

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mapa genetyczna truskawki (*Fragaria x ananassa*) opracowana w oparciu o analizę populacji mapującej 'Elsanta' x 'Senga Sengana'

Abdel-Rahman Moustafa Abdel-Wahab Mohamed

Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin Ogrodniczych
Instytutu Ogrodnictwa, Skierniewice 2014

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Korbin
Promotor pomocniczy: dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz

Recenzenci: prof. dr hab. Maria Klein (UR, Kraków)
prof. dr hab. Ewa Łojkowska (MWB UG i GUMed, Gdańsk)

WSTĘP

Truskawka (*Fragaria x ananassa* Duch. ex Rozier), należąca do rodzaju poziomka (*Fragaria* L.), podrodziny *Potentilloideae*, rodziny różowatych (*Rosaceae* Juss.) i rzędu różowców (*Rosales* Perleb), powstała w wyniku przypadkowego przekrzyżowania dwóch oktoploidalnych gatunków *F. chiloensis* (L.) Mill i *F. virginiana* Duch., pochodzących odpowiednio z Ameryki Południowej i Północnej. Z cytogenetycznego punktu widzenia truskawka jest allopoliploidem, a budowa jej genomu jest prawdopodobnie efektem zaburzeń w redukcji liczby chromosomów w gametach.

Obecnie truskawka jest uprawiana niemal na całym świecie. Roczna produkcja truskawek przekracza 4,5 miliona ton. Polska należy do przodujących producentów tych owoców (3 miejsce w Europie), które ze względu na walory smakowe, jak też relatywnie wysoką zawartość cukrów, makro- i mikroelementów, witamin, polifenoli i innych substancji prozdrowotnych, są pożądanym komponentem w diecie człowieka.

Hodowla truskawki, bazująca w XIX wieku na selekcji mieszańców *F. chiloensis* x *F. virginiana*, i kontynuowana przez kolejne lata w oparciu o materiały hodowlane, będące w posiadaniu różnych ośrodków, zaowocowała obecnością na rynku kilkuset cenionych odmian tego gatunku. Introgresja genów regulujących ważne cechy użytkowe truskawki jest jednak bardzo trudna ze względu na kilkuletni proces selekcji w klasycznej hodowli oraz złożoną

kompozycję genomu ($2n = 8x = 56$ chromosomów, rozdzielonych na cztery sub-genomy). Ograniczenia te sprawiają, że hodowcy są niezwykle zainteresowani rozwojem precyzyjnych narzędzi pozwalających na zwiększenie efektywności ich pracy. Mapy genetyczne są jednym z nowoczesnych narzędzi, dostarczających wiedzy na temat położenia genów i wynikających z tego interakcji między sekwencjami kodującymi ważne cechy, jak też na temat możliwości ich współdziedziczenia.

CEL BADAŃ

Celem przedstawionej rozprawy było utworzenie szkieletu mapy genetycznej truskawki w oparciu o analizę populacji mapującej 'Elsanta' x 'Senga Sengana'. Dla osiągnięcia tego celu przeprowadzono ocenę: stopnia heterozygotyczności form rodzicielskich i statusu genetycznego potomstwa E x SS oraz przydatności 149 markerów mikrosatelitarnych, zidentyfikowanych w roślinach różnych gatunków rodzaju *Fragaria*, do skringu genetycznego populacji mapującej. Obliczono też częstotliwości rekombinacji, zweryfikowano uzyskane wyniki stosując test χ^2 , scharakteryzowano profile segregacji i określono rozkład markerów w utworzonych grupach sprzężeń. Drugim z celów badawczych było rozpoznanie poziomu kolinearności uzyskanej mapy i istniejących map referencyjnych, utworzonych dla diplo- i oktoploidalnych gatunków z rodzaju *Fragaria*.

Z praktycznego punktu widzenia, szkielet mapy skonstruowany dla tak popularnych odmian, jakimi są zarówno holenderska odmiana deserowa 'Elsanta', jak i niemiecka, przydatna dla przetwórstwa odmiana 'Senga Sengana', będzie stanowił dobrą bazę dla dalszych badań nad dziedziczeniem cech oraz podstawę do prac nad identyfikacją markerów selekcyjnych dla nowoczesnej hodowli truskawki.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ

W wyniku przeprowadzonych badań powstała pierwsza w Polsce mapa genomu truskawki i równocześnie pierwsza w świecie mapa sprzężeń, sporządzona dla odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana'. Przy tworzeniu mapy wzięto pod uwagę trzy punkty krytyczne dla mapowania: właściwy dobór form rodzicielskich wykazujących silne zróżnicowanie genetyczne, dobór puli markerów molekularnych z allelami równomiernie rozłożonymi w badanym genomie i dobór odpowiednich narzędzi do analizowania uzyskanych wyników molekularnych i wygenerowania mapy.

Sekwencje mikrosatelitarne, których przydatność do mapowania genetycznego potwierdziło wielu autorów, były wybrane z baz danych zgromadzonych dla roślin z rodzaju

Fragaria tj., *F. vesca* (66 markerów), *F. viridis* (6 markerów), *F. bucharica* (5 markerów), *F. virginiana* (5 markerów) i *F. x ananassa* (58 markerów), jak też z bazy NCBI dbEST (8 markerów), zakładając istnienie pewnej homologii między genomami w obrębie rodziny *Rosaceae*. Zaprojektowano startery do wybranych sekwencji i oceniono ich przydatność jako markerów w teście touch-down PCR. Uzyskane amplikony wizualizowano w świetle białym, po rozdziale w żelu poliakrylamidowym (elektroforeza wertykalna) i wybarwieniu AgNO_3 .

Startery SSR, zweryfikowane pozytywnie pod kątem ich przydatności w testach opartych na PCR, użyto do analizy genotypowej form rodzicielskich 'Elsanta' i 'Senga Sengana', znanych jako odmienne fenotypowo. W reakcjach ze 125 parami starterów, przeprowadzonych na matrycach DNA wydzielonych z każdej z odmian, wygenerowano 346 amplikonów (1-9 amplikonów/ reakcję). Sto pięćdziesiąt jeden amplikonów pochodziło z genomu roślin 'Elsanta', 170 z genomu 'Senga Sengana', a 25 zidentyfikowano w obu genomach. Badane odmiany były więc wysoce heterozygotyczne, co kwalifikowało je do roli form wyjściowych właściwych dla pozyskania populacji mapującej CP.

Zweryfikowana fenotypowo populacja E x SS (F_1) (CP = 104 pojedynki) posłużyła do analizy segregacji alleli mikrosatelitarnych. Dwieście dziewięćdziesiąt jeden amplikonów było polimorficznych, przy czym 129, 142 i 20 alleli pochodziło odpowiednio z genomu 'Elsanta', genomu 'Senga Sengana' i genomów obydwu rodziców. Profile segregacyjne oceniano przy użyciu programu JoinMap 3.0. Po weryfikacji danych (test χ^2 , $P \leq 0.001$), 117, 122 i 18 wzorów układało się następująco: bn x nn, nn x an oraz an x an. Łącznie zidentyfikowano 199 loci, obejmujących 76 alleli pochodzących z genomu rośliny 'Elsanta' (ab x aa), 84 z genomu "Senga Sengana" (aa x ab) i 39 allele identyczne dla obojga rodziców (an x an lub ab x ab, ab x ac lub cn oraz ab x cd, an x cd lub ab x cn), gdzie n oznacza brak allelu.

Formę graficzną mapy sporządzono przy użyciu programu MapChart v 2.2. Uzyskana mapa genetyczna zawierała 116 loci rozlokowanych w obrębie 30 grup sprzężeń, o łącznej długości 1450,4 cM.

W drugiej fazie projektu oceniano stopień kolinearności mapy E x SS z mapami referencyjnymi, opracowanymi dla poziomki (populacja mapująca: *F. vesca* x *F. bucharica*, 2x) i truskawki (populacja mapująca: 'Redgountlet' x 'Hapil', 8x). Nowa mapa była znacznie bardziej złożona w porównaniu z mapą referencyjną poziomki, gdyż zawierała sub-grupy (A-D) typowe dla oktoploidu. LG1 i LG3 obejmowały po 4 sub-grupy, zawierające odpowiednio 19 i 32 loci. LG2, LG6 i LG7 były reprezentowane również przez cztery sub-grupy każda i

zawierały po 17 (LG2 i LG6) oraz 10 loci (LG7). Najmniejsze grupy sprzężeń tj., LG5 i LG4, składały się z 3 sub-grup każda, które zawierały odpowiednio 8 i 9 loci. Położenie i orientację markerów na mapach można uznać za względnie konserwatywne, w wyjątkiem LG1, LG3, LG6 i LG7. W LG7 dla markerów BFACT004 i ARSFL024 zidentyfikowano inwersje w stosunku do LGVII z mapy diploidalnej poziomki. Markery FAC001 i CFVCT032 zmapowano w LG1 i LG6, podczas gdy oryginalnie loci te znajdowały się w LGVII mapy poziomki. Porównanie mapy E x SS z mapą RG x G wykazało różnice w położeniu markerów w obrębie grup sprzężeń, jak w odległościach mapowych. Kilka markerów (np. EMFn049, ARSFL031, FvH4169 i BFACT045) zlokalizowanych na LG1, 2 i 3 nowej mapy generowało podwójne loci w tej samej grupie sprzężeń.

WNIOSKI

1. Pierwsza polska mapa genetyczna truskawki o długości 1450,4 cM, obejmująca 30 grup sprzężeń ze średnim dystansem mapowym 8.5 cM, została wygenerowana dla odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana'.
2. Ze względu na zastosowanie bardzo popularnych odmian w celu wytworzenia populacji mapującej CP, jak też uwzględniając obecny stan zagęszczenia wygenerowanego szkieletu mapy i możliwość jego saturacji, otrzymana mapa wydaje się w pełni spełniać warunki dla bazy do dalszych badań nad kompozycją i funkcjonowaniem genomu truskawki, jak też do prac nad zidentyfikowaniem markerów ważnych cech – dla potrzeb hodowli twórczej gatunku.
3. Porównanie nowoutworzonej mapy z mapami referencyjnymi *F. vesca* x *F. bucharica* (2x) oraz 'Redgauntlet' x 'Hapil' (8x) wykazało ich znaczną kolinearność. Rozbieżności między mapą E x SS i mapą diploidalnej poziomki obserwowano w grupach sprzężeń LG1, LG3, LG6 i LG7. Dotyczyły one zarówno położenia markerów na mapie, ich orientacji, jak i odległości mapowych. Niektóre markery, pochodzące oryginalnie z map referencyjnych, generowały też podwójne loci na tej samej grupie sprzężeń.

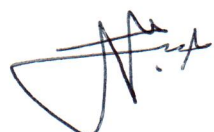
Abdel Rahman Mohamed


Fig. 1. Grupy sprzężeń na utworzonej mapie 'Elsanta' x 'Senga Sengana'

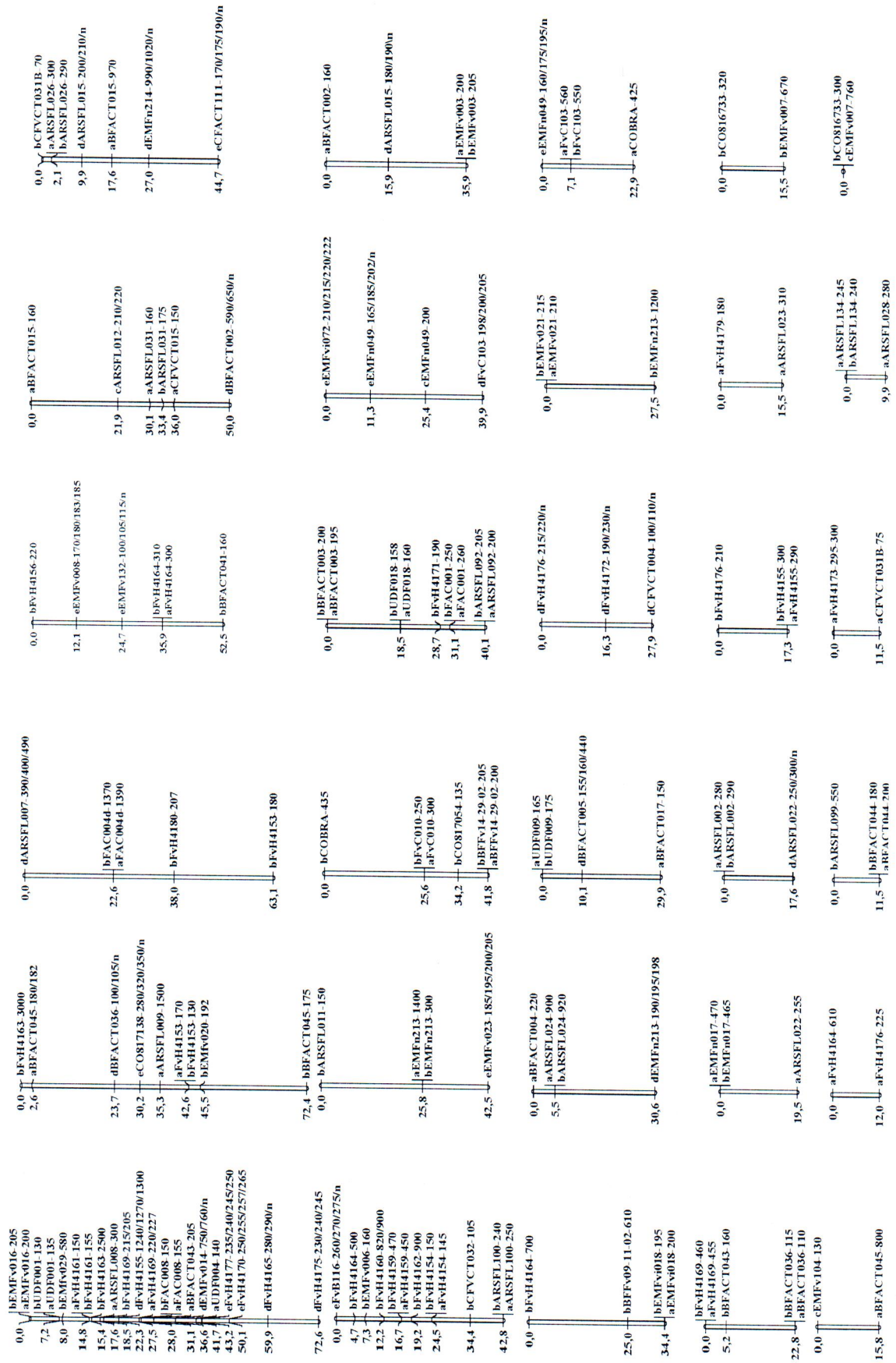


Fig. 2. Przykład oceny kolinearności grup sprzężeń: LG z mapy E x SS i LGIII z mapy referencyjnej *F. vesca* x *F. bucharica* (2x)

