

Przygotowanie populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ dla analizy regionów QTL sprzężonych z wybranymi cechami użytkowymi gatunku *Fragaria*.

Preparation of the mapping population derived from the cross of ‘Elsanta’ and ‘Senga Sengana’ subtle for analysis of QTL regions linked to selected *Fragaria* traits.

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz¹✉, Agnieszka Masny¹, Bogusława Idczak¹, Krystyna Strączyńska¹, Abdelrahmen Mostafa Abdelwahab Mohamed²

¹ Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,

² Minia University, Faculty of Agriculture, 61517 Elminia, Egypt,

✉ e-mail: sylwia.keller@inhort.pl

Celem przeprowadzonych badań było przygotowanie populacji mapującej uzyskanej w wyniku skrzyżowania odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’, przydatnej do badań genotypowo-fenotypowych, poprzedzonych sporządzeniem ‘szkieletu’ mapy genetycznej.

Pierwszym etapem badań była ocena molekularna roślin form rodzicielskich pod kątem stopnia polimorfizmu genetycznego. Na podstawie analizy wytypowanych 450 markerów SSR w genomie odmiany ‘Elsanta’ zidentyfikowano łącznie 418 alleli polimorficznych, natomiast w genomie odmiany ‘Senga Sengana’ – 337 alleli. Przeprowadzone badania potwierdzają wysoki stopień heterozygotyczności genomów obu wytypowanych do badań odmian.

Kolejnym etapem prac była analiza molekularna siewek uzyskanych w wyniku krzyżowania obu heterozygotycznych form rodzicielskich oraz ocena statusu genetycznego genotypów potomnych. Badania te potwierdziły, że w obrębie roślin populacji mapującej ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ występują genotypy pochodzące tylko z kontrolowanego zapylenia. Ponadto, analiza segregacji, w populacji mapującej, alleli heterozygotycznych, zidentyfikowanych w genomach form rodzicielskich, umożliwiła sporządzenie szkieletu zintegrowanej mapy obu badanych genomów truskawki. Wstępna mapa genetyczna, do sporządzenia której zastosowano wybranych 44 polimorficznych markerów SSR, zawiera łącznie 27 grup sprzężeń, na których zidentyfikowano loci 53 alleli polimorficznych, pokrywających 1 033 cM genomu truskawki.

W wyniku przeprowadzonych testów potwierdzono, że uzyskana populacja stanowi wartościowy materiał do badań związanych z opracowaniem mapy genetycznej truskawki. Ponadto, sporządzony ‘szkielet’ mapy ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’ poszerza bazę do dalszej lokalizacji genów i identyfikacji regionów QTL sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki.

Słowa kluczowe: allele heterozygotyczne, genom *Fragaria*, mapa genetyczna, SSR

The aim of the study was to generate a mapping population derived from an ‘Elsanta’ and ‘Senga Sengana’ cross, so as to be useful for genotypic-phenotypic studies, and subsequently, to construct a ‘skeleton’ of the strawberry genetic map.

The first stage of the research was based on molecular assessment of parental plants for genetic polymorphism. After analysis of 450 selected SSR markers, 418 polymorphic alleles were identified in the genome of the ‘Elsanta’, and 337 alleles in the genome of the ‘Senga Sengana’. The study confirms the high degree of genetic heterozygosity of both of the strawberry varieties.

In the next stage of the work, molecular analysis of seedlings resulted from the cross of the heterozygous parental forms, as well as the confirmation of genetic status of hybrid genotypes were conducted. These studies confirm that the origin of the prepared mapping population was the result of the controlled pollination. Moreover, segregation of heterozygous alleles in the mapping population enabled the preparation of the ‘skeleton’ of an integrated map of ‘Elsanta’ x ‘Senga Sengana’. Herein, the initial genetic map was found to contain 27 linkage groups representing the loci of 53 polymorphic allele, covering 1 033 cM of the strawberry genome.

Generally, as a result of the tests, we confirmed that the obtained population represents valuable material for research related to the development of a strawberry genetic map. Additionally, the ‘skeleton’ of ‘Elsanta’ x ‘Senga Sengana’ genetic map enlarged the database for further gene localization and for identifying QTL regions linked to important strawberry traits.

Key words: *Fragaria* genome, genetic map, heterozygous alleles, SSR

Wstęp

Truskawka (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne ex Rozier) jest ważnym gatunkiem uprawianym niemal we wszystkich szerokościach geograficznych. Na świecie produkuje się rocznie około 9 mln ton owoców truskawek, w tym połowę w państwach europejskich (FAOStat, 2019).

Hodowla twórcza gatunku *F.* × *ananassa*, ukierunkowana jest na wytwarzanie odmian, o najkorzystniejszym zestawie cech fenotypowych, przystosowanych do zróżnicowanych warunków uprawy (takich jak: zasolenie), różnych warunków agroklimatycznych (tj. mróz, susza), zróżnicowanej presji czynników biotycznych (np: choroby grzybowe tj. wertycylioza, antraknoza) i abiotycznych, jak również do zróżnicowanych preferencji konsumentów (jędrność i trwałość owoców, zawartość kwasu askorbinowego czy cukrów) (Darrow, 1966; Hancock, 2008).

Badania genetyczne, wspierające światową hodowlę tego gatunku, pozwoliły na zidentyfikowanie molekularnych markerów m.in. cech związanych z jakością owoców, zakwitaniem czy odpornością na patogeny. Dla wielu z nich, zidentyfikowano także loci/miejsce na fragmentarycznych mapach genetycznych różnych genomów tego gatunku (Denoyes-Rothan i in. 2004; 2005, Sargent i in. 2011, Sargen i in. 2012).

Na podstawie doświadczeń genetyczno-hodowlanych stwierdzono zarówno monogeniczny (odporność na fytoftorozę i alternariozę), jak i poligeniczny charakter dziedziczenia cech użytkowych truskawki (Lerceteau-Kohler i in., 2002). W wyniku addytywnego (poligenowego) współdziałania genów ma miejsce kumulacja ich alleli w genomie, a każdy genotyp wykazuje inną charakterystykę fenotypową, zależnie od własnego potencjału genetycznego (Semagn i in., 2006; Hancock i in. 2008). Ma to szczególne znaczenie podczas prowadzenia badań, których celem jest sporządzanie map różnych genomów. Wówczas warunkiem przystąpienia do takich prac jest uzyskanie odpowiedniej puli roślin potomnych tzw. populacji mapującej, (przyjmuje się min. 100 – 150 genotypów mieszańcowych), w obrębie której wszystkie genotypy pochodzą z zaplanowanego krzyżowania, a formy rodzicielskie reprezentują wysoki stopień heterozygotyczność (Liebhard i Gessler 2000). Podejście takie daje pewność prawidłowej analizy segregacji zidentyfikowanych alleli markerów molekularnych, przydatnych do wysycaania map genetycznych. Właściwy dobór i przygotowanie materiału roślinnego są zatem kluczowymi etapami w badaniach nad identyfikacją regionów genomu warunkujących

ważne cechy użytkowe gatunku *Fragaria*.

Celem prowadzonych badań było przygotowanie populacji mapującej, przydatnej do utworzenia ‘szkieletu’ mapy genomu i identyfikacji regionów genomowych (QTL) sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki takimi jak: odporność na choroby wywołane grzybami (*V. dahliae*, *Colletotrichum acutatum*, *Phytophthora cactorum*); jakość owoców (zawartość substancji prozdrowotnych); odporność na czynniki abiotyczne tj; tolerancja na niskie temperatury czy deficyt wody) .

Materiały i Metody

Materiał do badań stanowiły rośliny mieszańcowe, uzyskane w wyniku krzyżowania roślin rodzicielskich odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ (*CP* – *cross polination*). Wybrane formy rodzicielskie skrajnie różnią się pod względem wielu cech, w tym podatności na czynniki biotyczne i abiotyczne oraz jakością owoców (Van Ooijen 2002, Masny i in. 2002).

Przygotowanie materiału roślinnego

Nasiona, uzyskane w programie krzyżowań (2014), po wysuszeniu i stratyfikacji wysiewano do doniczek wypełnionych mieszaniną substratu torfowego i piasku w stosunku 3:1. Pozyskane tym sposobem młode siewki potomne (200 roślin), stanowiące populację mapującą, w fazie minimum dwóch liści przesadzono do tac wielodoniczekowych (54 komórki o wymiarach 55 × 55 × 62 mm i objętości 90 cm³). Rośliny utrzymywano w szklarni. Następnie uzyskane młode siewki wysadzono w kwaterze polowej. Systematycznie prowadzono prace uprawowo-pielęgnacyjne, jak nawadnianie i nawożenie uzyskanych roślin, spulchnianie podłoża oraz zwalczanie chorób i szkodników (Program Ochrony Roślin, opryski na mączniaka; Signum 33 WG, przedziorka chmielowca; Nissorum Strong 250 SC oraz inne szkodniki i patogeny zagrażające uprawie), obejmujące zarówno formy rodzicielskie, jak i mieszańce F₁.

Dodatkowo, z roślin matecznych pobierano i wysadzano młode sadzonki rozłogowe celem utrzymania puli tych samych genotypów mieszańcowych, które następnie stanowiły materiał do doświadczeń fenotypowych.

Materiał do badań molekularnych

Izolacje genomowego DNA form rodzicielskich ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ oraz 200 roślin populacji mapującej przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Doyle i Doyle (1990). Tkankę liściową (0,2 g) ucierano w ciekłym azocie, zawieszano

w buforze ekstrakcyjnym CTAB i inkubowano w temp. 65 °C przez 30 minut. W celu dokładnego odseparowania fazy wodnej (zawierającej kwasy nukleinowe) zawieszinę rozdrobnionej tkanki mieszano z równoważną ilością roztworu chloroform/alkohol izoamylowy (24:1 v/v) i wirowano (15 000 g). Następnie uzyskane DNA wytrącano alkoholem izopropylowym (1:3 v/v), suszono w temperaturze pokojowej i rozpuszczono w buforze TE. Cząsteczki RNA wytrawiano stosując RNazę A (10 µg ml⁻¹, 37 °C/ 1 h). Czystość preparatów DNA oceniano na podstawie elektroforegramów w 0,9% żelu agarozowym oraz w oparciu o pomiar współczynników ekstynkcji próbki, przy długości fali 230, 260 i 280 nm (Gene Quant Pro Amersham Pharmacia Biotech). Koncentrację DNA w preparacie określano poprzez porównanie z DNA faga λ o znanych stężeniach (315, 157 i 79 ng µl⁻¹).

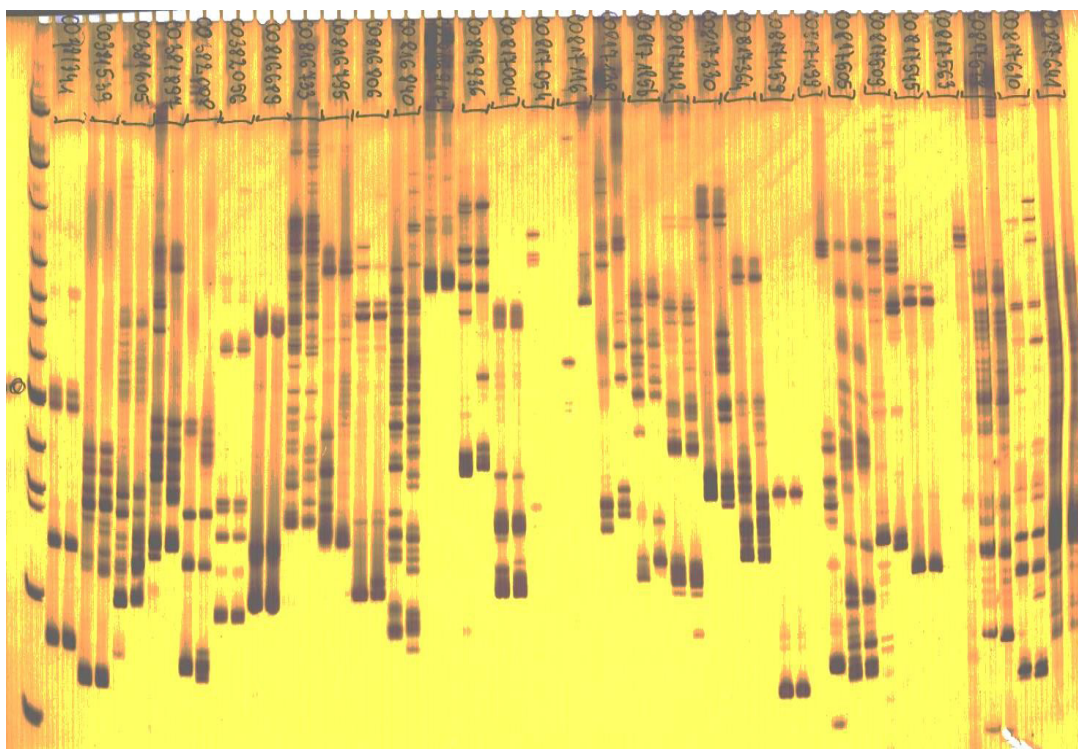
Amplifikacja alleli polimorficznych (SSR-PCR)

W oparciu o bazę sekwencyjną GDR (Genome Database for Rosaceae, www.rosaceae.org) dla rodzaju *Fragaria* oraz na podstawie dostępnych danych literaturowych, zsyntetyzowano i przetestowano w reakcjach PCR, 450 par starterów mikrosatelitar-nych.

Mieszanina reakcyjna (13 µl) zawierała 5 ng DNA – wyizolowane z odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana' oraz genotypów potomnych uzyskanych w wyniku ich krzyżowania, 0,325 U polimerazy (Ampli Taq, Applied Biosystems), 10 × PCR-bufor II z 1,5 mM MgCl₂, 1,25 mM dNTP (Applied Biosystems) i 0,35 µM starterów SSR. Reakcje Touch-down PCR prowadzone były w zoptymalizowanych warunkach termicznych: 94°C – 30 s, 55°C – 45 s, 72°C – 60 s/10 cykli, 94°C – 30 s, 50°C – 45 s, 72°C – 60 s/25 cykli. Wygenerowane amplikony rozdzielano w 7% żelach poliakrylamidowych, które następnie wizualizowano w świetle białym po wybarwieniu w 0,4% roztworze azotanu srebra.

Określenie położenia (loci) markerów

Badania przeprowadzono na matrycach DNA wydzielonych z form rodzicielskich oraz z 200 roślin należących do populacji 'Elsanta' × 'Senga Sengana' o potwierdzonym statusie mieszańca. Do sporządzenia szkieletu mapy genomów obu odmian wytypowano zestaw markerów dostępnych w bazie danych (www.rosaceae.org) oraz opisanych dla map genetycznych dzikich gatunków *F. nubicola*, *F. vesca* oraz odmian 'Redgauntlet' i 'Hapil'.



Rys. 1. Wzory prążkowe (reprezentują parę obu form rodzicielskich) przedstawiające wielkości alleli zidentyfikowanych dla 30 przykładowych markerów SSR, różnicujące genom odmiany 'Elsanta' (I ścieżka z pary) oraz 'Senga Sengana' (II ścieżka z pary).

Fig. 1. Band patterns (in pairs of both parental forms) representing the alleles identified for 30 SSR markers, differentiating the genome of 'Elsanta' (1st path from pair) and 'Senga Sengana' (2nd path from pair) cultivars.

Amplifikację specyficznych fragmentów DNA prowadzono zgodnie z w/w procedurą.

Do sporządzenia 'szkieletu' mapy genetycznej 'Elsanta' × 'Senga Sengana' użyto 44 markerów SSR (ARFL002, ARSFL022, EMFn017, BFACT004, EMFn214, ARSFL011, FvH4180, FvH4153, FvH4164, FvH4160, FvH4154, ARSFL100, UDF009, BFACT017, BFFv09-11-02, EMFv018, CO816733, EMFv007, EMF132, FvH4163, BFACT045, FvH4169, BFACT036, UDF001, FvH4161, FvH4155, FvH4177, FvH4165, FvH4173, CFVC0316, BFACT002, ARSFL015, EMFn213, CFACT111, ARSFL012, CFVC015, BFACT003, FvH4171, COBRA, CO817054, BEFv14-29, EMFn049, FvC103, EMFn021).

Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji touch-down PCR były takie same dla wszystkich par oligonukleotydów (temperatura annealingu w zakresie od 60°C do 55°C – 10 cykli, spadek temperatury 0,5°C na cykl), natomiast w przypadku markerów z grupy ARSFL, przez pierwsze 10 cykli temperatura malała o 0,5°C (z 55°C do 50°C). Ostatecznie końcowe przyłączenie oligonukleotydów prowadzono w stałej temperaturze 55 i 50°C.

Szkielet mapy skonstruowano przy użyciu oprogramowania JoinMap v.3.0 (Biometrics, Kyzama NL) (van Ooijen i Voorrips 2001). Typ segregacji alleli badanych markerów genetycznych w populacji mapującej weryfikowano testem χ^2 na podstawie

wartości odchylenia pomiędzy ich rozkładem teoretycznym (mendlowskim) i obserwowanym. Przynależność markerów do poszczególnych grup sprzężeń określano na podstawie wartości progu LOD (Logarytm Odd Ratio) >3.0. Odległości mapowe zostały oszacowane przy użyciu funkcji mapującej *Kosambi*. Uzyskane grupy sprzężeń przedstawiono w formie graficznej, za pomocą z programu MapChart 2.1.

Wyniki

Ocena stopnia heterozygotyczności genomów odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana'.

W testach PCR, przeprowadzonych na matrycy DNA roślin 'Elsanta' i 'Senga Sengana' z 450 parami starterów mikrosatelitarnych, produkty polimorficzne uzyskano dla 228 z nich (Tab. 1). Łącznie przeprowadzono 3 532 reakcje SSR-PCR.

Wyniki amplifikacji fragmentów genomów uzyskanych na matrycy DNA z roślin 'Elsanta' i 'Senga Sengana' z 30 przykładowymi starterami mikrosatelitarnymi przedstawiono na poniższym elektroforogramie (Rys. 1). Wielkości zidentyfikowanych alleli polimorficznych, różnicujących formy rodzicielskie, oraz sekwencje zastosowanych do reakcji PCR oligonukleotydów zestawiono w tabeli 1.

Liczbę alleli heterozygotycznych zidentyfikowanych w genomach obu form rodzicielskich przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1

Table 1

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
1	FvH4004	480, 600	300, 560	cccagatctccctacctttacc	agttctacccccctttcagacc
2	FvH4005	270, 275	-	tcaagttacgtcgcttaccatgg	ttgctgtttcaagaccactage
3	FvH4006	290, 350	270, 315	cgagtactccaccttcaattcg	atgagagatcttccgtcgtagg
4	FvH4009	480	450	ttggctgtccagittgaga	ccaaagggactggtgtaaa
5	FvH4014	150, 400	130, 300	tgacctcaatctcttgaacc	atccctactcaaaacctgacg
6	FvH4019	200	220, 600	catctcagttggatcagaatcg	caaggaaatcaaggatcataggg
7	FvH4022	-	200, 560, 565	agttctggaacgtcctttaggc	acacaagcacatacccaaaacc
8	FvH4023	595, 600	-	tactgggggcaatatgtttgg	gccccctgtaaaacttactg
9	FvH4025	260	-	gttcagttgagagccataatgc	gaatgatgaaaggcagctaagg
10	FvH4031	520	-	tctcacctcaatcaaatcttc	agtgggaatggttctttttgg
11	FvH4033	150, 190	110	ctccacaacctaataccaacg	gacgacgactcttcaaaacg

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
12	FvH4041	200, 250	220	cagctgcatctatttgatctgg	cgagctcaactctcttctaccc
13	FvH4042	280	-	aacaggagcttatacggaaatcg	aggagctcaatctcatcatcg
14	FvH4049	250, 260	-	acggctactctagggagatgg	ctctccacctttgcattagc
15	FvH4050	185, 200	210	tagcatccatagttccatacgc	caatacaatctcccaactcacc
16	FvH4052	170, 175	320	caagaggtcgttaggtgaaatg	gtgttcaagcccagaatgatg
17	FvH4056	-	450	gggggtattttgaagtgttaagc	gcgaaaaatatgagaggagagagg
18	FvH4057	200, 225, 280, 310	235, 240, 300, 380	agtttgaccgggtcaagagg	agctctctccctcacaacg
19	FvH4058	220	-	gttagagaagcagtgatgacg	gggcatctacacatgttgacc
20	FvH4059	450	-	tgcacatagagcaacagtataggg	ttgttagcatgaagtgcacaagc
21	FvH4061	-	200	accaactccatactccacaagc	gcctccctctctagctcttcc
22	FvH4082	-	495	cggtttacctaactccaactgc	cctgcaagaaatctctactgtcg
23	FvH4083	360, 600	300, 470	aattgggggtgtgacaatgc	gcttcaaatgtgggatctgg
24	FvH4086	-	600	acacccaagcaaatcagc	tgctatttaggcaactcttcc
25	FvH4088	-	400, 450	cctcagcttaacgaacgaacc	tagagagagcaccgactcaagg
26	FvH4090	320	330	cagttgatgtgtgctgagtc	agttttgttttcatcttttgg
27	FvH4091	220, 300, 400	200	tcaccggttcctctttatagc	taatttctgcaggacgttcg
28	FvH4102	600	610	tttcttttggtgaaaactcc	tcataaggagctttattcatacc
29	FvH4104	240, 250	510	agactgctcatcctctcttgc	atcatgggagagaacattaggg
30	FvH4105	-	320, 330	cgttgagatctggtaaaactcc	taacctcccctgtgaaatcc
31	FvH4106	155, 215	220	tacaaggactgcctcttagg	tcactttgctgectacatcc
32	FvH4112	265, 320, 330	210, 460	tttcaaaaattaaaggcaaacg	gccatagaaaaccagaaaaacc
33	FvH4113	125	110	tgactagcaaatagtcacaacgc	cggcagagaaccagtaagc
34	FvH4114	200, 380, 400	-	gcagcatgagagacaagatgc	gttagcagaagggaatgaacc
35	FvH4116	290, 405	380	ggacattgaccaagcatttacg	tacggctcaggagatgagacc
36	FvH4117	295, 305	300	actttgcttgctagtgtcgc	gagggttctggagttaagtgc
37	FvH4121	400	-	tacacagtgacatagccgatgc	gtcctaggttctcctgttctcc
38	FvH4123	240	245	gftgaagcaacttgaatgc	ggaggacaactccaattatgg
39	FvH4124	240, 285	385	gcacagttccatcagttttca	acaattgatcccttgaaattg
40	FvH4127	180, 200, 385	170, 195, 485	accaccacaactagtctctgc	tcctaaagtttctcctcatcc
41	FvH4131	135	-	cagactcagcagatgatttg	ctaattggccgtatcttctcc
42	FvH4134	100	-	aagtgaaggagggaagaagg	gcttcataaacgccactgc
43	FvH4136	190, 580, 600	-	ttcctgatcaagctaggaatgc	ccttggtgactctcaaacctgc
44	FvH4145	205, 280, 410	300, 420	aaagtcttggggagtaaaagg	ggtacatggtgatgtgcatcc
45	ChFaM 149	-	165, 595, 600	ccctctcccgtaaaagtcca	cggactaccggtcactaga
46	ChFaM 262	400	-	actcggtaggaaagacgaa	agagaagaccgctgaggatg
47	ChFvM 232	320	330	gcttctgggacgcaacac	tgaacctgcaattctctctg
48	ChFvM 243	330	340	tcctttctcgtcactgtca	aaacaaaggaaaggctggtg
49	ChFvM 245	-	510	tcaaccacaccgctactcct	ctgtcctgactcctctgt
50	ChFaM 009	410	-	tccaagttccagagctcctt	cgctgagctcagacatgaaa
51	ChFaM 010	200, 580	210	tatgcctgcaattcatctg	gctgctctgtgagtgagt
52	ChFaM 011	95, 300, 360	80, 90, 210, 270	tcctctcctctttcccttca	cgagatctcccagactgag
53	ChFaM 017	80, 90, 160, 250, 295	415	ctcactctctcgcaacttgc	caactcaccttgaccgatt

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
54	ChFaM 022	185, 200, 495	-	gggcactcctactcttca	ttggccttgagagcttcgat
55	ChFaM 026	100	-	tcgtctctcgtttctctaaaagc	atcaagtctcgtccacgta
56	ChFaM 030	300, 335	-	ccatgaagcagtgaaagcca	agaaaatcccagagaccttt
57	ChFaM 031	300, 310	200, 210	gctagcaaaagccctaagcaa	acgggtgggcacactaaaga
58	ChFaM 032	-	410	ggctcctgcttcttctttt	ttcagccccatttccagta
59	ChFaM 033	110, 505	115, 510	cacaaatccacacacagcag	cccaggaaggttaaccacaaa
60	ChFaM 036	130	135	gcagcctcaagaagtgaagg	ccatcttgatatcacagggcataa
61	ChFaM 037	505	-	acgacgatcaccacaaggac	aagctccgctgttctctt
62	ChFaM 040	-	205, 300	agtggatcagcaccatca	taaccgggaacggctactctg
63	ChFaM 041	185	180, 280, 490	ccacacgaaggagaaggaga	aacgtgtcattcgaccacaa
64	ChFaM 044	170, 615	165, 310, 410, 595	cgctgagctgttctaatcca	ttttgttgacgagcgagatg
65	ChFaM 046	195, 300, 310	-	ccatttccatggcctgttt	ggccttgttgggtctgagag
66	ChFaM 047	235	200, 215, 240, 260	tcatttctctcccctcgat	gatgtgattacggcgaagg
67	ChFaM 056	195, 260	265, 510, 600	aaaacgtcgtctcaggat	cgactcgtgtgtctgtgt
68	ChFaM 058	140, 195, 205, 210, 300, 420, 500	550, 560, 580	gaccnaaacacaccctgaac	ctccccattctgggaaatct
69	ChFaM 060	165, 550, 560, 580	280, 590, 610	tgagctaccaccaagaacc	aatacccttggtagccctcg
70	ChFaM 063	120, 300	125, 195	gacgtctccgatcgttgat	ctggctcgcgtacgacttc
71	ChFaM 064	285	190, 280	caccaactcgcacaacctca	gactcttcttggcagctg
72	ChFaM 065	220, 245, 250, 265	200, 250	gaccgggagagataacagca	atagaagccaatgcgtgatg
73	ChFaM 066	110, 590	115, 280, 310, 580	attttggccacgaagaattg	cgatgtcaggaacgaactga
74	ChFaM 068	420	200, 425	catctccagttccttggtc	acgaccattctcttctca
75	ChFaM 070	280, 630	-	agcattgaattcccattttg	ccttcagcaggaactaagg
76	ChFaM 072	385	-	tggcagaaattccaaaagg	ctccccagaagtccagatt
77	ChFaM 077	250, 320, 400, 440	270, 300, 395, 410	gaaagggctggacatggata	atgttatttggcctgct
78	ChFaM 078	245, 285, 290, 300, 315, 390, 410	235	cagcctcattgcaaatctga	cttaccggttcgtatgtgt
79	ChFaM 080	530, 560	160, 540	ttcggtcccgtaaagatac	aagttccaccacatgcaat
80	ChFaM 081	-	295, 300, 310, 340, 415	aactgagctctcggcaagtc	gaatactcgggaggaagtg
81	ChFaM 082	230, 235	220, 245	agtacggcaattgaagctcg	gatctcggttgaagatcgga
82	ChFaM 083	220, 250	-	tttctggcttttgattgg	gcacttttcatcacaggca
83	ChFaM 086	280	225	ttggagctcaatccatctg	attggccagcctccgtct
84	ChFaM 088	660	140	ggtggcnaaactcatggaga	gggaagcgaagttgaagagg
85	ChFaM 092	110	-	acccaagtccctcgcactc	atgcgcttgcataacaggt
86	ChFaM 093	285, 290, 300, 390, 395	-	cgccctcaaatccctctaac	gaagtgaggttccgctgct
87	ChFaM 094	180	175, 185	atggaggcgcctactgaaaa	aatggcagcttgacttcc
88	ChFaM 095	210	-	gccagaagcaaaaaccagaa	gggaagttgaaattgtcgga
89	ChFaM 097	275, 325, 250, 400, 450, 470	265	gccaaaagttggttcttga	gccattttggaagaggtgaa
90	ChFaM 098	305, 495, 520	205, 215	gtgagagtcagcccacccta	gagcagaggtatgaagaagag
91	ChFaM 100	100, 170	120, 190	ttggaaccagaaaatcgaa	cagcggagagagaacaagg
92	ChFaM 101	150, 500	220, 240, 520	ggagtaagctgatcactctgt	actccgagcgtgtaacct

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
93	ChFaM 105	170, 180	160, 175	cctcaaacacacatccacca	tctgaggtttatgcccggact
94	ChFaM 106	170, 190, 230, 335	120, 410	accaaccgagggcgagagag	cgctcatctgcacgtccttc
95	ChFaM 107	-	500	tgccaaacaacaaatgttga	catatcgatgctctcataggg
96	ChFaM 108	520	170	catggaaagagagcgaagc	cgaggaatgagggaggaatc
97	ChFaM 109	-	420, 450	aagctgcttgccaagaacaa	ggctgatgccagtcattta
98	ChFaM 110	310, 605, 615	-	tttctttggtggttttgg	ccagagaagccatttaggc
99	ChFaM 111	145, 180	135	gccaaccgagctctctct	cgggtctcaatttctcaat
100	ChFaM 112	495	485	ttcaagctttctctctctc	catcttccactgaccctct
101	ChFaM 114	-	145, 275, 495	tggtgcttctgttttaca	cgctctctctctctaatcc
102	ChFaM 115	460, 480	280, 285	cctcggcttctcatctttg	accacactgacaggacgatg
103	ChFaM 120	130, 200, 210, 420	255, 300, 320, 330	ggtttcatcagagggcgtct	taaagctcccagcaggcatt
104	ChFaM 122	245, 255, 260	-	gactcagctctctcccagtg	tgatattgagcaaccgggtga
105	ChFaM 126	270	-	gttagggagtcgggaatga	ttccaatccatctgacgac
106	ChFaM 129	195	-	agatcaacatcgccccaac	tgctcgttgccataacctg
107	ChFaM 130	240, 260, 300	195, 310	gccagtcacaagaagccaaa	tgctctgaaaccccttatctg
108	ChFaM 144	390,	-	cagctctggtctctctctc	cggagcagattttctggag
109	ChFaM 146	170	150, 155	acgagggagaatggagcac	agatggtcctgactggatgg
110	ChFaM 147	350, 360	-	acgaggggtcacctgagactg	ccaggagaaggtaccgaagg
111	ChFaM 148	-	210	cctccatcaaaagccagtt	cattagaccccagctgtca
112	ChFaM 151	200	-	accaccaccgtttctctc	accaccagctgctctctt
113	ChFaM 159	285	-	tctctctatcgccccagag	accatccacagggttcttg
114	ChFaM 160	-	300, 480	ccactcccaaaagagcaca	ctgcctccacaactcacc
115	ChFaM 161	210, 510, 615	270	cgaggcctgtctctttgt	gaggaggtagctgtgtgac
116	ChFaM 163	150, 265	155	ttcgggtctgtattgctttga	ttcaatccgaaggcacaac
117	ChFaM 164	235	200	cactcagccagatccagagc	gcgcaaggatggtcttaat
118	ChFaM 174	140, 175	160, 195	gagggagatggcacggagat	ctccggcattgaaatcgaga
119	ChFaM 177	245, 265, 400	-	cctgcagagtccaagagaga	cactcacaaggcatgagagcta
120	ChFaM 178	165, 280, 325	320	aaacgaagaaggaagtctcaa	agctgtcaggggtttatgt
121	ChFaM 194	-	175, 195	ccctcctgccagtcattt	ccatcccaagctgtctc
122	ChFaM 196	-	305	cctctcactcttctctctaaa	agcgcatgagctgctgtta
123	ChFaM 203	480	-	cgaggggtcaggtactaaa	tgatgatgaccaatccgaaaga
124	ChFaM 209	-	295	ccccaaaacctctattct	atcattcccaagccactgtc
125	ChFvM 028	168, 505	170, 507	aatggcatcaactctgcac	cagcctgctgctgtattct
126	ChFvM 049	-	500, 505	atggttggtgatcaatggtg	ttcatatgcaattgatggaac
127	ChFvM 087	280, 295	300	gaaaggggaagcctttcat	tggagcaaaagtcccaata
128	ChFvM 125	-	150, 520	ggactgccatcgtaaccta	tctcaatgtttgccaaag
129	ChFvM 140	-	185	ccactccataaccactgga	cgctgtaggtcgtctctg
130	ChFvM 181	175	155, 165	ggagaactgctttgtaggg	acgtacaccagcagatgagc
131	ChFvM 182	400, 435, 515	470	ggaaccaaacgaaccaaac	gcggaggagtgagtgaagac
132	ChFvM 184	255	235, 240, 340, 350, 600	gcactttgggttttgggta	ttgcaagaacccccctcta
133	ChFvM 191	245, 535	255, 285, 300, 350	ccagcagaatcctcaaatgc	gtgccaacaagccattg
134	ChFvM 192	-	265, 275, 450	tgaggctcagctgtgagaattg	ttccgagagtgagagcat

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
135	ChFvM 193	-	140	catcagaacctcaatcatcg	tactgccggagaatgaaca
136	ChFvM 201	-	245, 285, 325, 335	tgattcaactccagcgaagc	atcagcagcgaatccttct
137	ChFvM 202	225, 235	-	caaagggctccagctatctc	aggatctcagctaagaagca
138	ChFvM 205	220	125, 185	gcgaaacctatggattgtt	acaaccacaaattcccatt
139	ChFvM 210	-	185, 265, 540	tcccacattttccttgtt	gtggtgttggtgagtgaga
140	ChFvM 212	150, 170, 190	195	caaatcttcaacggctctcc	acggaggaggagggaagtcat
141	ChFvM 213	195, 245, 330, 350, 450	280	aacctaggaggctgaaacc	atacccccgggtggtactgt
142	AW06432	250, 270, 280, 500, 570	-	tgagctgaagaaggtgctga	aagggaactggaggtagcaa
143	CO378933	150, 500	-	cgaggctgtctctgtgtg	cacgacctgacaccttct
144	CO379009	105	-	tgtgattgggagagaggagg	ctgccccaaactggtttta
145	CO379012	-	145	cacgaggattgttgaacc	accaacacacaagctctg
146	CO379659	250, 400	140, 200	aggggagcctcacttagag	tatcatgatagatccagcct
147	CO380151	-	150	cgagggtttgatcgagctg	aacatgatcacaaggccaca
148	CO381174	275	445, 455	ccacaagaaaggagacgagc	tcaggagcatgaatcaatcg
149	CO381539	272	270, 265	gtctgcccctgttacgctac	ctgtgtagctccggcacata
150	CO381605	-	300	ccaccctttacctttcaca	caattccgaaggcacaactt
151	CO381897	230	-	agaggctgaggatcatggtg	ggcaaatcaatgctaacca
152	CO382008	-	125, 145, 385	gcccttgcttagtctgtt	atgcatgctatgctgtgt
153	CO816733	275, 300, 400, 480, 570	310, 350	tcccacacctcactgtcc	attcagccaggtctgagcat
154	CO816806	-	205	cgaggggagaaaccttaact	ggacgatccctgtagtga
155	CO816840	270, 340	150, 215, 295, 305	cagccttgatgtctcgttga	ccatgacatcctctgcttt
156	CO816936	300	380, 520	ttctctcgatcttctccga	catcgactgcttctcttc
157	CO817004	220, 240	225	cgtcagccctaagaagatgg	acgaccaatacagaccagg
158	CO817138	250	285, 500, 590	tgaactttgtctctgggc	tcaggcatgaacactctg
159	CO817185B	195, 400, 510, 565	260, 500	tcactcactgggaagaaagg	catcaatcatcacacacga
160	CO817242	-	150, 520, 525	aatccccaaactcctcaaac	ctccagctcttctgttcc
161	CO817330	-	270, 405, 430, 505, 510, 550	gctcatggcttctgttct	gtggcattcagttgggctat
162	CO817364	285, 295	260	gccttccccttctcaaatc	gtccatttccagttggtct
163	CO817505	120, 280	-	tcctgaagcaacgatgactg	cacttgcgcagaaagaaa
164	CO817509	130, 140, 195	215	tcaccgtctccttctcaac	cgaagaggaaattgagccag
165	CO817772	-	500	tcacaaccgacgagttcag	tttctcactgcctgctct
166	CO817850	-	300	gtgttgagcaagaatgggt	tagtgccagaatgaggctt
167	CO817919	270, 280	-	cagaatccaccgcttcat	cgctagctttctgctgat
168	CO818131	250, 315	295	ccttctccgaaacctact	gggctcaggttatacagca
169	CX661091	180	235	aagccatgactacctccag	atgaagccgaaatcgaatg
170	CX661274	-	215	tataacaacgttgggcccctc	tacgccagctcataccacag
171	CX661428B	295, 330	-	gaagacggtggatgaggtgt	ctgctgaaaccgaaatccta
172	CX661749	-	500	tagatttttccattcccc	atctgaccaacaaaacca
173	CX661752	-	165, 175	acctgacctgaccaaacag	tggggatgaggtgagagtc
174	CX661843	245, 515	-	ctccatagatgcctcgaac	ttgaacagcgagaagtgtg

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
175	CX661893	-	190, 610	cgggtcttctactctcgtcg	gccc aaagacagcctagat
176	CX661895A	100	-	gtagccatggaatcgtccac	actgcgagcaagtgtcttga
177	CX662065	170, 495	-	acagagagccagaaacggaa	agcgagagagagcgaatg
178	CX662065A	-	190, 235, 360, 500	atgaccacagcaacctctcc	gcgtgtttgggattgagact
179	CX662153	115, 120, 175	130	gaaactccccgaatttacg	tctcgggtgagctgagaat
180	CX662162	290, 505	-	tcaccacatgaaaagtgcc	atagaaagagcggcagaaa
181	CX662184	155	145, 160	acgctcttcttactccca	gagagagatgtcggagagg
182	CX662207	265, 285, 290	310	agcagccggcagatgatag	atcacggtcaaagccaactc
183	CX662235	220, 255, 340, 345	-	cctcttccccacactcaa	gtagcttctccgaactgtgg
184	FvA 108	150	-	acaagagaccaccaactacc	gatagccaaaagagcagtgga
185	FvA 110	185, 245	255, 265	caacttctctagcatcaactc	actcgatctgaaatcgtgtct
186	FvA 114	120, 270, 315	150, 295	attggctaatgaaatctccg	ggcaagggaatggataata
187	FvA 115	98, 370, 450	100, 445	acaagttcgcagggtatga	gggaaaacacagaaatctcc
188	FvA 117	110, 295	-	ccattttacattgtcacaacg	gttagggtttcatgtggactc
189	FvA 119	280, 400	120, 150, 265	gcccttgatgacagaaaag	cccttctgttgagataatg
190	FvA 123	-	310	gcaatgttcttactgaaatgtg	agcatctcttctgtctctc
191	FvA 125	420	-	atccaagggctaagagagg	cagaataaccaccaagtcc
192	FvA 127	95, 215	195	tctccctcatccaatcaac	accggagtgaaccctaatc
193	FvA 129	145	-	gaaaggagtctgtttgtgtcc	actgggtctcatcacgc
194	FvA 2	250, 270	252, 262	gttccatcacttacagacatcc	cctgattatgtgccttattc
195	FvA 5	120	85, 135	aaggagagagaagagaaaagtg	acaacatctcggctcattaac
196	FvA 7	-	550	cagtgaagactccgcactag	gcatatcgtcattatgtgc
197	FvA 9	570, 580	610	gaggtgctcctgtgaaatg	aacctcaaccagtttgg
198	FvB 1	290, 315, 450, 480	620	agagcagaagaaaaccatagc	cctccctggaaatagatacac
199	FvB 101	175, 195, 480, 485	120	tcaagtctcgacaaaataact	cgttgcactccattagagg
200	FvB 108	300, 455, 495	130, 215	ggttgacatgagtgcatattc	gaaggatagagggtgcaaatg
201	FvB 110	215, 225	-	ctaccgcaccataattagaag	catccaaatgaacctattcaag
202	FvB 111	270, 275, 280, 520	190, 195	ttaggttttgcgaagtgaag	aggagaaccgcgctagtgc
203	FvB 112	165, 195, 205, 285, 600	290, 335, 250	ggcaacgaagagtaaggc	caaccataataccctcatttc
204	FvB 113	-	230	tgaccagaatgaaagaagg	agaagaacctgctgcttgag
205	FvB 116	200	215, 225	cctccatccctaactttcc	gctctttgtctctcgcage
206	FvB 119	330, 385	380, 390	accattgccatccctact	ccacctgaacaaccaccac
207	FvB 120	220, 240	-	ataccctcatctctgtctctg	gattcttcatgtatcgtctga
208	FvB 123	-	360, 370, 390	gaaacacttttccctgtg	ggtttactgggggtcag
209	FvB 124	190, 220, 250, 260	205, 240	agacaacaagcagcaatagtg	agaaggggaagtgcctaagtg
210	FvB 126	125	110, 180	gagcatcggcactacacc	catggctggtctcagatc
211	FvB 127	420, 500	265, 270	ttcaaggcaaatccactatc	gcatcggaaagcatcaagt
212	FvB 129	510, 550	-	gcgatgaaacagtagcagc	gaagaaggggggaagaatc
213	FvB 132	220, 250	260	aaggctccccctgttttag	gaacctgttaggtgtgtagaaa
214	FvB 2	230, 340, 350	600	ttgaggcacttgaaaaaagac	aaggaggtggaaggtg
215	FvB 8	280, 300, 400, 420	275, 290, 320, 410	ggtgagtggtattgcctaac	cttcattacgggtgagctcg

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating ‘Elsanta’ and ‘Senga Sengana’ genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
216	FvC 10	295, 350, 380	255, 285, 300, 460	ctccatgctgatcctcttattc	gccaatccgattattcttgag
217	FvC 103	200, 215, 250, 395	-	tctccaactccaactcttc	cgaatctatgtcccctatcg
218	FvC 105	270, 350	-	gggtggtcaagtctccag	actccgattactgttttccag
219	FvC 107	205, 480	180	ggcaattacatgatgaaccag	gaatggagctcttgagaactc
220	FvC 108	275	345, 255, 495	tcccgtgaacagtgtcag	agcaaaagaggtagagaacgag
221	FvC 109	165, 210, 520, 590	260	agggcgagacttgaatatg	aagccttacctggaattacc
222	FvC 110	420	450	ctgtttctctcagattgttc	gtcattgtaactgctgtgtg
223	FvC 111	215, 260, 270, 290, 340, 415	200, 240, 315, 400	ccattctcgtcccctaac	caaaaactgtactgcctcaaa
224	FvC 112	145, 160, 170	147, 150, 280	ggtagcaattgtggaattg	cggcctgattgtattatctg
225	FvC 113	220, 250, 260, 270	180	ccctcctctcttctcttcc	ggcagacagatccgaga
226	FvC 12	-	190, 250	ggaggacagcgtagagatatg	gggtccatttctgtttaaacaac
227	FvC 122	320, 385	300	tcttcataccatacccaactac	ccagacacccatetaattctac
228	FvC 123	170	140, 250	gaccacaaaccactaatc	caaacaccgagactctgag

Tabela 2

Table 2

Liczba produktów SSR-PCR różnicujących genomy odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’.

Number of SSR-PCR products differentiating ‘Elsanta’ and ‘Senga Sengana’ genomes.

Grupa starterów Group of teste markers	liczba par starterów testowanych z danej grupy Number of primer pairs tested from the marker group	liczba starterów w grupie, w reakcji z którymi obserwowano produkty polimorficzne Number of primers in the group in which polymorphic products were observed in the reaction	liczba produktów różnicujących odmiany Number of polymorphic PCR products	
			Elsanta	Senga Sengana
FvH	151	44	80	52
ChFvM	135	97	178	155
CO	48	27	35	42
CX	33	15	20	16
FvA	29	14	23	17
FvB	27	18	45	30
FvC	27	13	37	25

W genomie odmiany ‘Elsanta’ dla wszystkich badanych grup markerów molekularnych, zidentyfikowano łącznie 418 alleli polimorficznych, natomiast w genomie odmiany ‘Senga Sengana’ – 337 alleli. Przeprowadzone badania potwierdzają wysoki stopień heterozygotyczności genomów obu wytypowanych do badań odmian.

Aanliza populacji mapującej. Uzyskana mapą genetyczną badanych genomów.

Do badań wykorzystano matryce DNA wyizolowane z genomów form rodzicielskich,

dla których potwierdzono wysoki poziom różnicowania genetycznego oraz z roślin potomnych, uzyskanych w wyniku ich krzyżowania. W reakcji z 44 wybranymi markerami SSR zidentyfikowano 53 allele, które segregowały w genotypach populacji mapującej. Na podstawie analizy rozkładu i frekwencji rekombinacji, oznaczono położenie i dystans mapowy loci tych alleli (Tab. 3). Skolekcjonowane dane użyto do przygotowania ‘szkieletu’ mapy genomów odmian ‘Elsanta’ oraz ‘Senga Sengana’.

Zintegrowana mapa genetyczna skonstruowana dla populacji 'Elsanta' × 'Senga Sengana' zawiera łącznie 27 grup sprzężeń (LG, *Linkage groups*), wykazujących wysoki stopień homologii do: chromosomów II i VI (LG2 i LG6 obejmowały homologię a-d), chromosomów I, III i VII (LG1, LG3 i LG7 obejmowały homologię a-c) oraz chromosomów IV i V (LG4 i LG5 obejmowały homologię a i b)

opracowanych dla gatunku *Fragaria*.

Łącznie, na chromosomie I udało się zlokalizować loci 7 markerów, na chromosomie II – osiem, na chromosomie III i VI – po dziesięć, na chromosomach IV i V – po pięć, a na chromosomie VII – loci czterech markerów SSR. Wielkość uzyskanego zmapowanego fragmentu genomu (bin map) wyniosła 1 033,50 cM (Rys. 2).

Tabela 3

Table 3

Wyniki analizy rozkładu alleli i frekwencji rekombinacji w populacji mapującej oraz dystans genetyczny zidentyfikowanych loci markerów SSR.

Allele distribution, recombination frequency in the mapping population and genetic distance of identified SSR markers.

Grupa sprzęż. Linkage group	Locus1	Locus2	Frekwencja rekombinacji/odległość mapowa (cM) Recombination frequency (cM)	Typ segregacji alleli w populacji Segregation type of alleles	Test X2 Chi-square test	Rozkład alleli w populacji Alleles distribution in mapping population
LG1A	EMFn049	FvC103	19	nnxnp	0.8	3:1
	EMFn049	COBRA	25	nnxnp	2.2	3:1
	FvC103	COBRA	6	mlxll	7.8	3:1
LG1B	COBRA	CO817054	24,3	nnxnp	0.3	3:1
	CO817054	FEFv14-29	20,7	mlxll	4.9	3:1
LG1C	BFACT003	FvH4171	21,7	mlxll	0.2	3:1
	FvH4171	ARSFL002	28,3	nnxnp	0.6	3:1
	BFACT003	ARSFL002	50	nnxnp	10.4	3:1
LG2A	ARSFL012	CFVCT015	30	abxab	3.0	1: 2: 1
	ARSFL012	BFACT002	42	abxab	3.5	1: 2: 1
	CFVCT015	BFACT002	12	nnxnp	0.4	3:1
LG2B	EMFn214	CFACT111	34,3	mlxll	3.5	3:1
LG2C	BFACT002	ARSFL015	18,4	mlxll	0.1	3:1
LG2D	FvH4173	CFVC0316	24,3	mlxll	1.7	3:1
LG3A	UDF0001	FvH4161	18,4	nnxnp	4.3	3:1
	UDF0001	FvH4155	26,6	mlxll	0.2	3:1
	UDF0001	FvH4177	46,4	mlxll	0.4	3:1
	UDF0001	FvH4165	70,7	mlxll	2.1	3:1
	FvH4161	FvH4155	8,2	nnxnp	0.2	3:1
	FvH4161	FvH4177	28	nnxnp	0.0	3:1
	FvH4161	FvH4165	51,6	mlxll	0.8	3:1
	FvH4155	FvH4177	19,8	mlxll	0.7	3:1
	FvH4155	FvH4165	43,4	nnxnp	2.3	3:1
LG3B	FvH4177	FvH4165	23,6	mlxll	2.6	3:1
	FvH4169	BFACT036	44,3	mlxll	0.4	3:1
LG3C	FvH4163	FvH4153	36	nnxnp	3.3	3:1
	FvH4163	BFACT045	68	nnxnp	1.8	3:1
	FvH4153	BFACT045	32	abxab	5.8	1: 2: 1
LG4A	EMFn132	FvH4164	34,3	abxab	0.3	1: 2: 1
	EMFn132	FvH456	42	abxab	3.6	1: 2: 1
LG4B	FvH4164	FvH4156	8	nnxnp	0.4	3:1
	CO816733	EMFv007	21,7	nnxnp	0.0	3:1

Tabela 3
Table 3

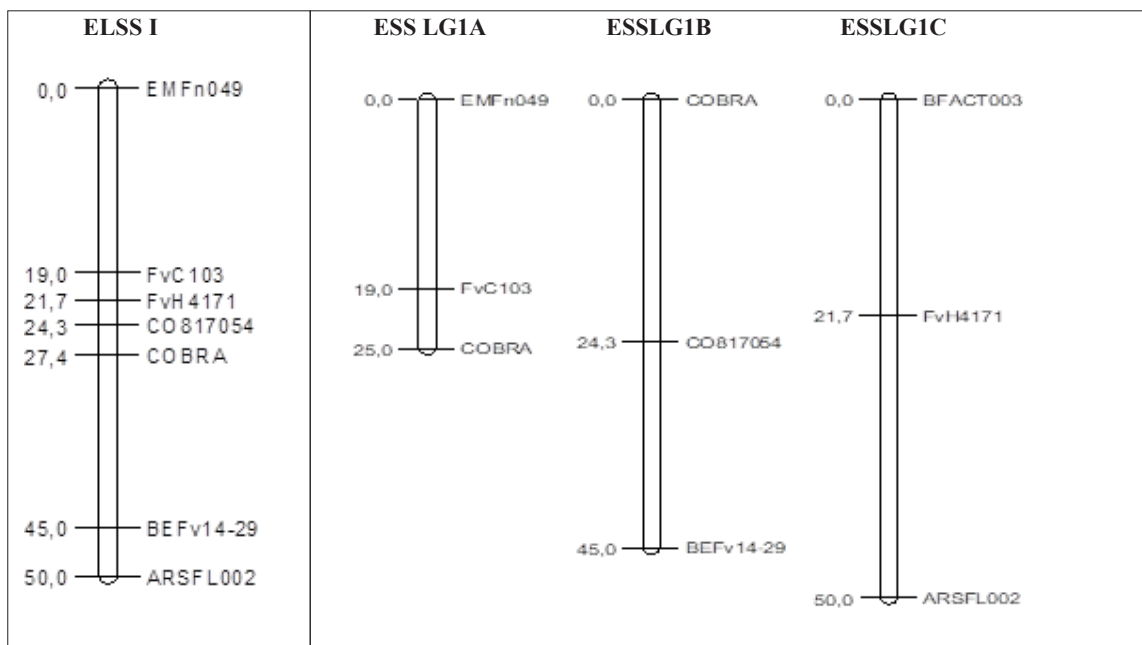
Wyniki analizy rozkładu alleli i frekwencji rekombinacji w populacji mapującej oraz dystans genetyczny zidentyfikowanych loci markerów SSR.

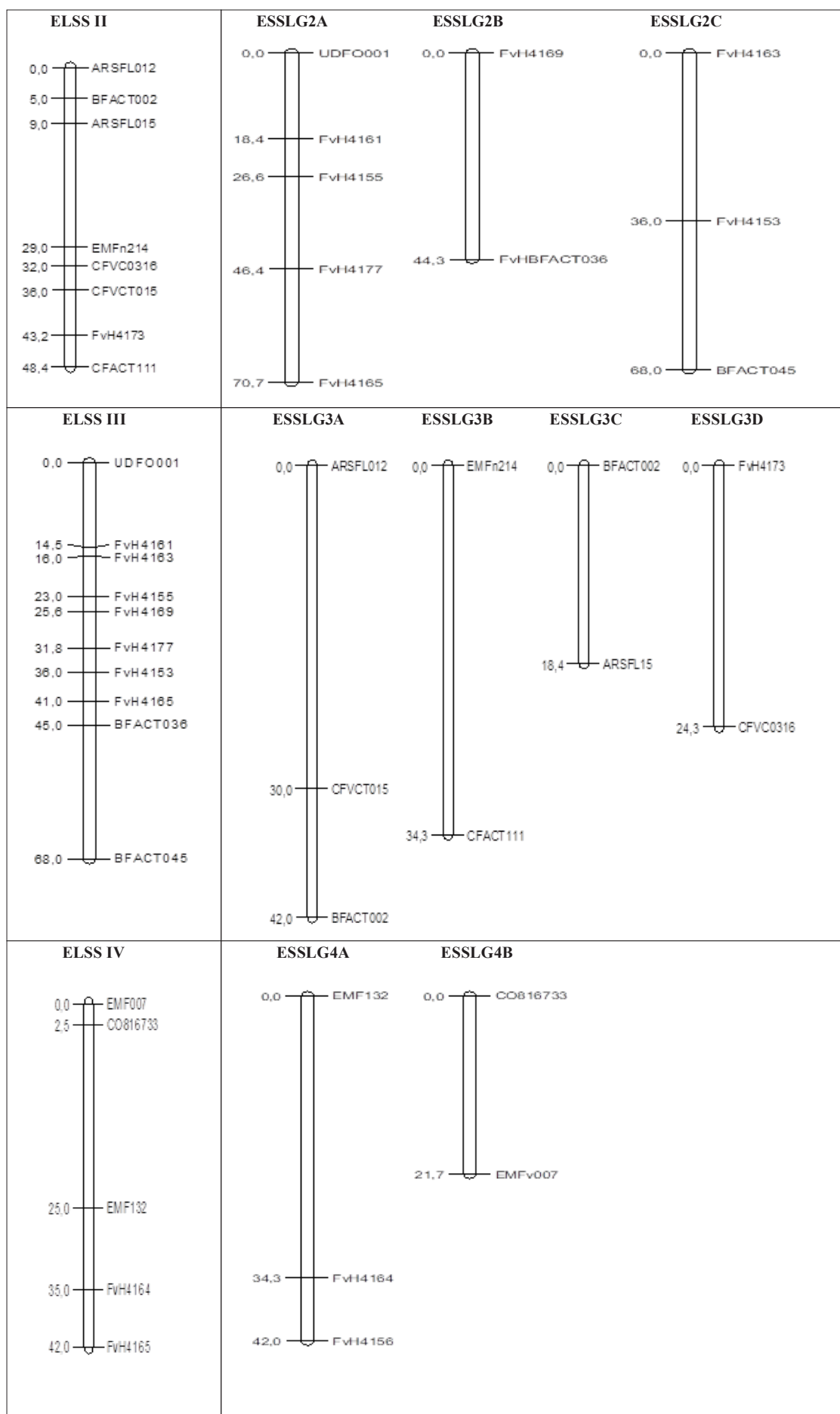
Allele distribution, recombination frequency in the mapping population and genetic distance of identified SSR markers.

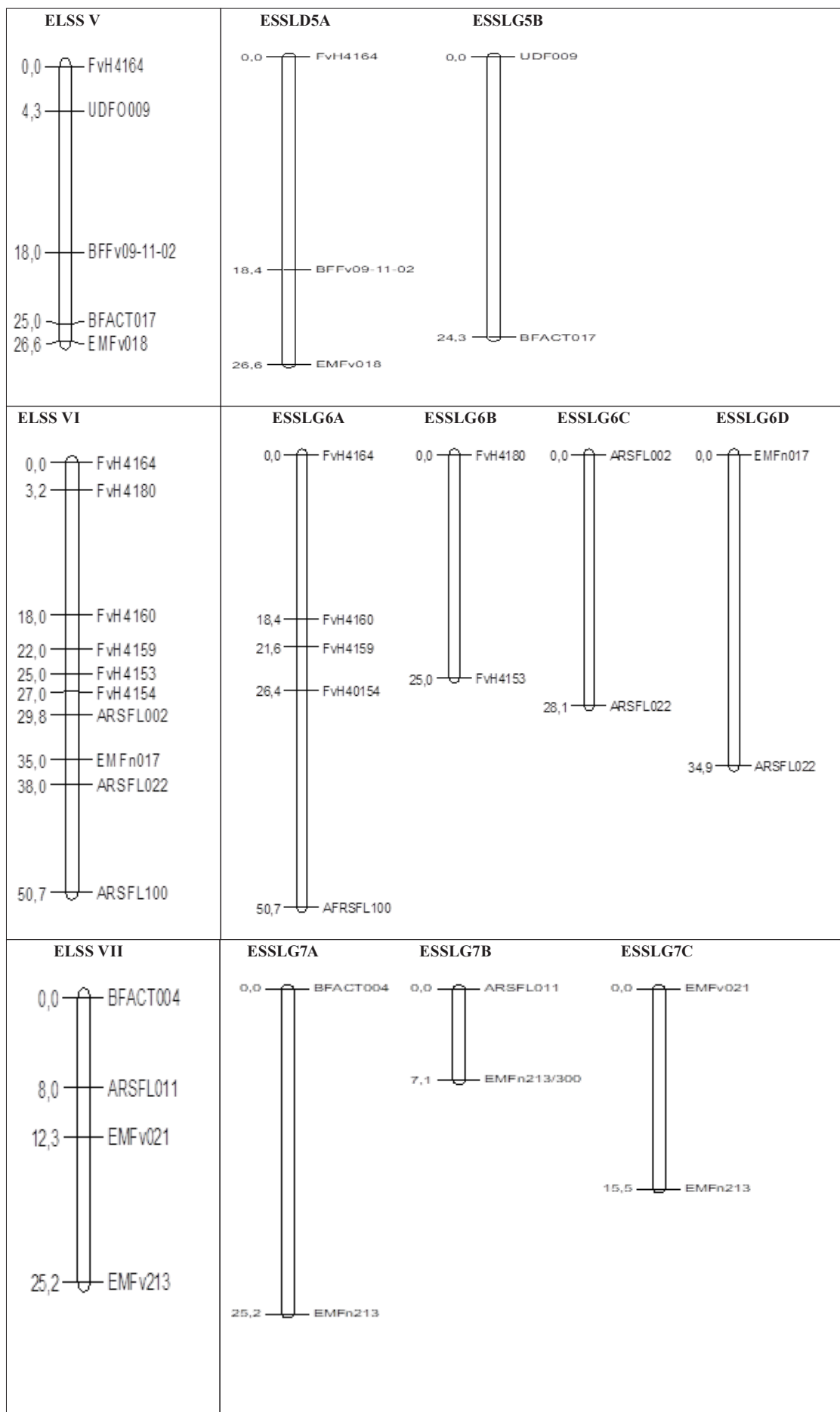
Grupa sprzęż. Linkage group	Locus1	Locus2	Frekwencja rekombinacji/odległość mapowa (cM) Recombination frequency (cM)	Typ segregacji alleli w populacji Segregation type of alleles	Test X2 Chi-square test	Rozkład alleli w populacji Alleles distribution in mapping population
LG5A	FvH4164	BFFv09-11-02	18,4	nnxnp	4.1	3:1
	FvH4164	EMFv018	26,6	mlxll	0.2	3:1
	BFFv09-11-02	EMFv018	8,2	mlxll	5.5	3:1
LG5B	UDF009	BFACT017	24,3	nnxnp	1.7	3:1
LG6A	FvH4164	FvH4160	18,4	mlxll	12.6	3:1
	FvH4164	FvH4159	21,6	nnxnp	2.0	3:1
	FvH4164	FvH4154	26,4	nnxnp	4.9	3:1
	FvH4164	ARSFL100	50,7	mlxll	0.5	3:1
	FvH4160	FvH4159	3,2	nnxnp	0.3	3:1
	FvH4160	FvH4154	8	mlxll	2.9	3:1
	FvH4160	ARSFL100	32,3	mlxll	0.6	3:1
	FvH4159	FvH4154	4,8	nnxnp	0.1	3:1
	FvH4159	ARSFL100	29,1	mlxll	4.3	3:1
	FvH4154	ARSFL100	24,3	abxab	0.6	3:1
LG6B	FvH4180	FvH4163	25	mlxll	2.5	3:1
LG6C	ARSFL002	ARSFL022	28,1	abxab	1.1	1: 2: 1
LG6D	EMFn017	ARSFL022	34,9	nnxnp	0.0	3:1
LG7A	BFACT004	EMFn213	25,2	nnxnp	2.4	3:1
LG7B	ARSFL011	EMFn213	7,1	nnxnp	5.2	3:1
	EMFv021	EMFn213	15,5	mlxll	0.2	3:1

Rys. 2. Schemat szkieletu zintegrowanej mapy ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’.

Fig. 2. The ‘skeleton’ (bin map) of the integrated genetic map of ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’.







Dyskusja

Truskawka (*Fragaria* × *ananassa* Duch. ex Rozier) jest allopoliploidem (oktoploidem $2n=8x=56$) (Davis i in. 2007), którego poliploidyzacja podczas procesów ewolucyjnych doprowadziła prawdopodobnie do zaburzeń liczby chromosomów w gametach (Hancock 1999). Jej genom powstał na skutek przypadkowej hybrydyzacji dwóch gatunków poziomki *Fragaria chiloensis* Ehrh. (Chile) i *Fragaria virginiana* (USA).

W oparciu o badania cytogenetyczne i molekularne opracowano kilka modeli genomów allopoliploidalnych tego gatunku. Zgodnie z zapisem Y1Y1Y1Y1ZZZZ/Y1Y1Y1'Y1'ZZZZ (Rousseau-Gueutin i in. 2009) i AAAABBCC (Fedorova 1946) w skład genomu *F.* × *ananassa* wchodzić mogą dwa (Y1, Z) bądź trzy rodzaje sub-genomów (Y1, Y1', Z lub A, B, C), a zapis AAA'A'BBB'B' (Bringhurst 1990) sugeruje udział nawet czterech z nich (A, A', B, B') (Hummer i Janick 2009).

Skomplikowany układ genomu klasyfikuje truskawkę jako bardzo trudny obiekt dla zaawansowanych badań genetyczno-hodowlanych, czego skutkiem jest brak w literaturze doniesień na temat interakcji między genami warunkującymi różne cechy *F.* × *ananassa*. Niemniej jednak próby tworzenia zagęszczonych map genetycznych, służących „rozlokowaniu” genów warunkujących określone cechy na odpowiednich chromosomach, podejmowano w ostatnich latach w kilku współpracujących ośrodkach europejskich, USA i Japonii (Kole i Abbott, 2008, Sargent i in. 2011). Skutkiem tych badań jest dostępność map referencyjnych tego gatunku, sporządzonych dla roślin diploidalnych *F. vesca* i *F. bucharica* FV × FB, (Sargent i in. 2006, 2007, 2008; Zorrilla-Fontanesi i in. 2011) oraz oktoploidalnych *F.* × *ananassa* (Isobe i in. 2013, Sargent i in. 2012; Davik i in. 2015). Mapy te zagęszczone są licznymi markerami mikrosatelitarnymi, które (uwzględniając zasadę kolinearności od 15 do 80% (Mohamed 2014)) stanowią bazę danych do sporządzania map genetycznych genomów nowych odmian gatunku *Fragaria*.

Punktem krytycznym podczas generowania map genetycznych jest dobór populacji mapującej. Użycie populacji mapującej będącej wynikiem krzyżowania form rodzicielskich niewystarczająco zróżnicowanych pod względem fenotypowym i genotypowym, prowadzi do problemów z interpretacją typu segregacji alleli, a w efekcie do błędnego odczytu położenia genów na mapie (Liebhard i Gessler, 2000; Rungis i in., 2005; Semagn i in., 2006; Kole i Abbott, 2008; Myles i in., 2009). Najprostszą metodą uzyskiwania populacji mapującej

jest krzyżowanie heterozygotycznych form rodzicielskich CP (*Cross Polination*, zastosowana również w niniejszych badaniach), ale zależnie od typu dziedziczenia alleli cech stosowane są również populacje F_2 , BC czy $F_{2,3}$, wywodzące się z krzyżowania genotypów homozygotycznych (Knapp i in. 1990; Reiter i in., 1992; Yu i in., 2000; Philips i Vasil, 2001; Vinod, 2006; Hittalmani i in., 2008; Kole i Abbott, 2008). Przygotowanie populacji CP ma zwykle charakter kontrolowanego, wewnątrzgatunkowego krzyżowania genotypów o znanym pochodzeniu. Krytyczny podczas badania takiej populacji może być zbyt niski stopień polimorfizmu genetycznego form rodzicielskich oraz towarzyszące obcoplejności występowanie potomstwa z nieplanowanych zapyleń (Van Ooijen i Voorrips, 2001). Dlatego przed podjęciem prac nad mapowaniem genomów 'Elsanta' i 'Senga Sengana' przeprowadzono (1) ocenę stopnia heterozygotyczności genomów form rodzicielskich oraz (2) analizę statusu mieszańców uzyskanych w wyniku ich krzyżowania.

W przeprowadzonych badaniach, dzięki analizie porównawczej wzorów prążkowych uzyskanych w testach SSR-PCR na matrycach DNA rodziców oraz genotypów mieszańcowych, pochodzenie z kontrolowanego zapylenia potwierdzono dla wszystkich badanych siewek. Ponadto, wysoki stopień polimorfizmu pomiędzy krzyżowanymi genotypami obserwowany w testach SSR-PCR, wskazuje na znaczny poziom heterozygotyczności odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana', co potwierdza ich przydatność do tworzenia populacji CP, stosowanej przy konstruowaniu map genetycznych.

Kolejnym ważnym elementem analizy populacji przydatnej do tworzenia map genetycznych genomów roślinnych jest także dobór markerów molekularnych (Ritter i in., 1990, Liebhard i Gessler 2000).

Zgodnie z definicją Schulmana i in. (2004), markery powinny być sprzężone z cechą, łatwe do wykrycia w testowanym materiale roślinnym i dziedziczone zgodnie z zasadami Mandla. Inna definicja zakłada również, że powinny one odzwierciedlać allele każdego z reprezentowanych przez nie genów/fragmentów genomu (Griffiths i in. 1996). W niniejszych badaniach wykorzystano zatem tylko markery molekularne, które wyraźnie różnicowały krzyżowane formy rodzicielskie, a zidentyfikowane dla nich allele heterozygotyczne segregowały w genotypach mieszańców.

Uzyskana mapa genetyczna zawiera łącznie 27 grup sprzężeń, na których zidentyfikowano loci 53 alleli polimorficznych, pokrywających 1 033 cM

genomu truskawki. Należy zwrócić uwagę, że sporządzona dla oktoploidalnych genomów odmian ‘Redguntlet’ i ‘Hapil’ mapa referencyjna zawiera 30 grup sprzężeń (chromosomów homologicznych) (Sargent i in. 2012), a odmian ‘Sonata’ i ‘Babette’ – 31 grup reprezentujących siedem chromosomów genomu *Fragaria* (Davik i in. 2015).

Uzyskana mapa stanowi istotną bazę dla podjęcia prac nad identyfikacją i potwierdzeniem obecności regionów regulujących cechy ilościowe (QTL, Quantitative Trait Loci) w genomach badanych odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’.

Wiedza dotycząca lokalizacji precyzyjnych sekwencji w genomie pozwala na wskazanie potencjalnych markerów molekularnych, regulujących ważne agronomicznie cechy gatunku *Fragaria*, przydatnych do wczesnej selekcji genotypów hodowlanych wspierających konwencjonalne metody hodowli poprzez wdrożenie procesu MAS (Marker Assisted Selection) (Sargent i in. 2012).

Dotychczasowe, przeprowadzone m.in. dla odmian ‘Hanoye’ badania potwierdzają bowiem obecność regionów QTL zawierających markery sprzężone z cechą jakości owoców truskawki, zidentyfikowane w obrębie chromosomów II, IV, V i VII (Zorrilla-Fontanesi i in. 2011, Verma i in. 2017) oraz z odpornością na różnego rodzaju patogeny, potwierdzone w regionach chromosomów III i VI (Denoyes Rothan i in. 2004, 2005; van Dijk i in. 2014; Davik i in. 2015).

Wnioski

1. Uzyskana populacja roślin potomnych pochodzących ze skrzyżowania odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ stanowi wartościowy materiał do badań związanych z opracowaniem mapy genetycznej truskawki.
2. Wszystkie siewki z uzyskanej populacji mapującej reprezentowały wzory genetyczne wskazujące na segregację alleli pochodzących wyłącznie od form rodzicielskich ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’.
3. Sporządzony szkielec mapy genetycznej ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’ może stanowić bazę do dalszej saturacji i do lokalizacji genów i identyfikacji regionów QTL sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki.

Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR. hn.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r. Zadanie nr 74.

Literatura

- Bringham, R. S. (1990). Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. Hort. Sci. 25: 879–881.
- Darrow, G. M. (1966). The Strawberry - History Breeding and Physiology. The New England Inst. for Med. Res..
- Davik, J., Sargent, D. J., Brurberg, M. B., Lien, S., Kent, M., Alsheikh. (2015)a. A ddRAD based Linkage map of the cultivated strawberry, *Fragaria annassa*. PLOS ONE 10(9): doi:10.1371/journal.pone.0137746
- Davis, T. M., DiMeglio, L. M., Yang, R. H., Styan, S. M. N., Lewers, K. S. (2007). Assessment of SSR transfer from the cultivated strawberry to diploid strawberry species: Functionality, linkage group assignment, and use in diversity analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 131: 506–512.
- Denoyes-Rothan, B., Guerin, G., Lerceteau-Kohler, E., Risser, G. (2005). Inheritance of a race-specific resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria* × *ananassa*. Phytopathology 95: 405-412.
- Denoyes-Rothan, B., Lerceteau-Kohler, E., Guerin, G., Bosseur, S., Bariac, J., Martin, E., Roudeillac, P. (2004). QTL analysis for resistance to *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). Acta Hort. 663: 147-151.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
- FAOSTA. (2019). Food and Agriculture <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Federova, N. J. (1946). Cross ability and phylogenetic relationships in the main European species of *Fragaria*. Natl. Acad. Sci. USSR. 52: 545–7.5.
- Griffiths, P. L., Dougan, G., Connerton, I. F. (1996). Transcription of the *Campylobacter jejuni* cell division gene *ftsA*. FEMS Micr. Lett. 143(1): 83-87.
- Hancock, J. F. (1999). Strawberries. CAB International, Oxford, U Hancock, K.
- Hancock, J. F. (2008). Temperate fruit crop breeding: germplasm to genomics, Springer Science +Business Media, B.V. New York. USA.
- Hittalmani, S., Girish, T. N., Biradar, H., Maughan, P. J. (2008). Mapping populations: Development, Descriptions and Deployment; Principles and Practices of Plant Genomics: Vol.1: Genome Mapping; Chapter 3, Kolle, C. and Abbott, A.G. Sci. Publishers USA: 69-92.
- Hummer, K. E., Janick, J. (2009). Rosaceae: Taxonomy, economic importance, genomics. In: Foltá, K. Gardiner, S. (eds), Genetics and Genomics of Rosaceae. Springer Science+Business Media, New York, USA, 1-18.
- Isobe, S. N., Hirakawa, H., Sato, S., Maeda, F., Ishikawa, M., Mori, T., Yamamoto, Y., Shirasawa, K., Kimura, M., Fukami, M., Hashizume, F., Tsuji, T., Sasamoto, S., Kato, M., Nanri, K., Tsuruoka, H., Minami, C., Takahashi, C., Wada, T., Ono, A., Kawashima, K., Nakazaki, N., Kishida, Y., Kohara, M., Nakayama, S., Yamada, M., Fujishiro, T., Watanabe, A., Tabata, S. (2013). Construction of an

- integrated high density simple sequence repeat linkage map in cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) and its applicability. *DNA Res.* 20: 79–92.
- Kole, C., Abbott, A. G. (2008). Fundamentals of plant genome mapping. W: Kole, C., Abbot, A. G., Principles and practices of plant genomics. Genome mapping. Science Publishers USA: 2-67.
- Lerceteau-Kohler, E., Roudeillac, P., Markocic, M., Guerin, G., Praud, K., Denoyes-Rothan, B. (2002). The use of molecular markers for durable resistance breeding in the cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Acta Hort.* 567: 615-618.
- Liebhart, R., Gessler, C. (2000). Possible errors in genome mapping. *Integrated Control of Pome Fruit Diseases IOBC wprs Bulletin* 23(12): 127-135.
- Masny A., Markowski J., Żurawicz E. (2002): Możliwości poprawienia jakości truskawek przez hodowlę nowych odmian. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych* 488:495-501
- Mohamed, A. M. W. (2014). The genetic map of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) based on 'Elsanta' × 'Senga Sengana' mapping population. *Praca doktorska. Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice* pp.108.
- Myles, S., Peiffer, J., Brown, P. J., Ersoz, E. S., Zhang, Z., Costich, D. E., Buckler, E. S. (2009). Association mapping: Critical considerations shift from genotyping to experimental design. *The Plant Cell* 21. (2194)-2202.
- Philips, R. L., Vasil, I. K. (2001). DNA based markers in Plants. *Kluwer Acad. Publ, Dordrecht, The Netherlands* 42: 227-238.
- Reiter, R. S., Williams, J. G. K., Feldman, K. A., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., Scolnik, P. A. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *PNAS* 89. (1477)-1481.
- Ritter, E., Gebhardt, C., Salamini, F. (1990). Estimation of recombination frequencies and constructing of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125: 645-654.
- Rousseau-Gueutin, M., Gaston, A., Änouche, A., Ainouche, A., Ainouche, M. L., Olbricht, K., Staudt, G., Richard, L., Denoyes-Rothan, B. (2009). Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria*, L. (strawberry): new insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51: 515–530.
- Rungis, D., Hamberger, B., Berube, Y., Wilkin, J., Bohlmann, J., Ritland, K. (2005). Efficient genetic mapping of single nucleotide polymorphisms based upon DNA mismatch digestion. *Molecular Breeding* 16: 261-270.
- Sargent, D. J., Cipriani, G., Vilanova, S., Gil-Ariza, D., Arús, P., Simpson, D. W., Tobutt, K. R., Monfort, A. (2008). The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. *Genome* 51: 120–127.
- Sargent, D. J., Clarke, J., Simpson, D. W., Tobutt, K. R., Arús, P., Monfort, A., Vilanova, S., Denoyes-Rothan, B., Rousseau, M., Folta, K. M., Bassil, N. V., Battey, N. H. (2006). An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theor. Appl. Genet.* 112. (1349)–1359.
- Sargent, D. J., Kuchta, P., Lopez Girona, E., Zhang, H., Davis, T. M., Celton J. M., Marchese, A., Korbin, M., Folta, K., Shulaev, V., Simpson, D. W. (2011). Simple Sequence Repeat Marker Development and Mapping Targeted to previously Unmapped Regions of the Strawberry Genome Sequence. *Crop Science Society of America - The Plant Genome* 4:165–177.
- Sargent, D. J., Passey, T., Šurbanovski, N., Girona, L. L., Kuchta, P., Davik, J., Harrison, R., Passey, A., Whitehouse, A. B., Simpson, D. W. (2012). A microsatellite linkage map for the cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) suggests extensive regions of homozygosity in the genome that may have resulted from breeding and selection. *Theor. Appl. Genet.* 124. (1229)–1240.
- Sargent, D. J., Rys, A., Nier, S., Simpson, D. W., Tobutt, K. R. (2007). The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theor. Appl. Genet.* 114: 373–384.
- Schulman, A. H., Flavell, A. J., Ellis, T. H. N. (2004). The Application of LTR Retrotransposons as Molecular Markers in Plants. In: Miller, W. J., Capy, P. (eds) *Mobile Genetic Elements. Methods in Molecular Biology* 260: Humana Press
- Semagn, K., Bjornstad, A., Ndjioudjop, M. N. (2006). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25). (2569)-2587.
- Verma, S., Zurn, J. D., Salinas, N., Mathey, M. M., Denoyes, B., Hancock, J. F., Finn, C. E., Bassil, N. V., Whitaker, V. M. (2017). Clarifying sub-genomic positions of QTLs for flowering habit and fruit quality in U.S. strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) breeding populations using pedigree-based QTL analysis. *Horticulture Research* 4. (1706)2; doi:10.1038/hortres.2017.62
- Van Dijk, T., Pagliarani, G., Pikunova, A., Noordij, Y., Yilmaz-Temel, H., Meulenbroek, B., Visser, R., van de Weg, E. (2014). Genomic rearrangements and signatures of breeding in the allo-octoploid strawberry as revealed through an allele dose based SSR linkage map. *BMC plant biology* 14: 55.
- Van Ooijen, J. W., Voorrips, R. E. (2001). *JoinMap 3.0*, Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International, Wageningen, The Netherlands*, s. 78
- Vinod, K. K. (2006). Genome mapping in plant populations. *Proceedings of the training programme on "Modern Approaches in Plant Genetic Resources"*. – Collection,
- Yu, K., Park, S. J., Poysa, V., Gepts P. (2000). Integration of simple sequence repeats (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The Journal of Heredity* 91(6): 429-434.
- Zorrilla-Fontanesi, Y., Cabeza, A., Torres, A. M. (2011). Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid *Fragaria* and their transferability across the Rosoideae subfamily. *Mol. Breed.* 27: 137–156.