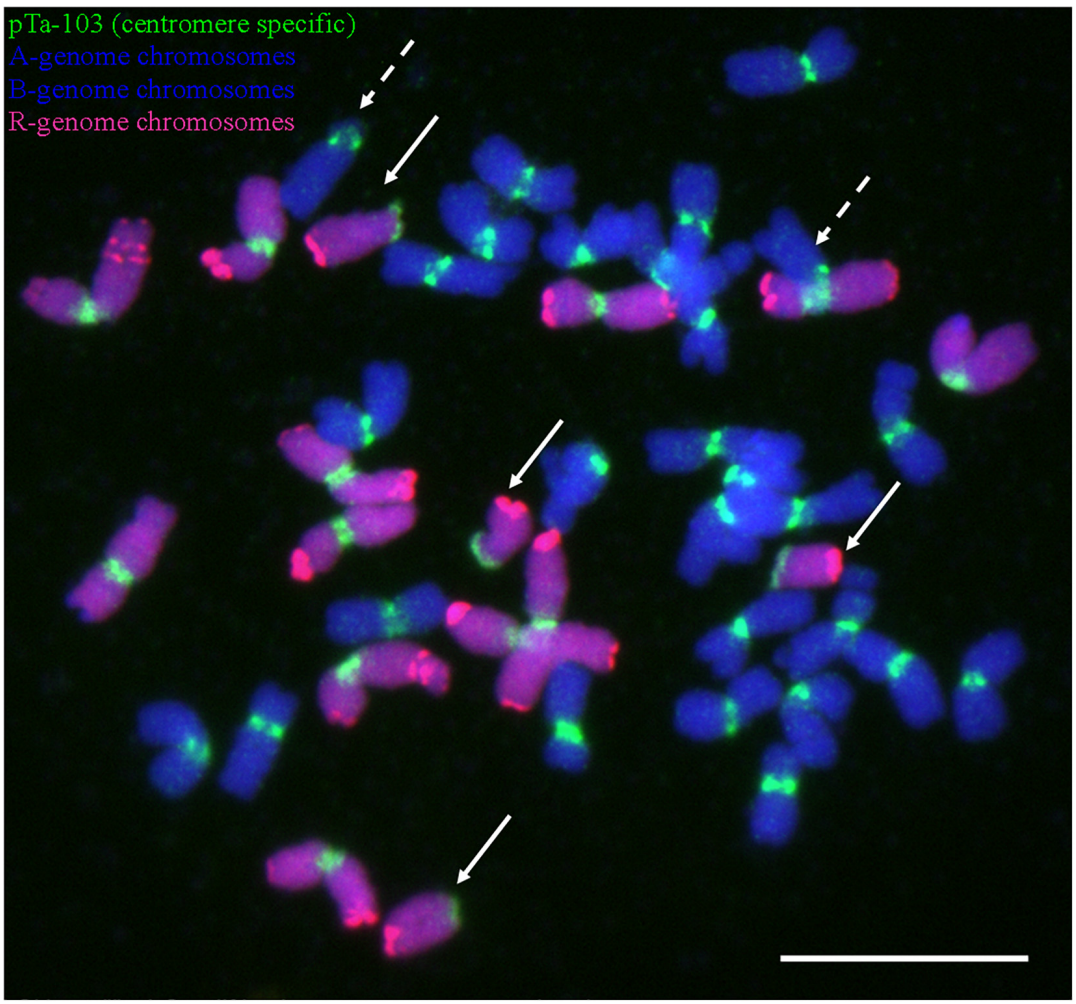

FIGURE 6 | Centric breaks of chromosomes in BC_5F_1 plant screened using multi-color GISH/FISH. Centromere regions were mapped using pTa-103 (Atto-488, green) probe. Dotted arrows, chromosome aberrations of A- or B-genome (DAPI, blue) of triticale; solid arrows, chromosome aberrations of R-genome (Atto-550, red) of triticale. Scale bar, 10 μm.

Evaluation of Leaf Rust Symptoms

The leaf and stripe rust response of two sets of 80 plants of triticale monosomic $2S^k(2R)$ substitution line was evaluated at the seedling stage in the growth chamber and compared with phenotypes of acceptor cultivar "Sekundo" as controls (**Table 2**). The mean scores for two replications of control plants (6.40 ± 0.73 and 6.43 ± 0.75) showed that the inoculation solution was effective for induction of the leaf rust infection. The mean score of three independent evaluations of infection level (10, 15, and 20 dpi) of two replications of monosomic $2S^k(2R)$ substitution plants was similar (2.96 ± 0.42 and 2.97 ± 0.48) (**Table 2**). The differences were significant at $\alpha = 0.01$ (**Supplementary Table 1**). The scores for two replications of the leaf rust response experiment did not differ significantly (**Supplementary Table 1**). In contrast, the stripe rust responses of the monosomic $2S^k(2R)$ substitution plants and the control triticale cv. "Sekundo" at the three successive points did not differ significantly ($\alpha = 0.01$) (**Table 3**). Plants of cv. "Sekundo" showed moderate stripe rust resistance (3.24 ± 0.79 and 3.33 ± 0.85), as well as monosomic substitution plants (3.21 ± 0.79 and 3.29 ± 0.77). ANOVA test for all thee timepoints showed that there is no statistically significant differences between stripe rust response of monosomic substitution plants compared with triticale "Sekundo" controls (**Supplementary Table 2**).

DISCUSSION

Alien and cultivated species are closely related and possess homeologous genomes (or sub-genomes). Hence, it is possible to introduce the desirable variation into crop plants using a backcrossing program. However, isolation barriers exist that prevent the formation of interspecific hybridization, and present a significant obstacle for the exploration of alien genetic variation in crop improvement. The generation of artificial amphidiploids can facilitate the transmission of desirable genetic

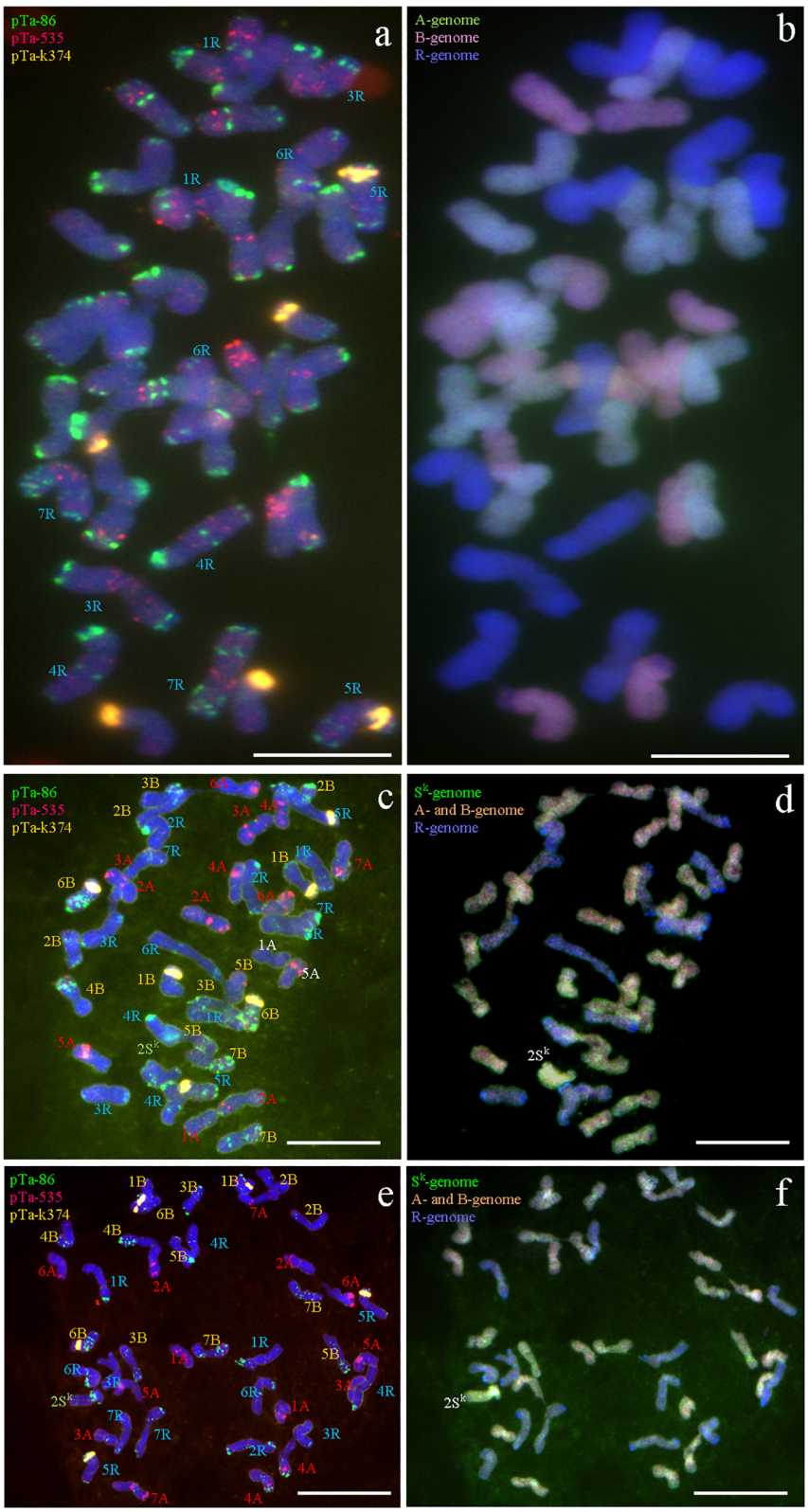

FIGURE 7 | Fluorescence and genomic *in situ* hybridization performed on mitotic chromosomes of: **(a,b)** nullisomic 2R plant of triticale (2*n* = 40); **(c,d)** monosomic $2S^k$ addition plant of triticale (2*n* = 43); **(e,f)** monosomic $2S^k$(2R) substitution plant of triticale (2*n* = 42). pTa-86 (Atto-488; green), pTa-535 (Atto-550; red), and pTa-k374 (Atto-647; yellow) probes were used for FISH. Genomic probes of A-, B-, R-, and S^k-genome were used for GISH. Scale bar, 10 μm.

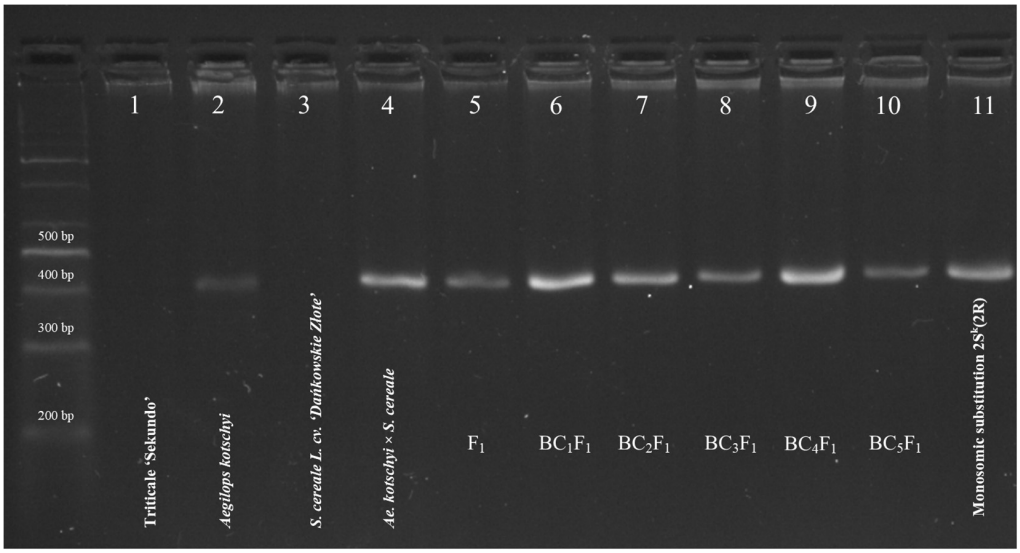

FIGURE 8 | Amplification products (410 bp) of S14-410 marker linked to loci of *Lr54* + *Lr37* leaf and stem rust resistance genes on $2S^k$ chromosome of *Ae. kotschyi*. (1) triticale "Sekundo" (AABBRR); (2) *Aegilops kotschyi* ($U^kU^kS^kS^k$); (3) *Secale cereale* L. "Dańkowskie Złote"; (4) *Aegilops kotschyi* × *Secale cereale* (2*n* = 6*x* = 42; UUMMRR); (5) F_1; (6) BC_1F_1; (7) BC_2F_1; (8) BC_3F_1; (9) BC_4F_1; (10) BC_5F_1; and (11) monosomic $2S^k$(2R) substitution plant of triticale (2*n* = 42). Size standard: Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder.

material from wild species to crops. In this study, synthetic *A. kotschyi* × *S. cereale* (2*n* = 6*x* = 42, $U^kU^kS^kS^k\underline{RR}$) amdiphiploid plants were used as a donor of wild genetic material to widen the genetic variation in hexaploid triticale "Sekundo" (2*n* = 6*x* = 42, AABB$\underline{RR}$).

Similar artificial amphidiploid forms were used to transfer *Lr32* and *Lr39* leaf rust resistance genes from *A. tauschii* × *S. cereale* (2*n* = 4*x* = 28; DDRR) (Kwiatek et al., 2015) and *Pm13* powdery mildew resistance gene from *A. variabilis* × *S. cereale* (2*n* = 6*x* = 42, $U^vU^vS^vS^v\underline{RR}$) (Kwiatek et al., 2016a) into cultivated triticale. It was reported that the presence of an R-genome chromosome set resulted in semi-fertile F_1 plants that were capable of producing an F_1 via cross-hybridization of artificial *Aegilops biuncialis* × *S. cereale* (2*n* = 6*x* = 42, $U^bU^bM^bM^bRR$) amphiploid and hexaploid triticale (Kwiatek et al., 2017a). In this study, seven F_1 plants were obtained via cross-hybridization of *A. kotschyi* × *S. cereale* and triticale. The first backcross with triticale "Sekundo" resulted in rapid elimination of the *Aegilops* chromosomes. The elimination range of the U^k-genome chromosomes was far higher when compared with the rate of S^k-genome chromosome loss (**Table 1**). The elimination of alien chromosomes was also observed in the BC_2F_1 generation. Interestingly, only $7U^k$, $4U^k$, $2S^k$, and $4S^k$ chromosomes were present in all of BC_2F_1 plants. In subsequent generations of triticale hybrids, obtained via successive backcrosses, the number of *Aegilops* chromosomes was highly reduced and the plants of BC_4F_1 carried $2S^k$ and $4S^k$ chromosomes only.

This pattern could be a result of gametocidal action of the *Gc* locus on $2S^{sh}$ of *Aegilops sharonensis* (Endo, 1985). Moreover, similar "breaker" element described in *A. sharonensis* (Maan, 1975). These loci have been mapped to a region proximal to a block of sub-telomeric heterochromatin on chromosome $4S^{sh}$L (Knight et al., 2015). The diploid *A. sharonensis* (2*n* = 2*x* = 14; $S^{sh}S^{sh}$) is a direct ancestor and a donor of S^k-genome of *A. kotschyi* (Kihara, 1954; Badaeva et al., 2004; Ruban and Badaeva, 2018). Investigations into the origin of *A. kotschyi* showed that the U^k and S^k subgenomes are very similar to the diploid progenitors: *A. umbellulata* (2*n* = 2*x* = 14; UU) and *A. sharonensis*, respectively (Zohary and Feldman, 1962; Zohary, 1999; Ozkan et al., 2001; Feldman and Levy, 2012). It is a distinct possibility that there are gametocidal loci on $2S^k$ and $4S^k$ chromosomes of *A. kotschyi*, and those loci could be orthologous to *A. sharonensis* analogs.

In the presented study, 99% of BC_5F_1 monosomic alien addition plants of triticale carried an additional $2S^k$ chromosome. Endo (2007) suggested, that when the gametocidal action is intense, gametes without the alien chromosome may suffer severe chromosome damages, resulting in sterility. In this study, one BC_5F_1 plant without $2S^k$ chromosomes suffered minor chromosome aberrations (**Figure 3**). It could be hypothesized that gametes without $2S^k$ can be fertile and develop into plants with chromosome aberrations as no chromosome fragment has been lost. This genetic phenomenon is of particular interest to breeders. Linking *Gc* loci with *Lr54* + *Yr37* leaf and stripe rust-resistant genes in triticale varieties would ensure maintenance of these traits in subsequent generations without the need for selection. But, on the other hand, triticale plants with centric chromosome breaks can be selected and used for the induction of Robertsonian translocations (RobTs) (Kwiatek and Nawracała, 2018).

The molecular analyses with the S14-410 marker confirmed that the preferential transmission of the $2S^k$ chromosome

occurred in all hybrid plants, from the F_1 generation to BC_4F_1. The *Lr54* + *Yr17* marker identification reflected the results of cytogenetic analysis of BC_5F_1 plants. The key result of this study was the development of monosomic $2S^k$(2R) substitution lines, which can be used for induction of chromosome translocations. There are several reports describing the methodology used for the production of monosomic substitutions. According to Faris et al. (2002), this can be achieved by crossing an alien chromosome addition line containing the gene of interest with a line that is monosomic for a homoeologous wheat chromosome. This approach was applied for development of 1RS.1DL chromosome translocation in triticale "Rhino" (Lukaszewski and Curtis, 2006). The 1RS.1DL translocation was later used for the induction of multi-breakpoint translocation lines (Lukaszewski, 2006, 2017).

It is reported that triticale is infected by the races specific to both: wheat and rye; however, it was noticed that triticale is more easily attacked by the wheat physiological forms of the rusts than by the rye ones (Arseniuk, 1996). After inoculation, a significant improvement of the resistance level was observed in introgressed plants in comparison with triticale cv. Sekundo plants. The mean level of leaf rust resistance was high for two independent replications of the experiment (2.96 ± 0.42 and 2.97 ± 0.48). Such low infection rate can be considered as a result of *Lr54* gene expression. In a similar study, Marais et al. (2005) developed a 2DS.2S^{k}L wheat-*A. kotschyi* line (called S14 translocation). The authors reported 96% resistant plants (72 tested) which were tested for resistance to eight *Pt* pathotypes (UVPrt2, UVPrt3, UVPrt4, UVPrt5, UVPrt8, UVPrt9, UVPrt10 and UVPrt13) and two *Pst* pathotypes (6E16A- and 6E22A-) endemic to South Africa. Moreover, it was shown that the S14 translocation evidently had preferential transmission (Marais et al., 2005). Intriguingly, monosomic $2S^k$(2R) substitution triticale plants, as well as control plants revealed the same, moderate resistance against stripe rust. In general, it is reported that triticale is more resistant against stripe rust as wheat. Moreover, triticale infection by *P. stiiformis* is highly dependent on plant growth stage and pathogen race (Rodriguez-Algaba et al., 2020). Hence, it could be possible that triticale "Sekundo" possesses a partial resistance against stripe rust and *Yr37* did not increase it.

In this study, the monosomic $2S^k$(2R) substitution plants were obtained through crossing between monosomic $2S^k$ addition line of triticale (M2S^{k}AL), containing *Lr54* loci, with another triticale line that was nullisomic for 2R chromosome pair (N2R). The cross-hybridization between M2S^{k}AL and N2R plants resulted in no offspring with the 2R chromosome in a monosomic condition (M2R). Hence, it can be hypothesized that gametocidal action of $2S^k$ chromosome killed gametes lacking it. Moreover, it could be possible that the inhibiting or suppressing factor of the $2S^k$ gametocidal action in triticale is located on the 2R chromosome. It is already known that some cultivars of common wheat possess genes that suppress the function of the *Gc* factors. Tsujimoto and Tsunewaki (1985) reported that that a suppressor gene (*Igc1*), that controls the suppression of *Gc* gene action on chromosome 3C of *A. truncialis*, is located on 3B chromosome of wheat "Norin 26." Similarly, Endo (1988) postulated that gametocidal action of the 4S chromosome of *A. sharonensis* or *A. longissima* is suppressed by the presence of 4B chromosome of wheat. It could be plausible that both the *Gc* gene and the suppressor loci are located on chromosomes of the same homoeologous group; however, these hypotheses require future investigation.

The classical methods basing on backcrossing and selection are still significant in plant breeding. There are several countries, which are considered as key crop producers (for example, France, Germany, Poland, etc.), place a strict set of regulations on the cultivation of genetically modified (GM) crops. Hence, classical breeding methods, enriched by the molecular (and cyto-molecular)-assisted selection and chromosome manipulation are still worthy endeavors. In addition, the genetic mechanisms that regulate the process of segregation distortion should be seriously taken into consideration as a natural tool for chromosome manipulation and engineering.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MK: conceptualization, methodology, formal analysis, writing original draft preparation, project administration, and funding acquisition. MK, WU, JB, and HW: validation. MK, JB, WU, RS, and AN: investigation. MK and HW: resources and supervision. MK and WU: data curation. MK and DP: writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research and the APC were funded by the National Centre for Research and Development, Poland (Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Polska), grant number LIDER/3/0004/L-8/16/NCBR/2017.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge and thank Dr. Zofia Banaszak at the Danko Breeding Station, for providing seeds of triticale cultivars. In addition, we would like to thank all of the reviewers and manuscript editor for their careful review of the manuscript and for their excellent suggestions for improving our initial work.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.509481/full#supplementary-material

REFERENCES

Arseniuk, E. (1996). "Triticale diseases - a review," in *Triticale: today and tomorrow*, eds V. P. Carnide, H. Guedes-Pinto, and N. Darvey (Netherlands: Springer), 499–525. doi: 10.1007/978-94-009-0329-6_65

Badaeva, E. D., Amosova, A. V., Samatadze, T. E., Zoshchuk, S. A., Shostak, N. G., Chikida, N. N., et al. (2004). Genome differentiation in *Aegilops*. 4. Evolution of the U-genome cluster. *Plant Syst. Evol.* 246, 45–76. doi: 10.1007/s00606-003-0072-4

Brar, D. S., and Dhaliwal, H. S. (2004). ""Chromosome manipulations for crop improvement."," in *Plant Breeding: Mendelian to Molecular Approaches*, eds H. K. Jain and M. C. Kharkwal (Dordrecht: Springer Netherlands), 65–96. doi: 10.1007/978-94-007-1040-5_4

Edet, O. U., Kim, J.-S., Okamoto, M., Hanada, K., Takeda, T., Kishii, M., et al. (2018). Efficient anchoring of alien chromosome segments introgressed into bread wheat by new *Leymus racemosus* genome-based markers. *BMC Genet.* 19:18. doi: 10.1186/s12863-018-0603-1

Endo, T. R. (1985). Two types of gametocidal chromosome of *Aegilops sharonensis* and *Ae. longissima*. *Jap. J. Genet.* 60, 125–135. doi: 10.1266/jjg.60.125

Endo, T. R. (1990). Gc chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. *Jpn. J. Genet.* 65, 135–152.

Endo, T. R. (1988). Induction of chromosomal structural changes by a chromosome *Aegilops cylindrica* L. in common wheat. *J. Hered.* 79, 366–370. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a110529

Endo, T. R. (2007). The gametocidal chromosome as a tool for chromosome manipulation in wheat. *Chromosom. Res.* 15, 67–75. doi: 10.1007/s10577-006-1100-3

Faris, J. D., Friebe, B., and Gill, B. S. (2002). Wheat Genomics: Exploring the Polyploid Model. *Curr. Genomics* 3, 577–591. doi: 10.2174/1389202023350219

Feldman, M., and Levy, A. A. (2012). Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics* 192, 763–774. doi: 10.1534/genetics.112.146316

Gill, B. S., Friebe, B. R., and White, F. F. (2011). Alien introgressions represent a rich source of genes for crop improvement. *PNAS* 108, 7657–7658. doi: 10.1073/pnas.1104845108

Goriewa-Duba, K., Duba, A., Kwiatek, M., Wiśniewska, H., Wachowska, U., and Wiwart, M. (2018). Chromosomal distribution of pTa-535, pTa-86, pTa-713, 35S rDNA repetitive sequences in interspecific hexaploid hybrids of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and spelt (*Triticum spelta* L.). *PLoS One* 13:192862. doi: 10.1371/journal.pone.0192862

Kihara, H. (1954). Considerations on the evolution and distribution of *Aegilops Species* based on the analyser-method. *Cytologia* 19, 336–357. doi: 10.1508/cytologia.19.336

Knight, E., Binnie, A., Draeger, T., Moscou, M., Rey, M.-D., Sucher, J., et al. (2015). Mapping the 'breaker' element of the gametocidal locus proximal to a block of sub-telomeric heterochromatin on the long arm of chromosome 4Ssh of Aegilops sharonensis. *Theor. Appl. Genet.* 128, 1049–1059. doi: 10.1007/s00122-015-2489-x

Komuro, S., Endo, R., Shikata, K., and Kato, A. (2013). Genomic and chromosomal distribution patterns of various repeated DNA sequences in wheat revealed by a fluorescence *in situ* hybridization procedure. *Genome* 56, 131–137. doi: 10.1139/gen-2013-0003

Kwiatek, M. T., and Nawracała, J. (2018). Chromosome manipulations for progress of triticale (×*Triticosecale*) breeding. *Plant Breed.* 137, 823–831. doi: 10.1111/pbr.12652

Kwiatek, M. T., Majka, J., Majka, M., Belter, J., and Wisniewska, H. (2017a). Adaptation of the pivotal-differential genome pattern for the induction of intergenomic chromosome recombination in hybrids of synthetic amphidiploids within Triticeae tribe. *Front. Plant Sci.* 8:1300. doi: 10.3389/fpls.2017.01300

Kwiatek, M. T., Wiśniewska, H., Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Majka, J., Majka, M., Belter, J., et al. (2017b). Gametocidal factor transferred from *Aegilops geniculata* Roth can be adapted for large-scale chromosome manipulations in cereals. *Front. Plant Sci.* 8:409. doi: 10.3389/fpls.2017.00409

Kwiatek, M., Belter, J., Majka, M., and Wiśniewska, H. (2016a). Allocation of the S-genome chromosomes of *Aegilops variabilis* Eig. carrying powdery mildew resistance in triticale (× *Triticosecale* Wittmack). *Protoplasma* 253, 329–343. doi: 10.1007/s00709-015-0813-6

Kwiatek, M., Majka, M., Majka, J., Belter, J., Suchowilska, E., Wachowska, U., et al. (2016b). Intraspecific polymorphisms of cytogenetic markers mapped on chromosomes of *Triticum polonicum* L. *PLoS One* 11:158883. doi: 10.1371/journal.pone.0158883

Kwiatek, M., Majka, M., Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Ponitka, A., Pudelska, H., Belter, J., et al. (2016c). Transmission of the *Aegilops ovata* chromosomes carrying gametocidal factors in hexaploid triticale (×*Triticosecale* Wittm.) hybrids. *J. Appl. Genet.* 57, 305–315. doi: 10.1007/s13353-015-0332-3

Kwiatek, M., Majka, M., Wiśniewska, H., Apolinarska, B., and Belter, J. (2015). Effective transfer of chromosomes carrying leaf rust resistance genes from *Aegilops tauschii* Coss. into hexaploid triticale (*X Triticosecale* Witt.) using *Ae. tauschii* × *Secale cereale* amphiploid forms. *J. Appl. Genet.* 56, 163–168. doi: 10.1007/s13353-014-0264-3

Kwiatek, M., Wiśniewska, H., and Apolinarska, B. (2013). Cytogenetic analysis of *Aegilops* chromosomes, potentially usable in triticale (*X Triticosecale* Witt.) breeding. *J. Appl. Genet.* 54, 147–155. doi: 10.1007/s13353-013-0133-5

Kynast, R. G., Riera-Lizarazu, O., Vales, M. I., Okagaki, R. J., Maquieira, S. B., Chen, G., et al. (2001). A complete set of maize individual chromosome additions to the oat genome. *Plant Physiol.* 125, 1216–1227. doi: 10.1104/pp.125.3.1216

Lukaszewski, A. J. (2000). Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. *Crop Sci.* 40, 216–225. doi: 10.2135/cropsci2000.401216x

Lukaszewski, A. J. (2006). Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve bread-making quality of hexaploid triticale. *Crop Sci.* 46, 2183–2194. doi: 10.2135/cropsci2006.03.0135

Lukaszewski, A. J. (2016). "Manipulation of homologous and homoeologous chromosome recombination in wheat," in *Plant Cytogenetics: Methods and Protocols*, eds S. F. Kianian and P. M. A. Kianian (New York, NY: Springer New York), 77–89. doi: 10.1007/978-1-4939-3622-9_7

Lukaszewski, A. J. (2017). A set of new 1RS translocations from wheat cv. Amigo in a uniform genetic background. *Euphytica* 213:214. doi: 10.1007/s10681-017-2008-z

Lukaszewski, A., and Curtis, C. (2006). Transfer of the Glu—D1 gene from chromosome 1D of bread wheat to chromosome 1R in hexaploid triticale. *Plant Breed.* 109, 203–210. doi: 10.1111/j.1439-0523.1992.tb00174.x

Maan, S. S. (1975). Exclusive preferential transmission of an alien chromosome in common wheat 1. *Crop Sci.* 15, 287–292. doi: 10.2135/cropsci1975.0011183X001500030002x

Marais, G. F., McCallum, B., and Marais, A. S. (2005). Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr54* and *Yr37* transferred to wheat from *Aegilops kotschyi*. *Plant Breed.* 124, 538–541. doi: 10.1007/s10681-006-9092-9

McNeal, F. H., Koznak, C. F., Smith, E. P., Tate, W. S., and Russell, T. S. (1971). A uniform system for recording and processing cereal research data. *USDA-ARS Bull.* 42, 34–121.

Nasuda, S., Friebe, B., and Gill, B. S. (1998). Gametocidal genes induce chromosome breakage in the interphase prior to the first mitotic cell division of the male gametophyte in wheat. *Genetics* 149, 1115–1124.

Ozkan, H., Levy, A. A., and Feldman, M. (2001). Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops – Triticum*) Group. *Plant Cell* 13, 1735–1747. doi: 10.1105/TPC.010082

Prażak, R., and Paczos-Grzęda, E. (2013). Characterization of *Aegilops kotschyi* Boiss. x *Triticum aestivum* L. hybrid lines. *Acta Agrobot.* 66, 109–120. doi: 10.5586/aa.2013.057

Qi, L., Friebe, B., Zhang, P., and Gill, B. S. (2007). Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromosom. Res.* 15, 3–19. doi: 10.1007/s10577-006-1108-8

Rawat, N., Tiwari, V. K., Singh, N., Randhawa, G. S., Singh, K., Chhuneja, P., et al. (2009). Evaluation and utilization of *Aegilops* and wild *Triticum* species for enhancing iron and zinc content in wheat. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56, 53–64. doi: 10.1007/s10722-008-9344-8

Riley, R., and Chapman, V. (1958). Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* 182, 713–715. doi: 10.1038/182713a0

Rodriguez-Algaba, J., Sørensen, C. K., Labouriau, R., Justesen, A. F., and Hovmøller, M. S. (2020). Susceptibility of winter wheat and triticale to yellow rust influenced by complex interactions between vernalisation, temperature, plant growth stage and pathogen race. *Agronomy* 10:13. doi: 10.3390/agronomy10010013

Roelfs, A. P. (1988). An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 78, 526–533. doi: 10.1094/phyto-78-526

Ruban, A. S., and Badaeva, E. D. (2018). Evolution of the S-Genomes in Triticum-Aegilops alliance: evidences from chromosome analysis. *Front. Plant Sci.* 9:1756. doi: 10.3389/fpls.2018.01756

Schneider, A., Molnár, I., and Molnár-Láng, M. (2008). Utilisation of Aegilops (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica* 163, 1–19. doi: 10.1007/s10681-007-9624-y

Sears, E. R. (1972). "Chromosome engineering in wheat," in *Stadler Genet. Symp*, eds G. Kimber and G. P. Redei (Columbia: University of Missouri), 23–38.

Sears, E. R. (1977). An induced mutant with homoeologous pairing in wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 19, 585–593. doi: 10.1139/g77-063

Singh, B. D., and Singh, A. K. (2015). *Marker-assisted plant breeding: principles and practices*. India: Springer. doi: 10.1007/978-81-322-2316-0

Smit, C. (2013). *Pyramiding of novel rust resistance genes in wheat, utilizing marker assisted selection and doubled haploid technology*. Master of Science Thesis, Stellenbosch: Stellenbosch University, 1–123.

Tsujimoto, H., and Tsunewaki, K. (1985). Gametocidal genes in wheat and its relatives. II. Suppressor of the chromosome 3C gametocidal gene of *Aegilops triuncialis*. *Can. J. Genet. Cytol.* 27, 178–185. doi: 10.1139/g85-027

Veatch-Blohm, M. E. (2007). Principles of plant genetics and breeding. *Crop Sci.* 47:1763. doi: 10.2135/cropsci2007.05.0002br

Wojciechowska, B., and Pudelska, H. (2002). Production and morphology of the hybrids *Aegilops kotschyi* × *Secale cereale* and *Ae. biuncialis* × *S. cereale*. *Genet. Plant Acad.* 43, 279–285.

Wulff, B. B. H., and Moscou, M. J. (2014). Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. *Front. Plant Sci.* 5:692. doi: 10.3389/fpls.2014.00692

Zohary, D. (1999). Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East. *Genet. Resour. Crop Evol.* 46, 133–142. doi: 10.1023/A:1008692912820

Zohary, D., and Feldman, M. (1962). Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Evolution* 16, 44–61. doi: 10.2307/2406265

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Kwiatek, Ulaszewski, Belter, Phillips, Skowrońska, Noweiska and Wiśniewska. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

11.2 Oświadczenia współautorów

Poznań, 20.05.2021

Prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michał T. Kwiatek, Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Dylan Phillips, Roksana Skowrońska, Aleksandra Noweiska, Halina Wiśniewska (2020). **Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^{k} Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss:**, Frontiers in Plant Science, doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481

byłem zaangażowany w:

- zaprojektowanie badań
- prowadzenie badań
- dobranie oraz optymalizację metodologii badań
- analizę formalną
- pozyskanie części materiałów niezbędnych do realizacji badań
- przeci[illegible]wywanie danych
- przygotowanie pierwotnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu
- nadzór realizacji prac
- zarządzanie projektem
- pozyskanie środków finansowych na realizację badań.

.....

Podpis

Poznań, 20.05.2021

Mgr Waldemar Ulaszewski

Zakład Struktury i Funkcji Genów

Instytut Genetyki Roślin

Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michał T. Kwiatek, Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Dylan Phillips, Roksana Skowrońska, Aleksandra Noweiska, Halina Wiśniewska (2020). **Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^{k} Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss:**, Frontiers in Plant Science, doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481

byłem zaangażowany w:

- prowadzenie badań oraz pozyskiwanie wyników w zakresie przedstawionym w niniejszej rozprawie
- optymalizację metodologii badań
- przechowywanie danych

Waldemar Ulaszewski

Podpis

Poznań, 20.05.2021

Mgr inż. Jolanta Belter

Zakład Struktury i Funkcji Genów

Instytut Genetyki Roślin

Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michał T. Kwiatek, Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Dylan Phillips, Roksana Skowrońska, Aleksandra Noweiska, Halina Wiśniewska (2020). **Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^{k} Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss:**, Frontiers in Plant Science, doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481

zaangażowana byłam w optymalizację metodyki oraz prowadzenie badań.

Jolanta Belter

.....

Podpis

Aberystwyth, 20.05.2021

Dr Dylan Phillips

Institute of Biological, Environmental

and Rural Sciences

Aberystwyth University

DECLARATION

I declare that in the paper:

Michał T. Kwiatek, Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Dylan Phillips, Roksana Skowrońska, Aleksandra Noweiska, Halina Wiśniewska (2020). **Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^{k} Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss**:, Frontiers in Plant Science, doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481

I was involved in writing—review editing.

……..……

Signature

Poznań, 20.05.2021

Mgr Roksana Skowrońska

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michał T. Kwiatek, Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Dylan Phillips, Roksana Skowrońska, Aleksandra Noweiska, Halina Wiśniewska (2020). **Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^{k} Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss:**, Frontiers in Plant Science, doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481

uczestniczyłam w prowadzeniu badań.

Roksana Skowrońska

.....

Podpis

Poznań, 20.05.2021

Mgr inż. Aleksandra Noweiska

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michał T. Kwiatek, Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Dylan Phillips, Roksana Skowrońska, Aleksandra Noweiska, Halina Wiśniewska (2020). **Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^{k} Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss**:, Frontiers in Plant Science, doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481

uczestniczyłam w prowadzeniu badań.

.....

Podpis

Poznań, 20.05.2021

Prof. dr hab. Halina Wiśniewska

Zakład Struktury i Funkcji Genów

Instytut Genetyki Roślin

Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michał T. Kwiatek, Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Dylan Phillips, Roksana Skowrońska, Aleksandra Noweiska, Halina Wiśniewska (2020). **Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2S^{k} Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss:**, Frontiers in Plant Science, doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.509481

zaangażowana byłam w

- optymalizację metodyki badań
- zapewnienie części materiałów potrzebnych do realizacji badań
- nadzór realizacji prac

Podpis

12. Publikacja nr 3:

12.1 Tekst publikacji

1. Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Halina Wiśniewska, Joanna Szymczak, Roksana Skowrońska, Dylan Phillips, Michał T. Kwiatek (2019). **Recovery of 2R.2Sk Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations.** Agronomy, 9(10), 646; doi: https://doi.org/10.3390/agronomy9100646

agronomy

MDPI

Communication

Recovery of 2R.2S^{k} Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations

Waldemar Ulaszewski [1], Jolanta Belter [1], Halina Wiśniewska [1], Joanna Szymczak [2], Roksana Skowrońska [2], Dylan Phillips [3] and Michał T. Kwiatek [1,*]

1 Department of Genomics, Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, Poland; wula@igr.poznan.pl (W.U.); jbel@igr.poznan.pl (J.B.); hwis@igr.poznan.pl (H.W.)
2 Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland; asia.szymczak28@wp.pl (J.S.); roksana.skowronska@up.poznan.pl (R.S.)
3 Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, Aberystwyth, Ceredigion, Wales SY23 3DA, UK; dwp@aber.ac.uk
* Correspondence: michal.kwiatek@up.poznan.pl; Tel.: +48-61-848-7760

Received: 9 September 2019; Accepted: 15 October 2019; Published: 17 October 2019

Abstract: Robertsonian translocations (RobTs) in the progeny of triticale (×*Triticosecale* Wittmack) plants with monosomic substitution of *Aegilops kotschyi* chromosome 2S^{k} (2R) were investigated by fluorescence in-situ hybridization. Chromosome 2S^{k} of *Ae. kotschyi* is reported to possess many valuable loci, such as *Lr54* + *Yr37* leaf and stripe (yellow) rust resistance genes. We used a standard procedure to produce RobTs, which consisted of self-pollination of monosomic triticale plants, carrying 2R and 2S^{k} chromosomes in monosomic condition. This approach did not result in RobTs. Simultaneously, we succeeded in producing 11 plants carrying 2R.2S^{k} compensatory RobTs using an alternative approach that utilized ditelosomic lines of triticale carrying 2RS (short arm) and 2RL (long arm) telosomic chromosomes. Identification of molecular markers linked to *Lr54* + *Yr37* genes in the translocation plants confirmed that these resources can be exploited in current triticale breeding programmes.

Keywords: *Aegilops*; centric breaks; chromosome fusion; Robertsonian translocations; telosomic chromosomes; triticale

1. Introduction

Hexaploid triticale (×*Triticosecale* Wittmack, 2*n* = 6*x* = 42, AABBRR) is one of the few artificial crops cultivated at a large scale. Triticale combines the quality traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) and the adaptation abilities of rye (*Secale cereale* L). Over the last three decades the global harvested area of triticale has constantly increased (2,101,405 ha in 1996; 3,662,363 ha in 2006, and 4,157,018 ha in 2016) [1], and the range of uses has also grown. Forage production is the principal end use for this crop, but there are new niches proposed, such as: biofuel production [2,3], baking [4], brewing [5] and food production [6]. As a recent man-made crop, triticale suffers narrow genetic variability for breeders to select upon.

In triticale there has been a breakdown of resistance against leaf rust (caused by *Puccinia triticiana* Eriks.) and stripe (yellow) rust (caused by *P. striiformis* f. sp. *tritici* Westend.). As the harvested area of triticale has increased, new pathotypes of *Puccinia* have evolved, moving from wheat and rye into triticale [7]. Both pathogens can reduce the grain yield by 40% [8,9]. There is an urgent need to improve the genepool of triticale, and introduce genetic resistance to *Puccinia* infections. There are approximately eighty leaf rust resistance genes identified in Triticeae, and nearly the same amount of stripe rust resistance genes have also been identified. Some of these genes have already been transferred

from wild relatives into the wheat genetic background [10]. Recently, several attempts were made to transfer rust resistance genes from *Aegilops*, *Agropyron* and *Triticum* species into triticale [11–15].

Aegilops species are closely related to wheat (and triticale, *per se*) and carry a number of valuable traits, which have been effectively incorporated into wheat by developing wheat–*Aegilops* hybrids and deriving addition, substitution and translocation lines [16]. *Aegilops kotschyi* Boiss. ($2n = 4x = 28$ chromosomes, U- and S-genomes) is a wild tetraploid goatgrass native to Northern Africa, the Mid-East, and Western Asia. *Ae. kotschyi* germplasm is exploited in wheat breeding [17] as a source of high grain protein, iron and zinc [18]. Moreover, Antonov and Marais [19] observed leaf rust resistance that was effective against the infection of *Puccinia triticina* in *Ae. kotschyi*. Marais et al. [20] identified the *Lr54* and *Yr37* leaf rust and stripe rust resistance genes, and developed aT2DS.2S^{k}L wheat-*Ae. kotschyi* translocation line. The first *Lr54* + *Yr37* marker was developed by Heyns et al. [21]. Moreover, translocation gene sequences were cloned and specific SSR markers were developed [22].

Homoeologous recombination based engineering is the most common way for efficiently utilizing the wild relative gene pool for crop improvement [23]. The generation of translocation lines is the most promising pathway for the exploitation of alien germplasm in crop breeding [23]. In distant hybrids, unpaired chromosomes are present as univalents during meiosis. Monosomic chromosomes are prone to centric breaks at anaphase I of meiosis, which misdivide and the broken ends fuse during the interkinesis of meiosis II [24–26]. Fusion of the misdivided products may result in the formation of a Robertsonian translocation (RobT) [27].

Several steps are required to generate RobTs (Figure 1a), with self-pollination of double-monosomic plants being the most common method used in the induction of RobTs [26]. Wheat breeders can use a large collection of aneuploid stocks for the induction of wheat-wheat and wheat-alien RobTs. This can be performed in a directed manner by producing the appropriate wheat or alien monosomic lines [28–31]. In wheat breeding the most common RobTs are the T1BL.1RS and T1AL.1RS translocations [25]. Lukaszewski and Curtis developed 1RS.1DL chromosome translocation in triticale "Rhino" and transferred this to cv. "Presto" by backcrossing for several generations [32]. The 1RS.1DL translocation was later used for the induction of multi-breakpoint translocation lines [29,33,34]. A key issue for the centric breakage-fusion mechanism is the frequency at which the centric breakage events involving the univalent occurs. Friebe et al. [26] reported that this can range from 1% to 11%. Another issue is the resultant telocentric chromosomes have a tendency of rejoin as RobTs. It was reported that the frequency of wheat–alien RobTs recovered ranges from 4% to 20%, depending on the genetic background, the chromosomes involved, and environmental conditions used [26,30,31].

To increase the rate of RobT formation, it is therefore necessary to reduce the random factors connected with appearance of centric breaks. In this study, we postulated that the use of telosomic plants for cross-hybridization with plants carrying an alien-substitution will overcome the random process of centric break formation in the univalent (Figure 1b). This approach was used to transfer the *Lr54* + *Yr37* resistance genes into triticale cv. "Sekundo" through a T2RS.2S^{k}L RobT. It was hypothesized that the presence of the 2R donor chromosomes in a telosomic condition would increase the frequency of RobTs recovery (Figure 1b). To test this we used a monosomic substitution triticale line carrying a single 2S^{k} chromosome, instead of a 2R triticale chromosome (40 + M2R + M2S^{k}), and crossed this with a triticale line carrying a single copy of 2RS (short arm of 2R chromosome) and 2RL (long arm of 2R chromosome) telosomic chromosomes (40T + D2RS + D2RL). As a control experiment, the classical approach, based on the self-pollination of double monosomic triticale-*Ae. kotschyi* plants (40T + M2R + M2S^{k}), was also undertaken (Figure 1a). The goal was to compare the frequencies of chromosomal breaks and recovery of RobTs that arose throughout the two independent approaches tested (Figure 1a,b).

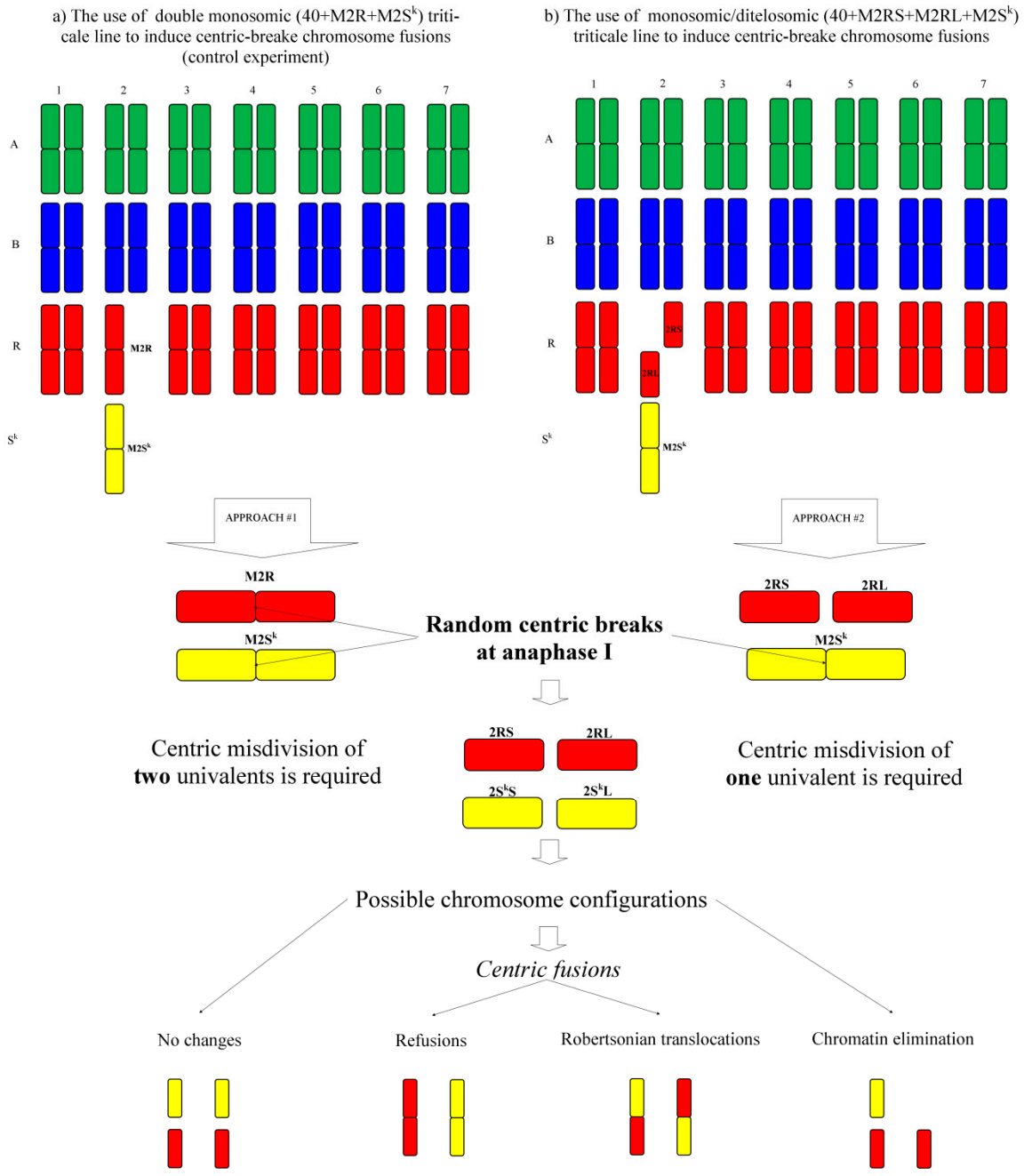

Figure 1. Ideogram of the two contrasting approaches for the recovery of Robertsonian translocations.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Winter triticale cv. "Sekundo" was obtained from the Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o. (Choryń, Poland) plant breeding company. Accession Ak3 of *Aegilops kotschyi* was received by Prof. B. Wojciechowska (Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland; IPG PAS) from a collection of Professor M. Feldman (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) and assembled in the genebank of the IPG PAS. All plants were grown and crossed in the greenhouse of the IPG PAS. In the initial study, monosomic addition triticale line (MA2S^k; 2n = 43) that carried chromosome 2S^k derived from triticale-*Aegilops kotschyi* hybrids was used. These plants were crossed with triticale nullisomic plants for chromosomes 2R (N2R, 2n = 40); obtained

by Kwiatek et al. [35]. Double monosomic (M2R and M2S^k) F_1 plants ($2n$ = 42) were identified using GISH, according to Kwiatek et al. [35]. Ditelosomic (Dt2RS and Dt2RL) plants of triticale were generated by Kwiatek et al. [35] by harnessing chromosome fragmentation induced by gametocidal action, in combination with the production of double haploids. Spikes emasculated between April and June of 2018 were used for cross-pollination. The anthers of donor plants were collected, and pollen was transferred onto stigmas by chafing.

2.2. Chromosome Preparation

Accumulation of cells at mitotic metaphase and fixation was carried out according to Kwiatek et al. [35]. The root meristemes were digested at 37 °C for 2 h and 40 min in an enzymes solution containing 0.2% (*v*/*v*) Cellulase Onozuka R-10 and Calbiochem cytohelicase (1:1 ratio) and 20% pectinase (Sigma), in 10 mM citrate buffer (pH 4.6). Chromosome preparations were made according Heckmann et al. [36]. Digested root tips were placed on slides with a drop of ice-cold 60% acetic acid. The mixture was spread on a slide using metal needle for 2 min on a heating table (Medax) set at 48 °C. The slides were washed with 200 µL of ice-cold ethanol-acetic acid (3:1, *v*/*v*) and placed in 60% acetic acid for 10 min, washed in 96% ethanol, and air dried.

Meiotic chromosome spreads from pollen mother cells were prepared from flower buds fixed with ethanol-acetic acid (3:1, *v*/*v*) according to Zwierzykowski et al. [37]. Anthers were transferred to a slide with a drop of ice-cold 60% acetic acid and dispersed with a metal needle. The slide was placed on a hot plate (45 °C) for 2 min, during which the drop was spread using a needle. The slide was removed from the hot plate, a drop of 60% acetic acid added and covered with a cover slip. The slide was frozen in liquid nitrogen, and cover slip was removed with a razor blade.

2.3. Probe Preparation and Fluorescence in Situ Hybridization

Total genomic DNA was isolated using GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland). DNA of *Aegilops sharonensis* Eig. (a progenitor of the S-genome of *Ae. kotschyi*; PI 551020, U.S. National Plant Germplasm System, Aberdeen, ID, United States of America) was labeled by nick translation with Atto-488 dye (Atto-488NT kit; Jena Bioscience, Jena, Germany) to investigate *Aegilops* chromosomes behavior during meiosis in the hybrid. Blocking DNA from triticale (Sekundo, Lamberto and Bogo) was sheared by boiling for 30-45 min and used at a ratio of 1:50 (probe:block). Genomic in-situ hybridization (GISH) or multicolor GISH was carried out according to previously published protocols [35]. Mitotic chromosomes were identified using fluorescence in situ hybridization (FISH) with the repetitive sequences from pTa-86, pTa-535, pTa-465, pTa-k-566 and pTa713 clones characterized by Komuro et al. [38]. They were amplified from genomic DNA of wheat (Chinese Spring) according to Kwiatek et al. [39], and labelled with Atto-488, Atto-550, and Atto-647 dyes using a nick translation kit (Jena Bioscience). FISH was performed according to Kwiatek et al. [35]. Slides were examined with the Olympus BX 61 automatic epifluorescence microscope equipped with Olympus XM10 CCD camera. Image processing was carried out using Olympus Cell-F (version 3.1; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH: Münster, Düsseldorf, Germany) imaging software and PaintShop Pro X5 software (version 15.0.0.183; Corel Corporation, Ottawa, ON, Canada). Chromosomes of *Aegilops* and triticale were identified by comparing the signal patterns of the probes [39].

2.4. Lr54 + Lr37 SSR Marker Screening

Genomic DNA of parental forms and offspring plants were isolated using Plant DNA Purification Kit (EurX Ltd., Gdańsk, Poland). All primers (Table 1) were manufactured by Sigma-Aldrich (Merck).

PCR reactions were performed in a LabCycler thermal cycler (SensoQuest Biomedizinische Elektronik, Goettingen, Germany). The 20 µL PCR reaction consisted of 150 nM each primer, 0.2 mM of each nucleotide, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 units of Taq-DNA hot-start polymerase (TaqNovaHS, Blirt, Poland), and 50 ng of genomic DNA as a template. A typical PCR procedure was as follows: 5 min at 95 °C, then 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 50–60 °C (depending on the primer, Table 1), 1 min

at 72 °C, and 5 min at 72 °C. 0.5µL Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe) was added to each amplification product, ran on 2% agarose gel (Sigma), and then visualized and photographed (EZ GelDoc System, BioRad).

Table 1. Primer sequences and PCR conditions used for *Lr54* + *Lr37* marker identification on $2S^k$ chromosome.

Marker	Primer Sequence (5′ to 3′)	Amplification Temperature (°C)	Amplicon Size (bp)	Reference
S14-297	CATGCAGAAAACGACACACC	60	297	[21]
	GGTAAGTGGTCAGGCGTTGT			
S14-410	ACCAATTCAACTTGCCAAGAG	61	410	[22]
	GAGTAACATGCAGAAAACGACA			

3. Results

3.1. Chromosome Segregation in 40 + M2R + M2S^k Plants of Triticale

In the control experiment, pollen mother cells (PMCs) of ten triticale plants carrying 40 + M2R + M2S^k chromosomes were examined to identify metaphase I (MI) and anaphase I (AI) of meiosis (Figure 2a). We observed a $2S^k$ univalent in all of 100 analyzed PMCs (Figure 2b). The number of misdivided $2S^k$ chromosomes during AI was 9 (Figure 2c). No other misdivided chromosome of triticale was observed. Next, 48 spikes of the monosomic substitution plants (40 + M2R + M2S^k) were allowed to self-pollinate, and 2601 seeds were obtained. A subset of 289 plants were screened using GISH and none were found with the expected RobT. 185 (63.1%) of the derived plants carried a whole *Aegilops* chromosome. In the remaining offspring (104 plants; 36.9%), no *Ae. kotschyi* chromosome fragments were identified.

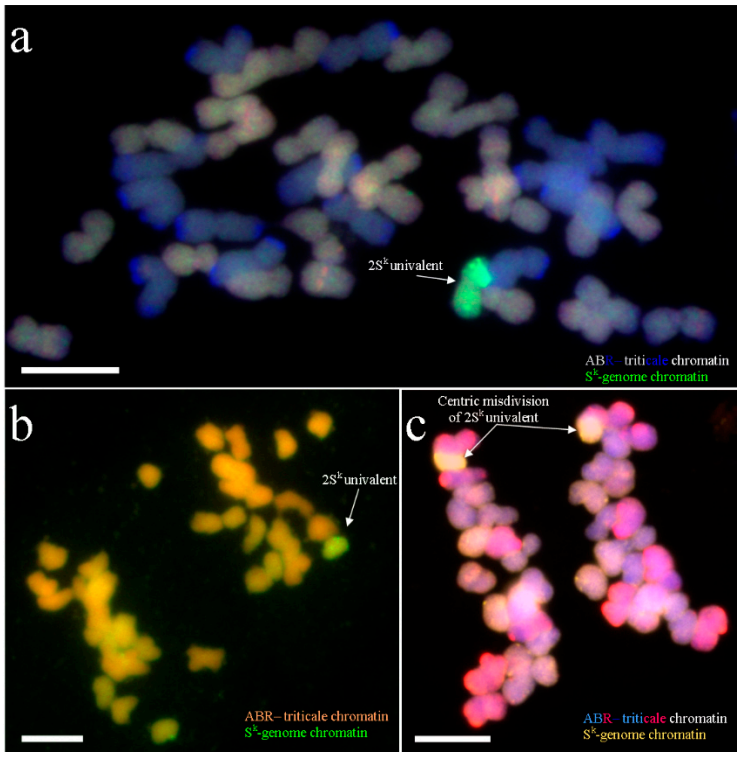

Figure 2. (**a**) Chromosome set of a 40 + M2R + M2S^k triticale plant (**b**) Segregation of chromosome $2S^k$ (green, Atto-488) at anaphase I in a 40 + M2R + M2S^k triticale plant. (**c**) Centric misdivision of chromosome $2S^k$ (yellow, Atto-647) at anaphase I in a 40 + M2R + M2S^k triticale plant. Scale bar, 10 µm.

3.2. Chromosome Segregation in 40 + M2RS + M2RL + M2S^k Plants of Triticale

The main goal of the experiment was to obtain triticale plants with introgression of a 2S^k chromosome segment on the 2R chromosome. Hence, we crossed monosomic substitution (40 + M2R + M2S^k) plants with double ditelosomic D2RSD2RL plants of triticale to obtain triple monosomic triticale plants (40 + M2RS + M2RL + M2S^k). These plants contained a single telosomic 2RS, a single telosomic 2RL and a single monosomic 2S^k chromosome (Figure 1b). 13,457 flowers of the ditelosomic line were pollinated with pollen collected from monosomic substitution M2S^k (M2R) plants, and 3464 seeds were obtained (25.74% crossing efficiency). The chromosomal constitution of 100 randomly chosen plants were examined by a combination of genomic and fluorescence in situ hybridization methods (GISH/FISH), using total genomic DNA of rye and *Aegilops* species, and pTa-103 centromere sequence, as probes. 38 plants were found to be triple monosomic (40 + M2RS + M2RL + M2S^k) (Figure 3), 35 lacked the 2R chromosomes (40 + N2R + M2S^k), 15 plants were ditelosomic (40 + M2RS + M2RL) and 12 plants were double telosomic (40 + D2RL).

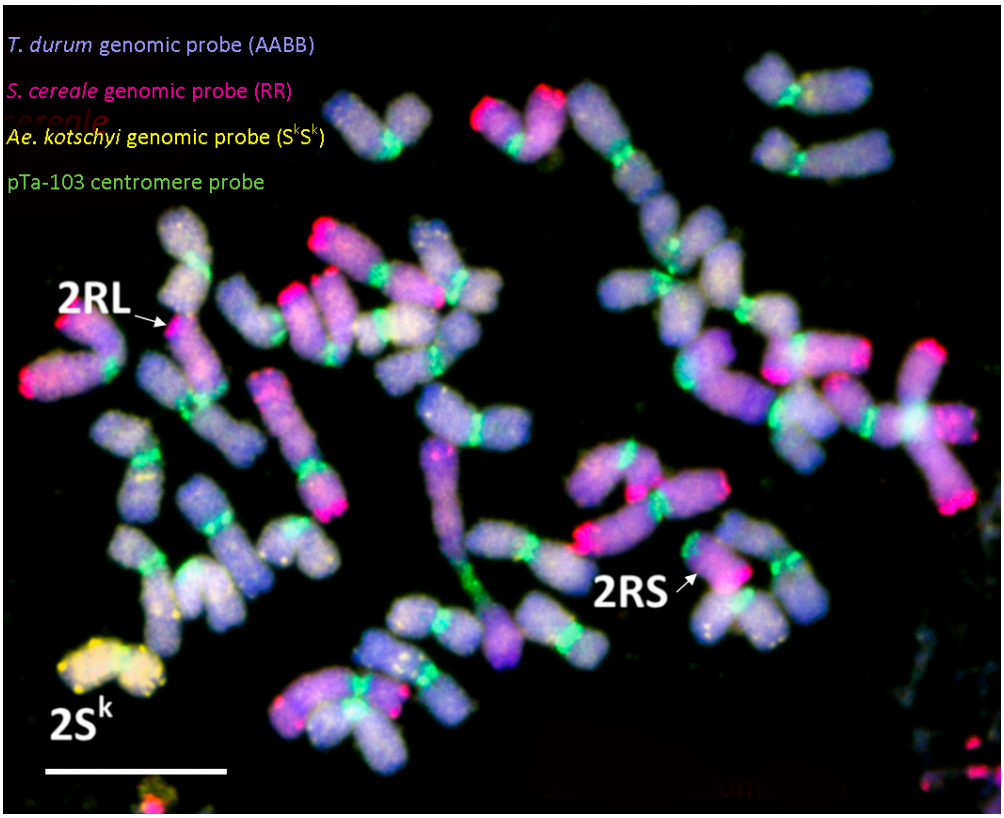

Figure 3. Karyotype of triticale plant carrying 40 + M2RS + M2RL + M2S^k chromosomes, examined by genomic/fluorescence in situ hybridization (GISH/FISH). Total genomic DNA of rye (red) and *Ae. tauschii* (yellow), and pTa103 centromere sequence (green) were used as probes. Scale bar, 10 µm.

The triple monosomics were selected from further analysis (38 plants; 40 + M2RS + M2RL + M2S^k), and MI and AI were observed in 10 PMCs of each plant. Chromosome 2S^k was present as a univalent in all PMCs examined. In most cases (35 plants; 92.11%), the *Aegilops* univalent underwent chromosome segregation and was moved randomly to one of the opposite poles of the cell (Figure 4a).

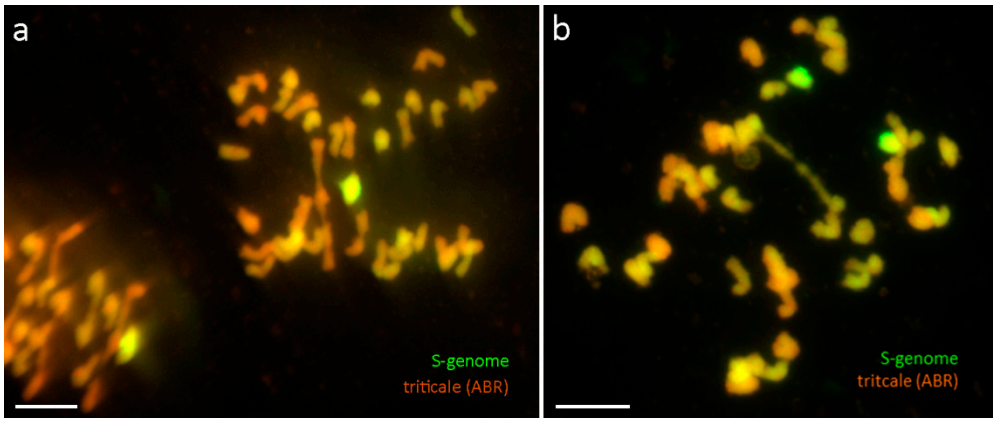

Figure 4. (**a**) Chromosome segregation of $2S^k$ (green, Atto-488) at anaphase I of triticale line 40 + M2RS + M2RL + $M2S^k$. (**b**) Centric misdivision of chromosome $2S^k$ (green, Atto-488) at anaphase I of triticale line 40 + M2RS + M2RL + $M2S^k$. Scale bar, 10 µm.

We also observed the misdivision of the $2S^k$ chromosome arms in three plants (7.89%) (Figure 4b). Next, a total number of 68 spikes of 38 offspring plants (40 + M2RS + M2RL + $M2S^k$) were self-pollinated, and 3489 seeds were obtained. The chromosome constitutions of 100 randomly chosen plants were examined by FISH/GISH, using repetitive sequences as probes (pTa-86; pTa-535 and total genomic DNA from rye). The results of chromosome $2S^k$ misdivision were observed in 13 plants, including: a double RobT-T2RS.$2S^k$L and T2S^kS.2RL (1 plant; Figure 5a, b and c); six plants carrying T2RS.$2S^k$L, four plants with T2S^kS.2RL, and two telosomic plants with the 2RS, 2RL and $2S^k$S chromosome arms (Table 2).

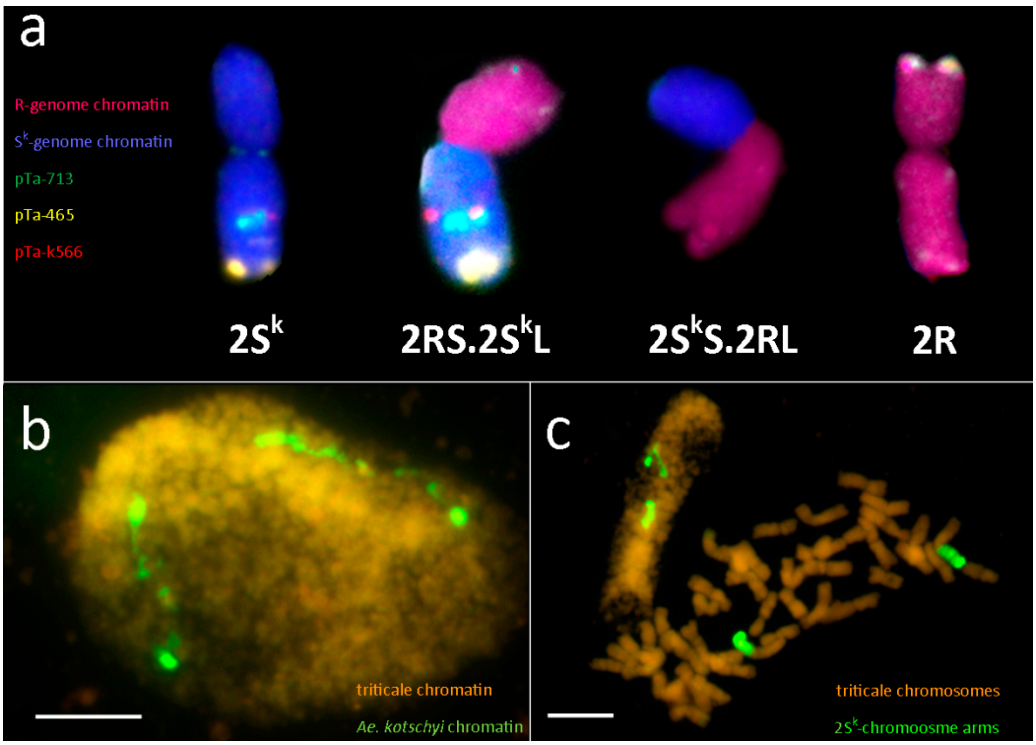

Figure 5. (**a**) T2S^k.2R Robertsonian translocations in triticale analysed by fluorescence in situ hybridization (R-genome chromatin—purple, S^k-genome chromatin—blue, pTa-713—green, pTa-465—yellow, pTa-k566—red). Genomic in-situ hybridization pattern of triticale plant carrying Robertsonian traslocations with segments of $2S^k$ chromosome (green) at prophase (**b**) and metaphase (**c**) of root meristem cell. Scale bar, 10 µm.

Table 2. Chromosome constitutions and Lr54 + Yr37 SSR marker analysis of triticale plants carrying divided $2S^k$ chromosome.

Plant No.	Chromosome Constitution	Chromosome Number	Amplicon Size for S14-410 Marker (bp)	Amplicon Size for S14-297 Marker (bp)
1	40 + M2RS + M2RL + M2S^kS	43	null	null
2	40 + T2RS.2S^kL + M2RL	42	410	297
3	40 + T2S^kS.2RL	41	null	null
4	40 + T2RS.2S^kL	41	410	297
5	40 + T2RS.2S^kL + M2RL	42	410	297
6	40 + T2RS.2S^kL + t2S^kS.2RL	42	410	297
7	40 + T2S^kS.2RL	41	null	null
8	40 + T2RS.2S^kL	41	410	297
9	40 + M2RS + M2RL + M2S^kS	43	null	null
10	40 + T2RS.2S^kL	41	410	297
11	40 + T2S^kS.2RL + M2RS	42	null	null
12	40 + T2RS.2S^kL + M2RL	42	410	297
13	40 + T2S^kS.2RL	41	null	null

3.3. Lr54 + Yr37 SSR Markers Analysis

Initial analysis of molecular markers S14-297 and S14-410, linked to Lr54 + Yr37 loci [21,22], was conducted on the parental lines; namely the monosomic substitution M2S^k (M2R) line and double ditelosomic D2RSD2RL triticale line. The same protocol was used to examine the subsequent offspring. An amplicon of 297bp (base pairs) was for obtained for the S14-297 marker, and 410bp for the S14-410 marker, as observed in control samples of *Ae. kotschyi* and double 40 + M2R + M2S^k monosomic plants (Figure 6). The same 410bp product was amplified form the 6 plants with T2RS.2S^kL RobTs and for 1 plant carrying double RobTs-T2RS.2S^kL and T2S^kS.2RL (Figure 6; Table 2).

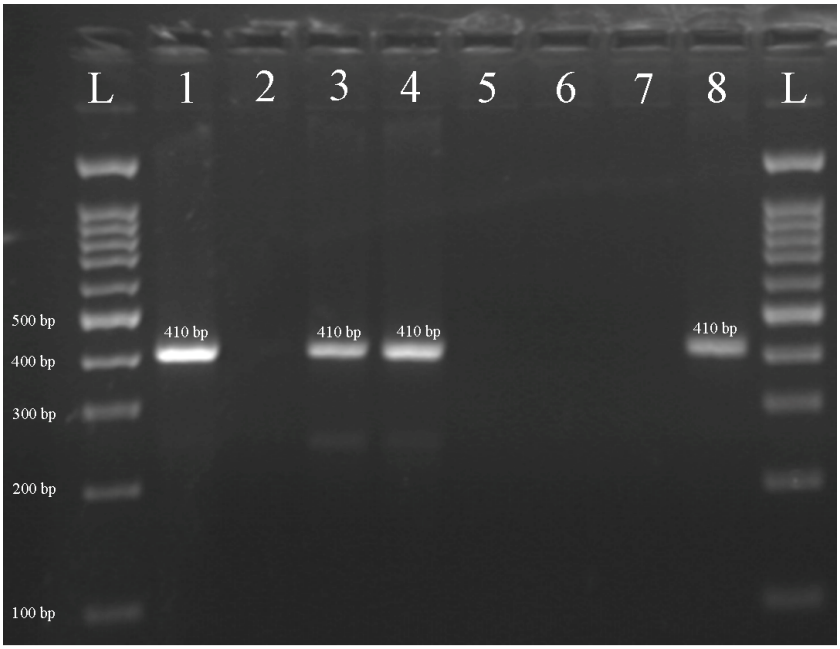

Figure 6. Amplification products of S14-410 marker linked to loci of *Lr54* + *Lr37* leaf and stem rust resistance genes. (**1**) *Aegilops kotschyi* (UUS^{k}S^k); (**2**) triticale 'Sekundo'(AABBRR); (**3**) double 40T + M2R + M2S^k monosomic; (**4**) T2RS.2S^kL and T2S^kS.2RL; (**5**) double ditelosomic D2RS + D2RL; (**6**) telosomic M2RS + M2RL + M2S^kS; (**7**) T2S^kS.2RL; (**8**) T2RS.2S^kL.

4. Discussion

Many reports have shown that RobTs in wheat can arise by centromeric misdivision of univalents at AI, followed by segregation of the derived telocentric chromosomes to the same nucleus, and fusion of the broken parts [26,30,31]. The focus of this study was to exploit the formation of RobTs to transfer of the *Lr54* + *Yr37* gene loci from *Ae. kotschyi* into triticale. We have focused on two essential aspects of this process: the frequency of univalent misdivision, and the frequency at which the broken chromosomes fuse to form a RobT. The control experiment used the standard approach of self-pollinating monosomic substitution (40 + M2R + M2S^{k}) of triticale. Genomic in-situ hybridization identified that chromosome 2S^{k} was present in all meiotic cells assayed, and the centromere was divided during AI in 9% of the PMCs surveyed. The same event was observed in PMCs isolated from the 40 + M2RS + M2RL + M2S^{k} plants. The frequency of PMCs where the centromere of the 2S^{k} univalent divided was 7.89%. Our results are comparable with other reports, showing that the frequency of univalent misdivision range between 3% up to 51% [26,30,31]. When both approaches were compared (40 + M2R + M2S^{k} vs 40 + M2RS + M2RL + M2S^{k}), no significant difference in the frequency at which the *Aegilops* univalent misdivided was observed. However, the 2R univalent did not misdivide in the control experiment, and the use of the double ditelosomic D2RS + D2RL in the alternative approach was justified.

It can be assumed that the probability of RobTs formation is dependent on the rate of centromere breakage, and subsequent formation of telocentric chromosomes, occurs during meiosis. In wheat, the frequency of recovery of wheat–alien RobTs is between 2% and 20%, depending on the chromosomes involved [23,26,30,31,40–44]. In our experiment, the progeny of monosomic substitution plants lacked any kind of triticale-*Aegilops* translocation. This could correlate with the lack of the 2R chromosome misdivision observed in these plants. Similar issues were reported by Ghazali et al. [45], who aimed to produce whole arm RobTs involving chromosomes 2B (wheat) and 2E^{b} (*Thinopyrum bessarabicum*). Surprisingly, the authors obtained only T2E^{b}S.2BL, while no 2BS.2E^{b}L RobTs were recovered [45]. It has been reported that rye chromosomes rearrange at a higher rate when compared to wheat chromosomes [46], with the long arm of chromosome 2R more readily fused with the chromosome arm of an alien species. For example, Fiebe et al. [47] derived 2BL.2RL RobTs carrying Hessian fly resistance gene *H21* in wheat cv. Hamlet. Rahmatov et al. [48] also obtained 2DS.2RL RobT, which transfered the stem rust resistance gene *Sr59* into wheat.

In our study, we have effectively used ditelosomic lines of triticale to increase the frequency of 2S^{k}.2R RobTs generated. Moreover, we have obtained both 2S^{k}S.2RL and 2RS.2S^{k}L RobTs. The ability to produce both types of RobTs was an important goal as the particular chromosome segments of *Aegilops* may harbor other desirable genes. To summarize, we obtained plants with chromosome translocations, which probably carry the *Lr54* + *Lr37* leaf and stem rust resistance genes. The next step of this project will be to phenotype the eleven RobTs lines for leaf rust or stripe rust resistance. If these tests succeed, such germplasm could be a valuable source for triticale resistance breeding.

Author Contributions: Conceptualization, M.T.K.; methodology, M.T.K.; validation, W.U.; formal analysis, W.U.; investigation, W.U., J.B., J.S. and R.S.; resources, M.T.K., H.W.; data curation, M.T.K., W.U.; writing—original draft preparation, W.U., M.T.K.; writing—review and editing, W.U., D.P. and M.T.K.; visualization, W.U., M.T.K.; supervision, M.T.K., D.P. and H.W.; project administration, M.T.K.; funding acquisition, M.T.K.

Funding: This research and the APC were funded by NATIONAL CENTRE FOR RESEARCH AND DEVELOPMENT, Poland (Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Polska), grant number LIDER/3/0004/L-8/16/NCBR/2017.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the administrative support provided by the Institute of Plan Genetics of the Polish Academy of Sciences.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Statistics Database 1998. Available online: http://www.fao.org/faostat (accessed on 28 June 2019).
2. McGoverin, C.M.; Snyders, F.; Muller, N.; Botes, W.; Fox, G.; Manley, M. A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 1155–1165. [CrossRef]
3. Meale, S.J.; McAllister, T.A. Grain for Feed and Energy. In *Triticale*; Eudes, F., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 167–187.
4. Pattison, A.L.; Trethowan, R.M. Characteristics of modern triticale quality: Commercially significant flour traits and cookie quality. *Crop Pasture Sci.* **2013**, *64*, 874–880. [CrossRef]
5. Rakha, A.; Åman, P.; Andersson, R. Dietary fiber in triticale grain: Variation in content, composition, and molecular weight distribution of extractable components. *J. Cereal Sci.* **2011**, *54*, 324–331. [CrossRef]
6. Woś, H.; Brzeziński, W. Triticale for Food—The Quality Driver. In *Triticale*; Eudes, F., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 213–232.
7. Arseniuk, E. Triticale Diseases—A Review. In *Triticale: Today and Tomorrow*; Guedes-Pinto, H., Darvey, N., Carnide, V.P., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1996; pp. 499–525.
8. Arseniuk, E.; Góral, T. Triticale Biotic Stresses—Known and Novel Foes. In *Triticale*; Eudes, F., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 83–108.
9. Tian, S.; Weinert, J.; Wolf, G.A. Infection of triticale cultivars by *Puccinia striiformis*: First report on disease severity and yield loss/Blatt-und Äenbefall sowie Ertragsverluste durch *Puccinia striiformis* in Triticale-Sorten. *Z. Für Pflanzenkrankh. Und Pflanzenschutz/J. Plant Dis. Prot.* **2004**, *111*, 461–464.
10. McIntosh, R.; Yamazaki, Y.; Devos, K.M.; Dubcovsky, J.; Rogers, W.J.; Appels, R. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*; Akadémiai Kiadó: Budapest, Hungary, 2003; Volume 49.
11. Adonina, I.G.; Orlovskaya, O.A.; Tereshchenko, O.Y.; Koren, L.V.; Khotyleva, L.V.; Shumny, V.K.; Salina, E.A. Development of commercially valuable traits in hexaploid triticale lines with *Aegilops* introgressions as dependent on the genome composition. *Russ. J. Genet.* **2011**, *47*, 453–461. [CrossRef]
12. Kwiatek, M.; Belter, J.; Majka, M.; Wiśniewska, H. Allocation of the S-genome chromosomes of *Aegilops variabilis* Eig. carrying powdery mildew resistance in triticale (×*Triticosecale* Wittmack). *Protoplasma* **2016**, *253*, 329–343. [CrossRef]
13. Kwiatek, M.; Majka, M.; Wiśniewska, H.; Apolinarska, B.; Belter, J. Effective transfer of chromosomes carrying leaf rust resistance genes from *Aegilops tauschii* Coss. into hexaploid triticale (X *Triticosecale* Witt.) using *Ae. tauschii* × *Secale cereale* amphiploid forms. *J. Appl. Genet.* **2015**, *56*, 163–168. [CrossRef]
14. Salmanowicz, B.P.; Langner, M.; Wiśniewska, H.; Apolinarska, B.; Kwiatek, M.; Błaszczyk, L. Molecular, physicochemical and rheological characteristics of introgressive *Triticale/Triticum monococcum* ssp. *monococcum lines with wheat 1D/1A chromosome substitution. Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 15595–15614.
15. Kang, H.; Wang, H.; Huang, J.; Wang, Y.; Li, D.; Diao, C.; Zhu, W.; Tang, Y.; Wang, Y.; Fan, X.; et al. Divergent Development of Hexaploid Triticale by a Wheat–Rye–*Psathyrostachys huashanica* Trigeneric Hybrid Method. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155667. [CrossRef]
16. Schneider, A.; Molnár, I.; Molnár-Láng, M. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica* **2008**, *163*, 1–19. [CrossRef]
17. Prażak, R.; Paczos-Grzęda, E. Gene transfer from *Aegilops kotschyi* Boiss. to *Triticum aestivum* L. *Adv. Agric. Sci. Probl.* **2010**, *555*, 613–620.
18. Rawat, N.; Neelam, K.; Tiwari, V.K.; Randhawa, G.S.; Friebe, B.; Gill, B.S.; Dhaliwal, H.S. Development and molecular characterization of wheat-*Aegilops kotschyi* addition and substitution lines with high grain protein, iron, and zinc. *Genome* **2011**, *54*, 943–953. [CrossRef]
19. Antonov, A.I.; Marais, G.F. Identification of leaf rust resistance genes in *Triticum* species for transfer to common wheat. *S. Afr. J. Plant Soil* **1996**, *13*, 55–60. [CrossRef]
20. Marais, G.F.; McCallum, B.; Snyman, J.E.; Pretorius, Z.A.; Marais, A.S. Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr54* and *Yr37* transferred to wheat from *Aegilops kotschyi*. *Plant Breed.* **2005**, *124*, 538–541. [CrossRef]
21. Heyns, I.; Pretorius, Z.A.; Marais, F. Derivation and Characterization of Recombinants of the *Lr54/Yr37* Translocation in Common Wheat. *Open Plant Sci. J.* **2011**, *5*, 1–8. [CrossRef]
22. Smit, C. Pyramiding of Novel Rust Resistance Genes in Wheat, Utilizing Marker Assisted Selection and Doubled Haploid Technology. Master's Thesis, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa, 2013. RSA.

23. Qi, L.; Friebe, B.; Zhang, P.; Gill, B.S. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromosome Res.* **2007**, *15*, 3–19. [CrossRef]
24. Sears, E. Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma* **1950**, *4*, 535–550. [CrossRef]
25. Sánchez-Monge, E. Two Types of Misdivision of the Centromere. *Nature* **1950**, *165*, 80–81. [CrossRef]
26. Friebe, B.; Zhang, P.; Linc, G.; Gill, B.S. Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogenet. Genome Res.* **2005**, *109*, 293–297. [CrossRef]
27. Robertson, W.R.B. Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of tettigidae and acrididae: V-shaped chromosomes and their significance in *acrididae*, *locustidae*, and *gryllidae*: Chromosomes and variation. *J. Morph.* **1916**, *27*, 179–331. [CrossRef]
28. Lukaszewski, A.J.; Gustafson, J.P. Translocations andmodifications of chromosomes in triticale × wheat hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **1983**, *64*, 239–248. [CrossRef]
29. Lukaszewski, A.J. Further manipulation by centric misdivision of the 1RS.1BL translocation in wheat. *Euphytica* **1997**, *94*, 257–261. [CrossRef]
30. Qi, L.L.; Pumphrey, M.O.; Friebe, B.; Zhang, P.; Qian, C.; Bowden, R.L.; Rouse, M.N.; Jin, Y.; Gill, B.S. A novel Robertsonian translocation event leads to transfer of a stem rust resistance gene (*Sr52*) effective against race *Ug99* from *Dasypyrum villosum* into bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* **2011**, *123*, 159–167. [CrossRef]
31. Türkösi, E.; Darko, E.; Rakszegi, M.; Molnár, I.; Molnár-Láng, M.; Cseh, A. Development of a new 7BS.7HL winter wheat-winter barley Robertsonian translocation line conferring increased salt tolerance and (1,3;1,4)-β-D-glucan content. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206248.
32. Lukaszewski, A.J.; Curtis, C.A. Transfer of the Glu-D1 gene fromchromosome 1D of bread wheat to chromosome 1R in hexaploidtriticale. *Plant Breed.* **1992**, *109*, 203–210. [CrossRef]
33. Lukaszewski, A.J. Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. *Crop Sci.* **2000**, *40*, 216–225. [CrossRef]
34. Lukaszewski, A.J. Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve bread-making quality of hexaploid triticale. *Crop Sci.* **2006**, *46*, 2183–2194. [CrossRef]
35. Kwiatek, M.T.; Wiśniewska, H.; Ślusarkiewicz-Jarzina, A.; Majka, J.; Majka, M.; Belter, J.; Pudelska, H. Gametocidal Factor Transferred from *Aegilops geniculata* Roth Can Be Adapted for Large-Scale Chromosome Manipulations in Cereals. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 409. [CrossRef]
36. Heckmann, S.; Jankowska, M.; Schubert, V.; Kumke, K.; Ma, W.; Houben, A. Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4979. [CrossRef]
37. Zwierzykowski, Z.; Zwierzykowska, E.; Taciak, M.; Jones, N.; Kosmala, A.; Krajewski, P. Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* x *Lolium perenne* revealed by genomic in situ hybridization (GISH). *Chromosome Res.* **2008**, *16*, 575–585. [CrossRef]
38. Komuro, S.; Endo, R.; Shikata, K.; Kato, A. Genomic and chromosomal distribution patterns of various repeated DNA sequences in wheat revealed by a fluorescence in situ hybridization procedure. *Genome* **2013**, *56*, 131–137. [CrossRef] [PubMed]
39. Kwiatek, M.T.; Kurasiak-Popowska, D.; Mikołajczyk, S.; Niemann, J.; Tomkowiak, A.; Weigt, D.; Nawracała, J. Cytological markers used for identification and transfer of *Aegilops* spp. chromatin carrying valuable genes into cultivated forms of *Triticum*. *Comp. Cytogenet.* **2019**, *13*, 41–59. [CrossRef] [PubMed]
40. Ardalani, S.; Mirzaghaderi, G.; Badakhshan, H. A Robertsonian translocation from *Thinopyrum bessarabicum* into bread wheat confers high iron and zinc contents. *Plant Breed.* **2016**, *135*, 286–290. [CrossRef]
41. Tanaka, H.; Nabeuchi, C.; Kurogaki, M.; Garg, M.; Saito, M.; Ishikawa, G.; Nakamura, T.; Tsujimoto, H. A novel compensating wheat–*Thinopyrum elongatum* Robertsonian translocation line with a positive effect on flour quality. *Breed. Sci.* **2017**, *67*, 509–517. [CrossRef] [PubMed]
42. Danilova, T.V.; Friebe, B.; Gill, B.S.; Poland, J.; Jackson, E. Development of a complete set of wheat–barley group-7 Robertsonian translocation chromosomes conferring an increased content of β-glucan. *Theor. Appl. Genet.* **2018**, *131*, 377–388. [CrossRef] [PubMed]
43. Vega, J.M.; Feldman, M. Effect of the pairing gene *Ph1* on centromere misdivision in common wheat. *Genetics* **1998**, *148*, 1285–1294. [PubMed]
44. Steinitz-Sears, L.M. Somatic Instability of Telocentric Chromosomes in Wheat and the Nature of the Centromere. *Genetics* **1966**, *54*, 241–248.

45. Ghazali, S.; Mirzaghaderi, G.; Majdi, M. Production of a novel Robertsonian translocation from *Thinopyrum bessarabicum* into bread wheat. *Cytol. Genet.* **2015**, *49*, 378–381. [CrossRef]
46. Devos, K.M.; Atkinson, M.D.; Chinoy, C.N.; Francis, H.A.; Harcourt, R.L.; Koebner, R.M.D.; Liu, C.J.; Masojć, P.; Xie, D.X.; Gale, M.D. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.* **1993**, *85*, 673–680. [CrossRef]
47. Friebe, B.; Hatchett, J.H.; Sears, R.G.; Gill, B.S. Transfer of Hessian fly resistance from 'Chaupon' rye to hexaploid wheat via a 2BS/2RL wheat-rye chromosome translocation. *Theor. Appl. Genet.* **1990**, *79*, 385–389. [CrossRef]
48. Rahmatov, M.; Rouse, M.N.; Nirmala, J.; Danilova, T.; Friebe, B.; Steffenson, B.J.; Johansson, E. A new 2DS•2RL Robertsonian translocation transfers stem rust resistance gene *Sr59* into wheat. *Theor. Appl. Genet.* **2016**, *129*, 1383–1392. [CrossRef] [PubMed]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

12.2 Oświadczenia współautorów

Poznań, 20.05.2021

Mgr Waldemar Ulaszewski

Zakład Struktury i Funkcji Genów

Instytut Genetyki Roślin

Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w ramach pracy:

Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Halina Wiśniewska, Joanna Szymczak, Roksana Skowrońska, Dylan Phillips, Michał T. Kwiatek (2019). **Recovery of 2R.2Sk Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations.** Agronomy, 9(10), 646, doi: https://doi.org/10.3390/agronomy9100646

byłem zaangażowany w:

- optymalizację metodologii badań
- prowadzenie badań oraz pozyskiwanie wyników w zakresie przedstawionym w niniejszej rozprawie
- przechowywanie danych
- przygotowanie pierwotnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu
- edycję manuskryptu

Waldemar Ulaszewski

Podpis

Poznań, 20.05.2020

Mgr inż. Jolanta Belter

Zakład Struktury i Funkcji Genów

Instytut Genetyki Roślin

Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Halina Wiśniewska, Joanna Szymczak, Roksana Skowrońska, Dylan Phillips, Michał T. Kwiatek (2019). **Recovery of 2R.2Sk Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations.** Agronomy, 9(10), 646, doi: https://doi.org/10.3390/agronomy9100646

uczestniczyłam w prowadzeniu badań.

.....Jolanta Belter.....

Podpis

Poznań, 20.05.2021

Prof. dr hab. Halina Wiśniewska

Zakład Struktury i Funkcji Genów

Instytut Genetyki Roślin

Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Halina Wiśniewska, Joanna Szymczak, Roksana Skowrońska, Dylan Phillips, Michał T. Kwiatek (2019). **Recovery of 2R.2Sk Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations.** Agronomy, 9(10), 646, doi: https://doi.org/10.3390/agronomy9100646

zaangażowana byłam w:

- zapewnienie części materiałów potrzebnych do realizacji badań
- nadzór realizacji prac

.....

Podpis

Ostrów Wielkopolski, 20.05.2021

Mgr inż. Joanna Szymczak

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w ramach publikacji:

Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Halina Wiśniewska, Joanna Szymczak, Roksana Skowrońska, Dylan Phillips, Michał T. Kwiatek (2019). **Recovery of 2R.2Sk Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations.** Agronomy, 9(10), 646, doi: https://doi.org/10.3390/agronomy9100646
uczestniczyłam w prowadzeniu badań.

Szymczak Joanna

.....

Podpis

Poznań, 20.05.2020

Mgr Roksana Skowrońska

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Halina Wiśniewska, Joanna Szymczak, Roksana Skowrońska, Dylan Phillips, Michał T. Kwiatek (2019). **Recovery of 2R.2Sk Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations.** Agronomy, 9(10), 646, doi: https://doi.org/10.3390/agronomy9100646

uczestniczyłam w prowadzeniu badań.

Roksana Skowrońska

.....

Podpis

Aberystwyth, 20.05.2021

Dr Dylan Phillips

Institute of Biological,

Environmental and Rural Sciences

Aberystwyth University

DECLARATION

I declare that in the paper:

Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Halina Wiśniewska, Joanna Szymczak, Roksana Skowrońska, Dylan Phillips, Michał T. Kwiatek (2019). **Recovery of 2R.2Sk Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations.** Agronomy, 9(10), 646, doi: https://doi.org/10.3390/agronomy9100646

I was involved in writing—review editing and supervision

……..……

Signature

Poznań, 20.05.2021

Prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Waldemar Ulaszewski, Jolanta Belter, Halina Wiśniewska, Joanna Szymczak, Roksana Skowrońska, Dylan Phillips, Michał T. Kwiatek (2019). **Recovery of 2R.2Sk Triticale-*Aegilops kotschyi* Robertsonian Chromosome Translocations.** Agronomy, 9(10), 646, doi: https://doi.org/10.3390/agronomy9100646

byłem zaangażowany w:

- zaprojektowanie badań
- dobranie metodologii badań
- pozyskanie części materiałów niezbędnych do realizacji badań
- przechowywanie danych
- przygotowanie pierwotnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu
- wizualizację wyników
- nadzór realizacji prac
- zarządzanie projektem
- pozyskanie środków finansowych na realizację badań.

.....

Podpis