

Received: 13.02.2015 / Accepted: 15.05.2015

Identification of the resistance gene to leaf rust (*Puccinia recondita*) using the *Xgdm87* marker in the Polish wheat varieties

Identyfikacja genu odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita*) z wykorzystaniem markera *Xgdm87* w polskich odmianach pszenicy ozimej

Agnieszka Tomkowiak, Dominika Pawlak, Jerzy Nawracała, Danuta Kurasiak-Popowska*, Dorota Weigt, Sylwia Mikołajczyk, Janetta Niemann, Mateusz Pluta

Summary

Leaf rust, caused by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* is one of the most important diseases of wheat. Introduction of resistance genes is the best way to protect plants against diseases. Due to the appearance of new races of the pathogen the stability of plant resistance can be obtained by introducing and accumulating new resistance genes. So far *Lr50* gene had been used in a small scale in Polish wheat breeding. The aim of this study was to verify the effectiveness of the marker *Xgdm87* in winter wheat reference genotypes obtained from the National Small Grains Collection from the United States and then to test the 13 Polish winter wheat varieties for the presence of the gene *Lr50*. *Xgdm87* marker linked to the gene *Lr50* was identified in the reference materials, and then in 2 varieties of winter wheat: Arkadia and Astoria.

Key words: wheat; brown rust; SSR molecular markers

Streszczenie

Jedną z ważnych chorób pszenicy jest rdza brunatna wywołana przez *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Najlepszym sposobem ochrony roślin przed chorobami jest wprowadzenie genów odporności. Z powodu pojawiania się nowych ras patogena zapewnienie trwałej odporności roślin można uzyskać wprowadzając i kumulując nowe geny odporności. Gen *Lr50* dotychczas był w małym stopniu wykorzystywany w polskiej hodowli pszenicy. Celem pracy było sprawdzenie skuteczności markera *Xgdm87* w genotypach referencyjnych pszenicy ozimej otrzymanych z Narodowej Kolekcji Roślin Zbożowych (National Small Grains Collection) ze Stanów Zjednoczonych, a następnie przetestowanie 13 polskich odmian pszenicy ozimej na obecność genu *Lr50*. Marker *Xgdm87* sprzężony z genem *Lr50* został zidentyfikowany w materiałach referencyjnych oraz w polskich odmianach pszenicy ozimej Arkadia oraz Astoria.

Słowa kluczowe: pszenica; rdza brunatna; markery molekularne SSR

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Dojazd 11, 60-632 Poznań
*corresponding author: popowska@up.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Pszenica ozima narażona jest na działanie wielu chorób atakujących zarówno źdźbło, liście, korzenie, jak i kłosa. Straty wywołane przez agrofagi w produkcji pszenicy ozimej ocenia się na 20–40%, w których największy udział stanowią choroby grzybowe. Ze względu na szerokie rozprzestrzenianie się oraz potencjał epidemiologiczny, rdza brunatna powodowana przez *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* zaliczana jest do najpoważniejszych chorób (Kolmer i wsp. 2007; Lind i Gultyaeva 2007; Bolton i wsp. 2008; Khan i wsp. 2013). Dążenie do ograniczenia chemicznych metod ochrony roślin wymusiło poszukiwanie innych możliwości walki z tą chorobą (Zamorski i wsp. 2001). Obecnie najskuteczniejszą metodą walki spełniającą powyższe wymagania jest hodowla odpornościowa (Chelkowski i Stępień 2005; Okoń i wsp. 2012). Dotychczas udało się zidentyfikować ponad 70 genów odporności na rdzę brunatną (McIntosh i wsp. 2012), z których większość pochodzi z dzikich gatunków pszenicy. Poszukiwanie nowych genów warunkujących odporność jest niezbędne ze względu na ciągle zmiany wirulentności patogena i jego zdolności do adaptacji w różnych warunkach klimatycznych, powodujące utratę odporności przez odmianę (Bolton i wsp. 2008). Jednym z nich jest gen *Lr50* pochodzący z *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum*. Niezbędnym narzędziem diagnostycznym w nowoczesnej hodowli roślin uprawnych pozwalającym na identyfikację genów odporności są techniki molekularne wykorzystujące markery specyficzne. Jednym z nich jest szeroko stosowany marker SSR (Simple Sequence Repeats) wykrywający różnice w zmiennej liczbie powtórzeń mikrosatelitarnych.

Celem pracy było przetestowanie 13 polskich odmian pszenicy ozimej na obecność genu *Lr50* z wykorzystaniem markera *Xgdm87* oraz identyfikacja tego genu w materiałach referencyjnych pszenicy ozimej otrzymanych z Na-

rodowej Kolekcji Roślin Zbożowych (National Small Grains Collection) ze Stanów Zjednoczonych.

Materiały i metody / Materials and methods

Przedmiotem badań było 13 polskich odmian pszenicy ozimej oraz 3 odmiany referencyjne: KS96WGRC36 (Tam 107*4 × TA 870 z *T. armeniacum*), Tam 107 (Tam 105*4 × Amigo) – odporne na rdzę brunatną oraz Wichita (Early Blackull × Tenmarq) podatna na rdzę. Materiały referencyjne otrzymano z Narodowej Kolekcji Roślin Zbożowych znajdującej się w Rolniczej Stacji Doświadczalnej (Agriculture Research Station) w Aberdeen.

Odmiany polskie otrzymano z Rolniczego Gospodarstwa Doświadczalnego w Dłoni, stanowiącego jednostkę organizacyjną Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Podstawowe informacje o badanych odmianach zamieszczono w tabeli 1.

Isolację DNA prowadzono wykorzystując zestaw do izolacji DNA z roślin Genomic Mini AX PLANT firmy A&A BIOTECHNOLOGY zgodnie z procedurą dołączoną do zestawu. Stężenie DNA oznaczono za pomocą spektrofotometru NanoDrop. Próby rozcieńczono wodą destylowaną w celu uzyskania jednakowego stężenia 25 ng/μl. PCR (Polymerase Chain Reaction) przeprowadzono w mieszaninie o składzie: woda – 5 μl, DreamTaqTMGreen PCR Master Mix – 6,25 μl, startery – 2x 0,25 μl, matryca DNA – 1 μl.

Identyfikację markera genu *Lr50* przeprowadzono z wykorzystaniem starterów *GDM87* wyprodukowanych przez firmę IDT (Integrated DNA Technologies), dystrybutorem których była firma Symbios Sp. z o.o. Amplifikowano produkt o wielkości 110 pz. Sekwencje starterów: *GDM87* – 5' AAT AAT GTG GCA GCA AGT CTT GG 3', *GDM87* – 5' CCA AGC CCC AAT CTC TCT CT 3'.

Tabela 1. Stopień odporności na porażenie przez *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* 13 przebadanych odmian
Table 1. The degree of resistance to infection by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in 13 tested varieties

Odmiana Variety	Hodowla Breeding	Odporność na rdzę brunatną Resistance to leaf rust	Źródło informacji Source of information
Arkadia	Hodowla Roślin (HR) Danko	dobra – good	www.danko.pl
Astoria	Poznańska HR	średnia – average	www.phr.pl
Bamberka	HR Strzelce	dobra – good	www.hr-strzelce.pl
Figura	HR Danko	średnia – average	www.danko.pl
Mewa	HR Danko	dobra – good	www.danko.pl
Muszelka	HR Danko	dobra – good	www.danko.pl
Natula	HR Nasiona Kobierzyc	bardzo dobra – very good	www.nasiona.com.pl
Nutka	HR Strzelce	dobra – good	www.hr-strzelce.pl
Smuga	HR Danko	średnia – average	www.danko.pl
Tulecka	Poznańska HR	dobra – good	www.phr.pl
Tonacja	HR Strzelce	dobra – good	www.hr-strzelce.pl
Wydma	HR Smolice	niska – low	www.cbr.edu.pl
Zyta	HR Strzelce	dobra – good	www.hr-strzelce.pl

Amplifikację markerów SSR–PCR przeprowadzono za pomocą termocyklera gradientowego TProfessional Basic Gradient Thermocycler. Testowano różne warunki reakcji PCR i wybrano następujący wariant – denaturacja wstępna: 2 min w 94°C, 40 cykli (denaturacja: 30 s w 94°C, przyłączanie starterów, synteza: 60 s w 72°C, denaturacja: 30 s w 90°C, przyłączanie starterów: 30 s w 56°C, synteza: 60 s w 72°C), synteza końcowa: 5 min w 72°C, przechowywanie: max. 24 h w 4°C.

Elektroforezę prowadzono w żelu agarozowym o stężeniu od 1,5 do 3%. W celu wizualizacji żel przenoszono na transiluminator High Performance UV Transiluminator UVP. Obrazy archiwizowano za pomocą systemu KTE – Video.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W celu optymalizacji warunków reakcji PCR testowano 5 różnych jej wariantów. Najlepszy do identyfikacji markera *Xgdm87* genu *Lr50* okazał się wariant podany w metodyce. Na żelu otrzymano wyraźne produkty amplifikacji o wielkości 110 pz na ścieżkach z odmianami referencyjnymi KS96WGRC36 oraz Tam 107. W odmianie Wichita nie zaobserwowano produktu amplifikacji na tej wysokości. Uzyskiwany obraz był powtarzalny (rys. 1).

Do identyfikacji genu *Lr50* w 13 polskich odmianach pszenicy wykorzystano ten sam wariant reakcji PCR, który okazał się skuteczny w identyfikacji markera *Xgdm87* w materiałach referencyjnych. Produkt amplifikacji o wielkości 110 pz zaobserwowano w odmianach Arkadia oraz Astoria. Uzyskany obraz elektroforetyczny był powtarzalny (rys. 2).

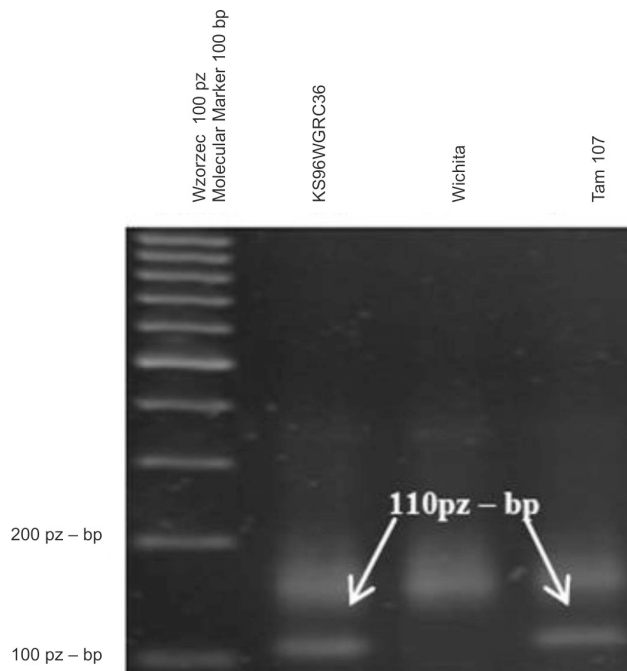
Geny warunkujące odporność pszenicy to w większości geny główne, zapewniające odporność na szeroką gamę patogenów i szkodników. Kodowane przez nie białka pełniące rolę receptorów oddziałują z produktami genów awirulencji patogenów i uruchamiają szlak transdukcji sygnału, który prowadzi do reakcji nadwrażliwości, a to z kolei zapobiega szerzeniu się infekcji (Pietrusińska 2010). Ciekawym zjawiskiem jest występowanie genów PR (Partial Resistance) zapewniających wyłącznie odporność częściową. Geny odporności na rdzę brunatną dają odporność w stadium rośliny dorosłej (APR – Adult Plant Resistance) lub też warunkują odporność w stadium rośliny dorosłej, jak i w stadium siewki i określane są jako SPR (Seedling Plant Resistance) (Błaszczyk i Chełkowski 2010).

Według informacji zawartych na stronie www.maswheat.ucdavis.edu, dwie rasy patogena: PNMQ oraz MBRL wykazują wirulencję w stosunku do siewek posiadających gen *Lr50*. Użyteczność genu *Lr50* może być ograniczona jeśli nie będzie on występował razem z innymi genami zapewniającymi odporność na rasę PNMQ, np.: *Lr9*, *Lr24*, *Lr41*. Według Dzhenin i wsp. (2009) gen *Lr50* jest bardzo interesujący dla nowoczesnej hodowli ze względu na małą częstotliwość występowania w populacji pszenicy. Odporność różnych odmian pszenicy nie jest cechą stałą. Odmiana, do której przeniesiono pojedynczy gen *Lr*, może stać się po jakimś czasie podatna na patogen. W związku z tym bardziej odporną roślinę

można otrzymać przez piramidyzację kilku genów R do jej genotypu (Nelson 1978). Mimo, że nie stwierdzono do tej pory w Polsce ani w Europie ras *P. recondita* wirulentnych odnośnie genu *Lr50* przyczynił się on znacząco do zwiększenia zdrowotności upraw pszenicy w Europie (Czembor i Pietrusińska 2005). Włączenie genów *Lr50* do polskich odmian posiadających inne geny odporności na rdzę, może znacząco wpłynąć na ich zdrowotność.

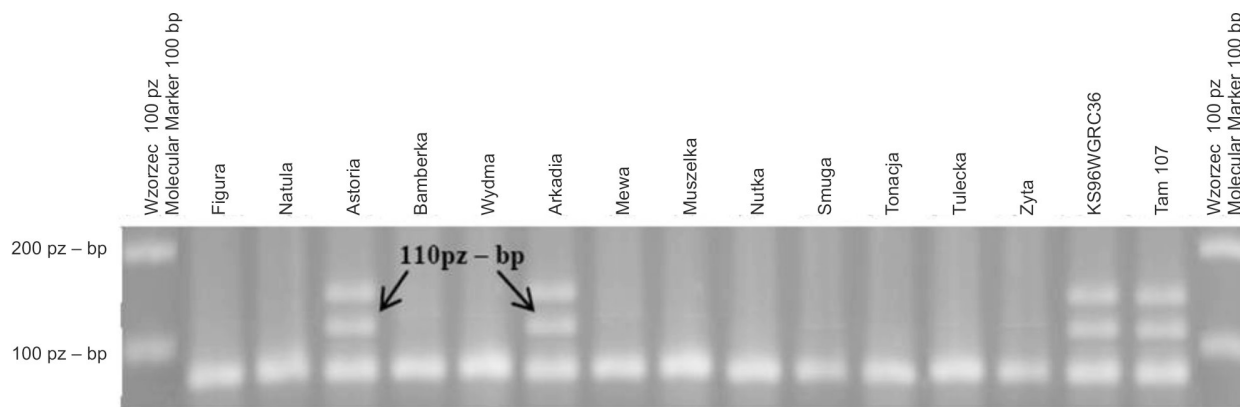
Dane literaturowe dotyczące występowania konkretnych genów *Lr* zarówno w polskich, jak i zagranicznych odmianach nie zawsze są jednoznaczne. Najczęściej jednak, jako występujące w polskich odmianach pszenicy wymienia się geny: *Lr1*, *Lr3*, *Lr11*, *Lr13*, *Lr14*, *Lr16* i *Lr26* (Chełkowski i Stępień 2001). W krajach europejskich występują odmiany posiadające geny: *Lr10*, *Lr17*, *Lr20*, i *Lr37* (Tyrka i Chełkowski 2004). Badania nad obecnością genów *Lr* w odmianach europejskich prowadził Winzeler i wsp. (2000). Geny jakie zidentyfikował to: *Lr1*, *Lr3a*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr17b*, *Lr20*, *Lr26* oraz *Lr37*. Za skuteczne, jednak nie występujące w polskich odmianach, uważa się geny: *Lr9*, *Lr19*, *Lr23*, *Lr24* i *Lr25*. Geny *Lr9*, *Lr19*, *Lr41*, *Lr42*, *Lr47*, *Lr50* i *Lr55* ocenia się jako efektywne w całej Europie.

W pracy do identyfikacji genów odporności na rdzę brunatną wykorzystano system markerów molekularnych SSR. System ten opiera się na analizie sekwencji mikrosatelitarnych DNA składających się z powtórzonego 10–50 razy motywu o długości 1–4 nukleotydów, według Zeb i wsp. (2009) 2–6 nukleotydów.



Rys. 1. Obraz elektroforetyczny produktów PCR (profil nr V) w 2,3% żelu agarozowym po włączeniu do reakcji pary starterów GDM87 – L i GDM87 – P. Marker masy cząsteczkowej O’RangeRuler 100 pz

Fig. 1. The image electrophoresis of PCR products (Profile No. V) in 2.3% agarose gel after switching to the reaction primer pairs GDM87 – L and GDM87 – P. Pattern O’RangeRuler 100 bp



Rys. 2. Obraz elektroforetyczny produktów PCR (profil nr V) w 2,5% żelu agarozowym po włączeniu do reakcji pary starterów GDM87 – L i GDM87 – P. Marker masy cząsteczkowej O'RangeRuler 100 pz

Fig. 2. The image electrophoresis of PCR products (Profile No. V) in 2.5% agarose gel after switching to the reaction primer pairs GDM87 – L and GDM87 – P. Pattern O'RangeRuler 100 bp

Według Narodowej Kolekcji Roślin Zbożowych z USA, z którego sprowadzone zostały 3 genotypy referencyjne, źródłem genu odporności *Lr50* na rdzę brunatną jest odmiana KS96WGRC36, dlatego została wykorzystana jako materiał kontrolny posiadający gen *Lr50*. Zdaniem Brown-Guedira i wsp. (2003), źródłem genu w tej odmianie jest forma TA 870 *T. timopheevii* ssp. *armeniacum*. Gen *Lr50* jest pierwszym genem odporności na rdzę brunatną pszenicy przeniesionym z dzikiego gatunku *T. timopheevii* i jest jedynym genem *Lr* zlokalizowanym na długim ramieniu 2. grupy chromosomów homologicznych. *T. timopheevii*, jak podaje Leonova i wsp. (2011) to doskonałe źródło genów odporności przeciw patogenom wywołującym rdzę oraz mączniaka. Informacje dotyczące lokalizacji markera *Xgdm87* nie są jednoznaczne. Według McIntosh i wsp. (2005) oraz informacji zawartych na stronie www.maseheat.ucdavis.edu, marker ten zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 2B w odległości 9,4 cM od genu *Lr50*. Zdaniem Hanif i wsp. (2008) jest on zlokalizowany na chromosomie 2D. Według informacji zawartych na stronie www.mashwheat.ucdavis.edu, o występowaniu genu *Lr50* świadczy obecność produktu amplifikacji na wysokości 110 pz.

Potwierdzeniem uzyskanych wyników mogą być badania Brown-Guedira i wsp. (2003), w których wykazano obecność genu *Lr50* w tych samych odmianach referencyjnych oraz dodatkowo w linii TA 870, której nie wykorzystywano w doświadczeniu. Przeprowadzone analizy oraz badania Brown-Guedira i wsp. (2003) potwierdziły brak genu *Lr50* w odmianie Wichita. O obecności genu *Lr50* w odmianie KS96WGRC36 oraz o skuteczności jego identyfikacji za pomocą markera *Xgdm87* mogą świadczyć również badania przeprowadzone przez Czembora i Pietrusińską (2005).

Z użyciem markera *Xgdm87* przeprowadzono badania na 13 polskich odmianach pszenicy ozimej. Izolacja DNA, łańcuchowa reakcja polimerazy PCR oraz elektroforeza wykonane zgodnie z podaną metodyką pozwoliły stwierdzić obecność pożądanego produktu amplifikacji w odmianach Arkadia oraz Astoria. Otrzymany obraz był powtarzalny. Potwierdzenia wyników można szukać w danych charakteryzujących badane odmiany pod względem odporności

na rdzę brunatną. Informacje takie podawane są przez spółki hodowlane, w których poszczególne odmiany zostały wyprowadzone. Analizowane odmiany, u których zidentyfikowano produkt o wielkości 110 pz charakteryzowały się dobrą i średnią odpornością na rdzę brunatną (tab. 1). Arkadia, wyhodowana przez DANKO Hodowlę Roślin została wpisana do Krajowego Rejestru w 2011 roku, a odmiana Astoria z Poznańskiej Hodowli Roślin w roku 2012 (www.coboru.pl). Są to nowe, czołowe odmiany polskie o bardzo korzystnych cechach rolniczo-użytkowych. Obie odmiany w badaniach przeprowadzonych w ramach Porejestrowego Doświadczalnictwa Odmianowego i Rolniczego odznaczały się odpornością na rdzę brunatną na poziomie 7,3 w skali 9-stopniowej (9 – brak porażenia, 1 – porażenie pełne). Analizując polową odporność roślin należy pamiętać, iż w przypadku rdzy brunatnej zależy ona od poszczególnych genów *Lr* występujących w danej odmianie. W pracy Okonia i wsp. (2012) we wszystkich 60 badanych liniach pszenicy zwyczajnej pochodzących z Poznańskiej Hodowli Roślin oraz 44 liniach z Małopolskiej Hodowli Roślin nie stwierdzono obecności genów *Lr19*. Obecność genu *Lr19* autorzy stwierdzili w 33 genotypach pochodzących z Hodowli Roślin Strzelce.

Identyfikacja markera *Xgdm87* w 2 polskich odmianach ma duże znaczenie praktyczne, ponieważ nadrzędnym celem, dla którego markery takie są opracowywane jest późniejsze ich wykorzystanie do selekcji korzystnych genotypów. Strategia selekcji wspomaganą markerami może być przydatna do zachowania alleli recesywnych podczas przeprowadzania krzyżowań wstecznych, do kumulacji w jednym genotypie kilku genów odporności na choroby (piramidyzacja genów), czy w doborze komponentów rodzicielskich do krzyżowań (Koebner i Summers 2002).

Wnioski / Conclusions

1. Marker *Xgdm87* został zidentyfikowany w polskich odmianach pszenicy ozimej Arkadia oraz Astoria.
2. Włączenie genów *Lr50* do polskich odmian posiadających inne geny odporności na rdzę brunatną może znacząco wpłynąć na ich zdrowotność.

Literatura / References

- Błaszczak L., Chełkowski J. 2010. Geny odporności na patogeny w genomie pszenicy. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo* 3: 15–22.
- Bolton M.D., Kolmer J.A., Garvin D.F. 2008. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology* 9 (5): 563–575.
- Brown-Guedira G.L., Singh S., Fritz A.K. 2003. Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum*. *Phytopathology* 93 (7): 784–789.
- Centralny Ośrodek Badania Odmian roślin Uprawnych [online]. Słupia Wielka. www.coboru.pl [dostęp: 04.03.2015].
- Chełkowski J., Stępień Ł. 2001. Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. *Journal of Applied Genetics* 42 (2): 117–126.
- Czembor P.Cz., Pietrusińska A. 2005. Zastosowanie selekcji wspomaganą markerami molekularnymi do wprowadzenia genu *Lr50* odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) do pszenicy. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 236: 41–48.
- Dzhenin S.V., Lapochkina I.F., Zhemchuzhina A.I., Kovalenko E.D. 2009. Donors of spring common wheat resistance to leaf rust and powdery mildew with genetic material of the species *Aegilops speltoides* L., *Aegilops triuncialis* L., and *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. *Russian Agricultural Sciences* 35 (5): 293–297.
- Hanif Z., Swati Z.A., Khan I., Hassan G., Marwat K.B., Ali S., Khan M.I. 2008. RAPD and SSR analysis of wild oats (*Avena species*) from North West frontier Province of Pakistan. *African Journal of Plant Science* 2 (11): 133–139.
- Khan M.H., Bukhari A., Dar Z.A., Rizvi S.M. 2013. Status and strategies in breeding for rust resistance in wheat. *Agricultural Sciences* 4 (6): 292–301.
- Koebner R., Summers R. 2002. The impact of molecular markers on the wheat breeding paradigm. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 695–702.
- Kolmer J.A., Jin Y., Long D.L. 2007. Wheat leaf and stem rust in the United States. *Australian Journal of Agricultural Research* 58: 631–638.
- Leonova I.N., Budashkina E.B., Kalinina N.P., Röder M.S., Börner A., Salina E.A. 2011. *Triticum aestivum* – *Triticum timopheevii* introgression lines as a source of pathogen resistance genes. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 47: 49–55.
- Lind V., Gulyaeva E. 2007. Virulence frequencies of *Puccinia triticina* in Germany and the European regions of Russian Federation. *Journal of Phytopathology* 155 (1): 13–21.
- Marker Assisted Selection in Wheat [online]. Department of Plant Sciences. University of California, Davis. www.maswheat.ucdavis.edu [Accessed: 02.03.2015].
- McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C.F., Appels R., Anderson O.D. 2005. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2005. Supplement: 1–56.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. 2012. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2012. Supplement: 1–27.
- Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T.G., Yano M., Bhatia C.R., Sasaki T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87–103.
- Nelson R.R. 1978. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 16: 359–378.
- Okoń S., Matysik P., Nita Z., Bichoński A., Rubrycki K., Woźna-Pawlak U., Kowalczyk K. 2012. Identyfikacja genu *Lr19* odporności na rdzę brunatną w polskich liniach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska* 67 (3): 39–43.
- Pietrusińska A. 2010. Wykorzystanie markerów molekularnych do wprowadzania genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) i mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) do pszenicy ozimej. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 256: 31–54.
- Tyrka M., Chełkowski J. 2004. Enhancing the resistance of triticale by using genes from wheat and rye. *Journal of Applied Genetics* 45 (3): 283–295.
- Winzeler M., Mesterhazy A., Park R.F., Bartos P., Csösz M., Goyeau H., Ittu M., Jones E., Löschenberger F., Manninger K., Pasquini M., Richter K., Rubiales D., Schachermayr G., Strzembicka A., Trotter M., Unger O., Vida G., Walther U. 2000. Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. *Agronomie* 20 (7): 783–792.
- Zamorski Cz., Nowicki B., Wakuliński W., Schollenberger M. 2001. Źródła odporności na rdzę żółtą, rdzę brunatną i rdzę żdźbłową w polskich materiałach hodowlanych pszenicy. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 218/219: 137–145.
- Zeb B., Khan I.A., Ali S., Bacha S., Mumtaz S., Swati Z.A. 2009. Study on genetic diversity in Pakistani wheat varieties using simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 8 (17): 4016–4019.