

**Zadanie 74: Badania nad saturacją mapy genetycznej 'Elsanta' x 'Senga Sengana' pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria x ananassa*)**

W 2020 roku badania realizowano w ramach dwóch tematów badawczych:

**Temat badawczy 1.** Przygotowanie materiału badawczego i badania fenotypowe.

Celem badań było pozyskanie subpopulacji segregującej 'Elsanta' x 'Senga Sengana' (oznaczonej jako subpopulacja I) i ocena fenotypowa roślin mieszańcowych należących do tej populacji pod kątem tolerancji na wysoki stopień zasolenia gleby, a także ocena wybranych parametrów jakości owoców pojedynków należących do przygotowanej do tego celu subpopulacji A. Pojedynki z subpopulacji I po ocenie czystości genetycznej włączono do populacji bazowej dla sporządzenia mapy genetycznej (analizy molekularne).

Wyjściową populację mapującą 'Elsanta' x 'Senga Sengana' poszerzono o 132 genotypy mieszańcowe F1, pozyskane z programu zapyleń 2019/2020. Siewki wyprodukowane w bieżącym roku poddano ocenie fenotypowej pod kątem ich tolerancji na zasolenie podłoża (w doświadczeniu (szklarnia), wszystkie genotypy mieszańcowe z populacji podlewano standardową oraz 2 i 5 krotnie zwiększoną dawką nawozu Florovit). Równolegle owoce siewek z subpopulacji A, uprawianych w kwaterze polowej, poddane zostały ocenie pod względem stopnia jędrności oraz zawartości ekstraktu i kwasu askorbinowego. Rozkład fenotypowy cechy tolerancji na zasolenie gleby oraz cech warunkujących jakość owoców wskazał na wystąpienie zjawiska segregacji w uzyskanej puli roślin.

**Temat badawczy 2.** Temat realizowano zgodnie z etapami:

- I. Saturacja istniejącej mapy E x SS markerami SSR.
- II. Określanie położenia markerów cech i regionów QTL na mapie 'Elsanta' x 'Senga Sengana'.

**Etap I.** Celem badań było zagęszczenie szkieletu mapy genetycznej 'Elsanta' x 'Senga Sengana'. Do analiz segregacji alleli markerów SSR w obrębie populacji mapującej wytypowano 100 starterów mikrosatelitarnych. Uzyskana mapa genomów obu odmian została wzbogacona o 226 alleli polimorficznych zidentyfikowanych w roku 2020.

Dla sporządzenia zagęszczonej (2014-2020) mapy przeprowadzono analizę łącznie 989 alleli polimorficznych segregujących w genomach roślin mieszańcowych z badanej populacji mapującej.

W genomie odmiany 'Elsanta' zidentyfikowano 120 grup sprzężeń pokrytych 536 allelami markerów SSR. Łącznie zmapowano 2 362 cM genomu tej odmiany. Na mapie odmiany 'Senga Sengana' natomiast zidentyfikowano łącznie 87 grup sprzężeń pokrytych 453 allelami SSR, a wielkość jej zmapowanego genomu wyniosła 2 061 cM.

**Etap II.** Badania nad określeniem regionów QTL na sporządzonej mapie truskawki obejmowały: a) ocenę czystości genetycznej mieszańców z otrzymanej w 2020 roku subpopulacji I, b) ocenę korelacji fenotypowo-genotypowych w subpopulacjach badanych w latach 2014 - 2020 (A - I), c) analizę terminalną i zagęszczenie wytypowanych grup sprzężeń.

(a) Status mieszańca z planowanego zapylenia dla wszystkich 132 siewek z populacji I został potwierdzony w testach molekularnych (analiza polimorfizmu DNA po amplifikacji z 5 oligonuleotydami mikrosatelitarnymi).

Na podstawie analizy rozkładu alleli markerów SSR w roślinach populacji 'Elsanta' x 'Senga Sengana' poddanych ocenom fenotypowym w latach 2014-2020 określono b) stopień korelacji genotypowo-fenotypowych. Na tej podstawie w genomach obu odmian zidentyfikowano regiony QTL sprzężone z wszystkimi badanymi cechami. Niemniej jednak stopień korelacji pomiędzy wartością cechy a loci zmapowanych markerów w zidentyfikowanej grupie sprzężeń był zróżnicowany. W przypadku cechy jędrności istotną korelację odnotowano w LG 2 genomu odmiany 'Elsanta', LG 5 genomu odmiany 'Senga Sengana' oraz w LG 4 genomów obu odmian. W przypadku zawartości kwasu askorbinowego w owocach obu odmian największy stopień korelacji odnotowano dla markerów zlokalizowanych w LG 3, 4 oraz 7. Dodatkowe regiony zawierające stosunkowo niski, ale istotny stopień korelacji zidentyfikowano w LG 1 i 2 genomu odmiany 'Senga Sengana'. Ponadto dla cechy zawartości ekstraktu w soku z owoców truskawki oszacowano wysoki stopień korelacji w LG 6 i 7 genomów obu badanych odmian.

Dawcą alleli skorelowanych z cechą tolerancji na stres niskich temperatur i deficyt wody okazała się odmiana 'Elsanta', a markery regulujące stopień reakcji roślin truskawki na ww. czynniki zidentyfikowano w LG 2, 5 i 7 jej genomu. Niski, ale istotny stopień korelacji dla tych samych cech oszacowano dla markerów zlokalizowanych w LG 2 i 5 genomu odmiany 'Senga Sengana'. Natomiast dla cechy tolerancji na wysoki stopień zasolenia gleby zidentyfikowano istotną zależność pomiędzy markerami zlokalizowanymi w LG 2 i 7 genomu odmiany 'Elsanta', a wartością ocenianą w populacji reakcji na zastosowanie wysokiej dawki nawozu.

W przypadku ocenianej cechy odporności na porażenie *Sphaerotheca macularis* (sprawca mączniaka prawdziwego) istotny stopień korelacji odnotowano dla markerów zmapowanych w LG 3 genomu odmiany 'Elsanta' oraz LG 1 genomu odmiany 'Senga Sengana'. Markery zlokalizowane w LG 1 genomów obu badanych odmian wykazały również wysoki stopień korelacji z odpornością na porażenie *Colletotrichum acutatum* (sprawca antraknozy), a zmapowane na LG 4 były istotnie powiązane z wartością cechy odporności na *Mycosphaerella fragariae* (sprawca białej plamistości). Dość istotnie skorelowane z odpornością na ten patogen okazały się również markery zlokalizowane w LG 2 genomu odmiany 'Elsanta'. Regiony o wysokim współczynniku korelacji z cechą odporności na werciliozę oraz zgniliznę korony korzeni truskawki zidentyfikowano w LG 3 genomów obu odmian, natomiast dodatkowe fragmenty QTL sprzężone z regulacją odporności na porażenie przez *Verticillium dahliae* oraz *Phytophthora cactorum* zidentyfikowano w LG 1, 2, 6 i 7 u odmiany 'Senga Sengana' i w LG 4 i 5 u odmiany 'Elsanta'.

Na podstawie przeprowadzonej wielosezonowej oceny jakości owoców zidentyfikowano potencjalne markery (FVH4040, FVH4010, CHFvH193, CX661428, CHFv2013, DY676211, EX662245, EX66240, CHFv028) regulujące parametry ich jakości wewnętrznej (dane z sezonów 2016-2020), dla których odnotowano sezonowo - stabilną wartość współczynnika korelacji. Markery te mogą stanowić bazę dla selekcji nowych genotypów produkujących wysokiej jakości owoce truskawki, uzyskanych w programach hodowlanych.

(c) Analizę terminalną wybranych regionów QTL przeprowadzono na podstawie oceny segregacji 72 alleli zidentyfikowanych dla 30 markerów SSR, różnicujących analizowane formy rodzicielskie. Loci segregujących alleli polimorficznych zidentyfikowano w obrębie dziewięciu (247 cM), w przypadku odmiany 'Elsanta' oraz dziewięciu (192 cM) w przypadku odmiany 'Senga Sengana', zmapowanych fragmentów pochodzących z chromosomów *Fragaria*. Uzyskany region genomu odmiany 'Elsanta' – zawiera 38 alleli, a genomu odmiany 'Senga Sengana' – zawiera 32 allele markerów SSR.

#### Podsumowanie projektu i opis najważniejszych osiągnięć:

Badania genetyczno – hodowlane populacji 'E x SS' pozwoliły na określenie charakteru dziedziczenia ważnych cech gatunku *Fragaria*. Zaobserwowano, że nośnikiem cennych alleli cech odporności na choroby jest odmiana 'Elsanta', natomiast jakości owoców - 'Senga Sengana'. Ponadto, zidentyfikowano markery jakości owoców, o sezonowo - stabilnej wartości współczynnika korelacji. Mogą one być przydatne do selekcji genotypów produkujących wysokiej jakości owoce truskawki, uzyskanych w programach hodowlanych.

#### **Załącznik 1. Publikacja naukowa opublikowana w Biuletynie IHAR:**

Keller-Przybytkowicz S., Masny A., Idczak B., Strączyńska K., Abdel-Rahman Moustafa Abdel-Wahab Mohamed. (2020). Przygotowanie populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana' dla analizy regionów QTL sprzężonych z wybranymi cechami użytkowymi gatunku *Fragaria*. Biuletyn IHAR 291: 3–19, DOI:10.37317/biul-2020-PB80



## 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’ suitable for analysis of QTL regions linked to selected *Fragaria* traits.

Sylvia Keller-Przybytkowicz<sup>1</sup>, Agnieszka Masny<sup>1</sup>, Bogusława Idczak<sup>1</sup>, Krystyna Strączyńska<sup>1</sup>, Abdelrahmen Mostafa Abdelwahab Mohamed<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Minia University, Faculty of Agriculture, 61517 Elminia, Egypt,

✉ e-mail: sylvia.keller@ihort.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 zapylania. 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’ x ‘Senga Sengana’ poszerza bazę do dalszej lokalizacji genów i identyfikacji regionów QTL sprzężonych z wybranymi 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 tworząca 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. mroź, 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 świadomą 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 (Denoyer-Rothan i in. 2004, 2005, Sargent i in. 2011, Sargou i in. 2012).

Na podstawie doświadczeń genetyczno-hodowlanych stwierdzono zarówno monogeniczny (odporność na fytoftorozę i alternariozę), jak i poligeniczny charakter dziedziczenia cech użytkowych truskawki (Lercoteau-Köhler i in., 2002). W wyniku addytywnego (poligenowego) współdziałania genów na 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 sporządzenie 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 wytyczenia map genetycznych. Właściwy dobor 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 (*K. dollfus*, *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 mieszańcowa, 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 potomane (200 roślin), stanowiące populację mapującą, w fazie minimum dwóch liści przesadzono do tac wielodoniczekowych (34 komórki o wymiarach 55 × 55 × 62 mm i objętości 90 cm<sup>3</sup>). Rośliny utrzymywano w szklarni. Następnie uzyskane młode siewki wysadzono w kwatery polowej. Systematycznie prowadzono prace uprawowo-pielęgnacyjne, jak nawadnianie i nawożenie uzyskanych roślin, spalczanie podłoża oraz zwalczanie chorób i szkodników (Program Ochrony Roślin, opryski na mączniaka; Signum 33 WG, przędziorka chmielowca; Nissorum Strong 250 SC oraz inne szkodniki i patogeny zagrażające uprawie), obejmujące zarówno formy rodzicielskie, jak i mieszańce  $F_1$ .

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

Isolacje genomowego DNA form rodzicielskich 'Elsanta' i 'Senga Sengana' oraz 200 roślin populacji mapującej przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Doyle i Doyle (1990). Tkaninę liściową (0,2 g) ucięto w ciepłym 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 mieszało 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. Części RNA wytrawiono stosując RNazę A (10 µg ml<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup>).

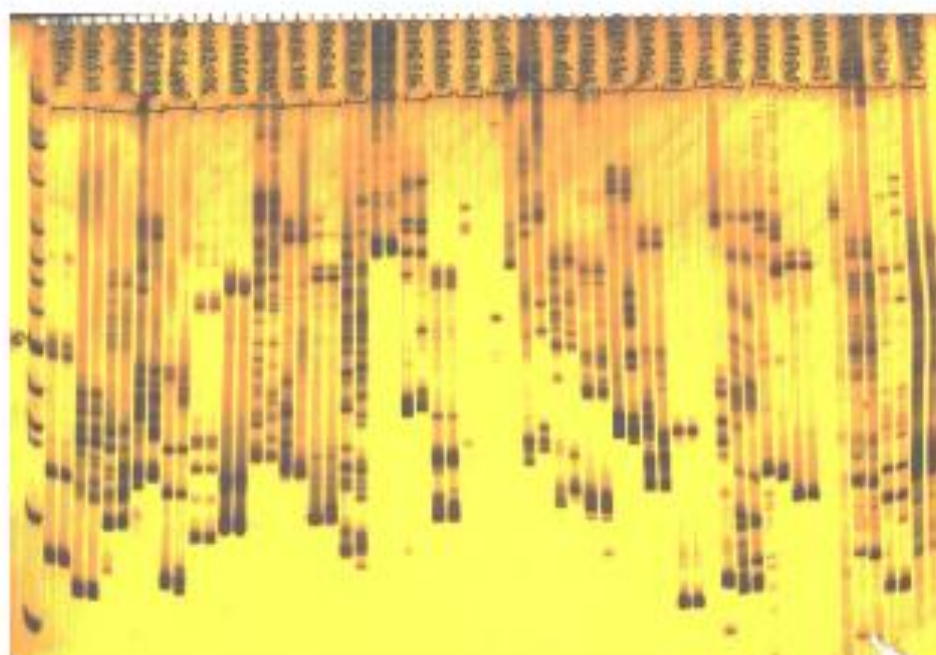
#### Amplifikacja alleli polimorficznych (SSR-PCR)

W oparciu o bazę sekwencyjną GDR (Genome Database for Rosaceae, [www.rosaceae.org](http://www.rosaceae.org)) dla rodzaju *Fragaria* oraz na podstawie dostępnych danych literaturowych, zsynetyzowano i przetestowano w reakcjach PCR, 450 par starterów mikrosatelitarnych.

Mieszana 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 MgCl<sub>2</sub>, 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](http://www.rosaceae.org)) oraz opisanych dla map genetycznych dzikich gatunków *F. nubicola*, *F. vesca* oraz odmian 'Redgauntlet' i 'Hapii'.



Rys. 1. Wzory prążkowe (reprezentują parę obu form rodzicielskich) przedstawiające wielkości alleli zidentyfikowanych dla 30 przykładowych markerów SSR, różniących genom odmian '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 35°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 końcowa przyłączenie oligonukleotydów prowadzono w stałej temperaturze 55 i 50°C.

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

wartości odchylenia pomiędzy ich rozkładem teoretycznym (mendelowskim) 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 elektroforegramie (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

Tabela 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.	Marker Mol. marker	produkty różnicujące (pb) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Reverse Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
1	FvH4004	480, 600	300, 560	ccagatctccctcccttacc	agttccccccttctttagcc
2	FvH4005	270, 275	-	tccagttacgttgtctcatgg	tgtctgttcaagacccttgc
3	FvH4006	280, 350	270, 315	cgagttctccacttcaattcg	atgagagcttctgtcttggg
4	FvH4009	480	450	tggctgttccagttgaga	cccaagggtctgggtgtaa
5	FvH4014	150, 400	130, 300	tgcctccactctttgacc	ttccctctccaccctgttgc
6	FvH4019	200	220, 600	catctcagttggtctgactcg	ccaggatccaggatcttggc
7	FvH4022	-	200, 560, 565	agttctggaccgtctttagc	cccaagaccctccaccctcc
8	FvH4023	585, 600	-	tactgggggacactgtttgg	gcccctgttaccctctcttgg
9	FvH4025	260	-	gtttcgtttgagaccctatgc	gattgtgcaaggcgtctagg
10	FvH4031	320	-	tctccctctccctccctctcc	agtggggtatgttctctttgg
11	FvH4033	150, 190	110	ctccaccactctctccaccg	gacgacgactcttccaccag

Przygotowanie populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania odmian 'Elsanta' / 'Senga Sengana'...

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.	Mikar Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Reverse Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
12	PvH4041	200, 250	220	ccgtgcctctctctttgatctgg	cgagctcaactctctctctccc
13	PvH4042	280	-	accaggagcctctcaggatccg	aggagctcactctctctctctg
14	PvH4043	250, 260	-	accgctctctctctggggatctgg	ctctcaccctctctctctctg
15	PvH4050	185, 200	210	tggctctctctctctctctctctg	caatcaactctctctctctctcc
16	PvH4052	170, 175	320	ccaggagctctctctctctctctg	gtgctcaaccctctctctctctg
17	PvH4053	-	450	gggggtctctctctctctctctctg	cgcaaacctctctctctctctctg
18	PvH4057	200, 225, 280, 310	225, 240, 300, 380	agcttggaccctctctctctctctg	agctctctctctctctctctctg
19	PvH4058	220	-	gttggagagcctctctctctctctg	gggactctctctctctctctctg
20	PvH4059	450	-	tgcactctctctctctctctctctg	ttgtctctctctctctctctctg
21	PvH4061	-	200	accactctctctctctctctctctg	gcctctctctctctctctctctg
22	PvH4082	-	465	cggtctctctctctctctctctctg	ccctctctctctctctctctctg
23	PvH4083	340, 600	300, 470	acttggggctctctctctctctctg	gtctcaactctctctctctctctg
24	PvH4085	-	600	accctctctctctctctctctctg	tgtctctctctctctctctctctg
25	PvH4088	-	400, 450	ctctctctctctctctctctctctg	tggagagctctctctctctctctg
26	PvH4090	320	320	ccgtctctctctctctctctctctg	agcttctctctctctctctctctg
27	PvH4091	220, 300, 400	200	ctccctctctctctctctctctctg	taactctctctctctctctctctg
28	PvH4102	600	610	tctctctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg
29	PvH4104	240, 250	510	agactctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg
30	PvH4105	-	320, 320	cgctctctctctctctctctctctg	taactctctctctctctctctctg
31	PvH4106	155, 215	220	tccctctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg
32	PvH4112	265, 320, 330	210, 460	tctctctctctctctctctctctctg	gcctctctctctctctctctctctg
33	PvH4113	125	110	tgtctctctctctctctctctctctg	ccctctctctctctctctctctctg
34	PvH4114	200, 380, 400	-	gctctctctctctctctctctctctg	gtctctctctctctctctctctctg
35	PvH4116	280, 405	380	ggactctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg
36	PvH4117	285, 305	300	actctctctctctctctctctctctg	gagctctctctctctctctctctg
37	PvH4121	400	-	tccctctctctctctctctctctctg	gtctctctctctctctctctctctg
38	PvH4123	240	245	gtctctctctctctctctctctctg	gggactctctctctctctctctctg
39	PvH4124	240, 285	385	gctctctctctctctctctctctctg	accctctctctctctctctctctg
40	PvH4127	180, 200, 385	170, 195, 485	accctctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg
41	PvH4131	135	-	cgactctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg
42	PvH4134	100	-	agctctctctctctctctctctctg	gtctctctctctctctctctctctg
43	PvH4136	190, 380, 600	-	tctctctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg
44	PvH4145	205, 280, 410	300, 420	actctctctctctctctctctctctg	gtctctctctctctctctctctctg
45	ChPaM 149	-	165, 595, 600	ccctctctctctctctctctctctg	cgactctctctctctctctctctctg
46	ChPaM 262	400	-	actctctctctctctctctctctctg	agactctctctctctctctctctctg
47	ChPaM 232	320	320	gtctctctctctctctctctctctg	tctctctctctctctctctctctg
48	ChPaM 243	320	340	tctctctctctctctctctctctctg	accctctctctctctctctctctg
49	ChPaM 245	-	510	tctctctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg
50	ChPaM 269	410	-	tctctctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg
51	ChPaM 210	200, 580	210	tctctctctctctctctctctctctg	gtctctctctctctctctctctctg
52	ChPaM 211	95, 300, 360	80, 90, 210, 270	tctctctctctctctctctctctctg	cgactctctctctctctctctctctg
53	ChPaM 217	80, 90, 160, 250, 285	415	ctctctctctctctctctctctctg	ctctctctctctctctctctctctg

Tabela 1 cd.  
Table 1 cd.

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

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

Lp. No.	Marker Mol. marker	produkty różnicujące (pb) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Reverse Primer
		Elzanta	Senga Sengana		
54	ChPaM 022	183, 200, 493	-	gggcacatcactactctctta	tggccttggagacttggat
55	ChPaM 026	100	-	tgtctctctgtttctctctctt	atctagctctctctctctct
56	ChPaM 030	300, 335	-	ccatgagcagtgagctca	agcattctctctctctctct
57	ChPaM 031	300, 310	200, 210	gtctgctctctctctctct	ctggctctctctctctctct
58	ChPaM 032	-	410	ggctcctctctctctctct	ctctgctctctctctctct
59	ChPaM 033	110, 305	113, 310	ccctctctctctctctctct	ccctgctctctctctctct
60	ChPaM 036	130	135	ggcctctctctctctctct	ccctctctctctctctctct
61	ChPaM 037	503	-	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
62	ChPaM 040	-	203, 300	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
63	ChPaM 041	183	180, 280, 490	ccctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
64	ChPaM 044	170, 613	163, 310, 410, 583	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
65	ChPaM 046	193, 300, 310	-	ccctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
66	ChPaM 047	233	200, 213, 340, 340	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
67	ChPaM 056	193, 260	263, 310, 690	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
68	ChPaM 058	140, 193, 203, 310, 300, 420, 500	550, 560, 580	ggcctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
69	ChPaM 060	163, 550, 560, 580	280, 590, 610	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
70	ChPaM 063	120, 300	123, 193	ggcctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
71	ChPaM 064	283	190, 300	ccctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
72	ChPaM 065	220, 343, 250, 363	200, 250	ggcctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
73	ChPaM 066	110, 290	113, 280, 310, 380	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
74	ChPaM 068	420	200, 403	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
75	ChPaM 070	280, 630	-	ggcctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
76	ChPaM 072	383	-	ggcctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
77	ChPaM 077	250, 310, 400, 440	270, 300, 393, 410	ggcctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
78	ChPaM 078	243, 283, 290, 300, 313, 390, 410	233	ggcctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
79	ChPaM 080	330, 560	140, 340	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
80	ChPaM 081	-	293, 300, 310, 340, 413	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
81	ChPaM 082	230, 233	220, 243	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
82	ChPaM 083	220, 250	-	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
83	ChPaM 086	280	123	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
84	ChPaM 088	660	140	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
85	ChPaM 092	110	-	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
86	ChPaM 093	283, 290, 300, 390, 393	-	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
87	ChPaM 094	180	173, 183	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
88	ChPaM 095	210	-	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
89	ChPaM 097	273, 323, 250, 400, 450, 470	263	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
90	ChPaM 098	303, 493, 520	203, 213	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
91	ChPaM 100	100, 170	120, 190	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct
92	ChPaM 101	130, 300	220, 240, 320	ctctctctctctctctctct	ctctctctctctctctctct



Przygotowanie populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania odmian 'Elsanta' / 'Senga Sengana'...

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.

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

Lp. No.	Marker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Reverse Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
93	ChPm 105	170, 180	160, 175	ccctccaccaccaccacc	ctgaggcttatgaggact
94	ChPm 106	170, 190, 230, 335	130, 410	accaccaggaggagagag	cgctctctgaccctctc
95	ChPm 107	-	500	tgcaccaccaccaccagtga	catctcgtctctctctagg
96	ChPm 108	520	170	ctgggagagagagagagag	cgaggatgaggaggactc
97	ChPm 109	-	420, 450	agctctctctctctctctct	ggctctctctctctctct
98	ChPm 110	310, 605, 615	-	ttctctctctctctctctct	cagagagagacatttggc
99	ChPm 111	145, 180	135	gcccaccagagctctctct	cggctctctctctctctct
100	ChPm 112	485	485	ctcagctctctctctctctct	catctctctctctctctct
101	ChPm 114	-	145, 275, 495	tgctctctctctctctctct	cgctctctctctctctct
102	ChPm 115	480, 490	280, 385	ccctctctctctctctctct	accaccctctctctctct
103	ChPm 120	130, 300, 310, 420	255, 300, 320, 330	ggctctctctctctctctct	ctcagctctctctctctct
104	ChPm 122	245, 255, 260	-	gactctctctctctctctct	tgctctctctctctctct
105	ChPm 126	270	-	gttgggagctctctctctct	ctcaccctctctctctct
106	ChPm 129	195	-	agctctctctctctctctct	tgctctctctctctctct
107	ChPm 130	240, 260, 300	195, 310	gcccctctctctctctctct	tgctctctctctctctct
108	ChPm 144	390	-	ccctctctctctctctctct	cgagctctctctctctct
109	ChPm 146	170	150, 155	ccgggagagagagagagag	agctctctctctctctct
110	ChPm 147	350, 360	-	ccgggagagagagagagag	ccgggagagagagagag
111	ChPm 148	-	210	ccctctctctctctctctct	ctctctctctctctctct
112	ChPm 151	300	-	accaccctctctctctctct	accaccctctctctctct
113	ChPm 159	285	-	ctctctctctctctctctct	accaccctctctctctct
114	ChPm 160	-	300, 400	ccctctctctctctctctct	ctctctctctctctctct
115	ChPm 161	210, 510, 615	270	cgaggctctctctctctct	gggggagagagagagag
116	ChPm 163	150, 265	135	tgggctctctctctctctct	ctcaccctctctctctct
117	ChPm 164	235	200	ccctctctctctctctctct	ggcctctctctctctctct
118	ChPm 174	140, 175	160, 195	gagggagagagagagagag	ctcaggctctctctctct
119	ChPm 177	245, 265, 400	-	ccctctctctctctctctct	ccctctctctctctctct
120	ChPm 178	165, 200, 325	320	accagagagagagagagag	agctctctctctctctct
121	ChPm 184	-	175, 195	ccctctctctctctctctct	ccctctctctctctctct
122	ChPm 186	-	305	ccctctctctctctctctct	agagctctctctctctct
123	ChPm 203	480	-	cgaggctctctctctctct	tgctctctctctctctct
124	ChPm 209	-	295	cccccaccctctctctct	ctctctctctctctctct
125	ChPm 028	168, 505	170, 507	atggctctctctctctctct	cagctctctctctctctct
126	ChPm 049	-	500, 505	atggctctctctctctctct	ctctctctctctctctct
127	ChPm 067	280, 295	300	gagggagagagagagagag	tgggagagagagagagag
128	ChPm 125	-	150, 520	gagctctctctctctctct	ctctctctctctctctct
129	ChPm 140	-	185	ccctctctctctctctctct	cgctctctctctctctct
130	ChPm 181	175	155, 165	ggagagctctctctctctct	acgtctctctctctctct
131	ChPm 182	400, 435, 515	470	ggaccaccagagagagag	ggggagagagagagagag
132	ChPm 184	255	255, 340, 340, 350, 600	gactctctctctctctctct	ttcagagagagagagag
133	ChPm 191	245, 535	255, 285, 300, 330	ccagagagagagagagag	ggtctctctctctctctct
134	ChPm 192	-	265, 275, 450	tgaggctctctctctctctct	ttcagagagagagagag

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.	Mikar Mol. number	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Reverse Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
135	ChPvM 193	-	140	catcagaccctcaactcaatcag	tactgcaggagatgtaacac
136	ChPvM 201	-	245, 285, 325, 335	tgcttcaactcagcagcagaac	ctcagcaggcagatcctct
137	ChPvM 202	225, 235	-	caagggctcagctatctctc	aggatctcagctcagagaca
138	ChPvM 205	220	125, 185	ggagaccctctcaggatctt	caacccaacactcactt
139	ChPvM 210	-	185, 265, 340	tcaccactttctctctt	gttgcttctctctcagagca
140	ChPvM 212	150, 170, 190	195	caactctcaaggctctctcc	acggaggaggagagatct
141	ChPvM 213	195, 245, 330, 350, 450	280	aacctcaggaggctgaacc	ataccagggttgactctgt
142	ASW06432	250, 270, 290, 300, 370	-	tgatctcagagagtgatcga	aggggacctcggaggctgaca
143	CO378933	150, 500	-	cgaggcttgctctcgtctg	caagccttgcacacctct
144	CO379009	105	-	tgctatggagagagaggagg	ctgcaccacacttggctta
145	CO379012	-	145	caaggagctgttgaacac	acccaacacacagctctg
146	CO379659	250, 400	140, 200	agggaggagcctacttagag	tatcctcagatctcagcct
147	CO380151	-	150	cgagggttgatcagctctg	aacctgctcacaggccaac
148	CO381174	275	445, 455	ccacagataggagacagagc	tcaggagcatgatcaatcag
149	CO381539	272	270, 265	gtctgcacctctcagctac	ctgtctgctcctggcaactc
150	CO381605	-	300	caacaccttacccttcaac	caatctcagagagcaacct
151	CO381897	230	-	agaggctcaggatctcagctg	ggcaactcaactgctcaacac
152	CO382008	-	125, 145, 385	gacctgtctctctctctctg	atgcctcagctctcagctctt
153	CO816733	275, 300, 400, 480, 570	310, 350	tcaccacactctactctcc	atctcagcaggtctcagcct
154	CO816836	-	205	cgaggagagacactcaact	ggacgctcctctctctctgga
155	CO816840	270, 340	150, 215, 295, 305	cagccttgatctctcgttga	caatgacactctctcctt
156	CO816936	300	380, 520	tctctcagctctctcagca	caatcagctctctctctc
157	CO817094	220, 240	225	ctctcagcctcagagctgg	acgacacactcagcaccagg
158	CO817138	250	285, 500, 590	tgaacacttctctctctggc	tcaggcctcagacactctg
159	CO817185B	195, 400, 510, 585	240, 500	tcctcactctggagctagg	catctactctgcaaccagca
160	CO817242	-	150, 520, 525	atctcaccactctctcaacc	ctcctcagctctctctctcc
161	CO817330	-	270, 405, 430, 505, 510, 550	gcttactggctctctctctc	gtggactctcagctctctct
162	CO817344	285, 295	260	gcttccactctctcaactc	gtcactttcagctctctct
163	CO817505	120, 280	-	tcctcagcctcagctctctg	cactctgcagcagagcaac
164	CO817509	150, 140, 195	215	tcaccgtctctctctctcaac	cgataggagacatgagccag
165	CO817772	-	500	tcacacccagcagcttctag	ttttctctctcctctctct
166	CO817850	-	300	gtctttagcagactctgggt	tactgcacagactcagcct
167	CO817919	270, 280	-	cagactcaaccggcttact	cgctagctttctctctct
168	CO818131	250, 315	265	actctctcagacacactct	gggtctaggctctcagagca
169	CX661091	180	235	agcctctcactctctctcag	atgagcctcagactcagctg
170	CX661274	-	215	tatcaacactctcagcctctc	taagcagctctctctctcag
171	CX661428B	295, 330	-	gagcctcagctctctctctg	ctctctcagcctcagactctc
172	CX661749	-	500	tacttttctctctctctcc	actctcaccacacacacac
173	CX661752	-	145, 175	actctcactctcactctcag	ttgggtctcagctctcagctc
174	CX661843	245, 315	-	ctcctctcagctctctctcag	ttgacagcagcagctctctg

Przygotowanie populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana'...

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.	Mikar Mol. number	produkty różnicujące (pb) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Reverse Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
175	CX661893	-	190, 610	ogggfctctactctctctg	gcccctagacagggcctagat
176	CX661893A	100	-	gtggccatggactctctcc	actgcgagcaggtctctga
177	CX662065	170, 495	-	ccgagagcccgacacggga	agcgagagagagagcgatg
178	CX662065A	-	190, 235, 360, 500	atgacacccgacacctctc	gagtggttggatggagact
179	CX662153	115, 120, 175	130	gaaactcccgagatctcc	ctctgggttagctgagat
180	CX662162	290, 505	-	taaccatgaaagttgac	atgacagagcggccagaaa
181	CX662184	155	145, 160	acgtctctctctctctcc	gagagagatgtagggagg
182	CX662207	265, 285, 390	310	agccgacggctgagatgag	atccaggtcaagccactctc
183	CX662235	220, 255, 340, 345	-	ctctctctcccccctctaa	gtgctctctctctctctctg
184	FeA 108	150	-	acatagagaccccactctcc	gctagccctatagagcagta
185	FeA 110	185, 245	255, 265	caactctctctgactctctc	actgactctgactctctctct
186	FeA 114	120, 270, 315	150, 295	atggctctctgactctctc	ggcctaggatctgactctctc
187	FeA 115	98, 370, 450	100, 445	acatgtctctctctctctga	gggaaacccagaaactctcc
188	FeA 117	110, 295	-	cccttctctctctctctctc	gttagggctctctctctctc
189	FeA 119	280, 400	120, 150, 265	gacctgtgactcagaaag	ccctctctctctctctctctg
190	FeA 123	-	310	gaaatgtgtctctctctctg	agctctctctctctctctctc
191	FeA 125	420	-	ctccagggtctctctctctc	cagaaatcccccctctctctc
192	FeA 127	95, 215	195	ctctctctctctctctctctc	acaggagctctctctctctctc
193	FeA 129	145	-	gaaagagctctctctctctc	actggctctctctctctctc
194	FeA 2	250, 270	255, 262	gtctctctctctctctctctc	ctctctctctctctctctctc
195	FeA 5	120	85, 135	agggagagagagagagagtg	acactctctctctctctctctc
196	FeA 7	-	590	cagtgagactctctctctctc	gactctctctctctctctctc
197	FeA 9	570, 590	610	gagggtctctctctctctctc	aaacctctctctctctctctc
198	FeB 1	290, 315, 450, 480	620	agagcagagagaaactctctc	ctctctctctctctctctctc
199	FeB 101	175, 195, 400, 485	120	taagctctctctctctctctc	ctgtctctctctctctctctc
200	FeB 108	300, 455, 495	130, 215	gattctctctctctctctctc	gaggctctctctctctctctc
201	FeB 110	215, 225	-	ctctctctctctctctctctc	ctctctctctctctctctctc
202	FeB 111	270, 275, 290, 520	190, 195	ttaggtctctctctctctctc	agagagccctctctctctctc
203	FeB 112	165, 195, 205, 285, 600	290, 335, 250	ggcctctctctctctctctc	caacctctctctctctctctc
204	FeB 113	-	230	tgccctctctctctctctctc	agaaagctctctctctctctc
205	FeB 116	200	215, 225	ctctctctctctctctctctc	gctctctctctctctctctc
206	FeB 119	330, 365	380, 390	acactctctctctctctctc	ctctctctctctctctctctc
207	FeB 120	220, 240	-	ctctctctctctctctctctc	gactctctctctctctctctc
208	FeB 123	-	340, 370, 390	gaaactctctctctctctctc	ggttctctctctctctctctc
209	FeB 124	190, 220, 250, 280	205, 240	agcctctctctctctctctctc	agaaagggctctctctctctc
210	FeB 126	125	110, 180	gagctctctctctctctctc	ctgtctctctctctctctctc
211	FeB 127	420, 500	245, 270	ctctctctctctctctctctc	gactctctctctctctctctc
212	FeB 129	510, 550	-	gctctctctctctctctctctc	gagagaggggctctctctc
213	FeB 132	220, 250	260	aggtctctctctctctctctc	gactctctctctctctctctc
214	FeB 2	250, 340, 350	600	ttaggctctctctctctctctc	agagagagctctctctctc
215	FeB 8	280, 300, 400, 420	275, 290, 320, 410	ggtctctctctctctctctctc	ctctctctctctctctctctc

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.

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

Lp. No.	Marker Mol. marker	produkty różnicujące (pa) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Reverse Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
216	FvC 10	293, 350, 380	255, 285, 300, 460	ccctcctgctgctctctctctc	gcaatttcgattctctctgag
217	FvC 103	260, 215, 250, 395	-	tcctccacctccacctctctc	cgattctctgtccctctctg
218	FvC 105	270, 350	-	gggtgctcagctctccag	actcgtattctgttctccag
219	FvC 107	205, 400	180	ggcaattctcctgctgctccag	gctgtgctctcttggagctctc
220	FvC 108	275	345, 255, 495	tcctcgtgctcctgtctcag	agctctctctgtgtgagctctgag
221	FvC 109	165, 210, 520, 580	280	agggcggactgctgctctctg	agcctctctctggcaattctcc
222	FvC 110	420	430	ctgtctctctctctctctctc	gtctctctctctctctctctg
223	FvC 111	215, 260, 270, 390, 340, 415	200, 240, 315, 400	caattctctgcccctctctc	caactctgtctctctctctctca
224	FvC 112	145, 160, 170	147, 150, 280	ggctcgaattgctggactctg	aggctcgtctctctctctctg
225	FvC 113	220, 250, 260, 270	180	ccctctctctctctctctctc	ggcctcctctctctctctctg
226	FvC 12	-	190, 250	ggagctcagctgctctctctg	gggtcattctctgtctctctctc
227	FvC 122	320, 385	300	tctctctccctctctctctctc	ccagctccctctctctctctctc
228	FvC 123	170	140, 250	gacccctctctctctctctc	caactcctctctctctctctg

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 tests markers	liczba par starterów testowa- nych z danej grupy Number of primer pairs test- ed 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 od- miany Number of polymorphic PCR products	
			Elsanta	Senga Sengana
FvE	151	44	60	32
ChFvM	133	97	178	133
CO	48	27	35	42
CX	33	15	20	16
FvA	29	14	23	17
FvB	27	18	45	20
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.

*Analiza populacji mapującej. Użytkowana mapa genetyczna badanych genomów.*

Do badań wycoznaczono matryce DNA wyizolowane z genomów form rodzicielskich,

dla których potwierdzono wysoki poziom zróżnicowania 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 37 grup sprzężeń (LG, *Linkage groups*), wykazujących wysoki stopień homologii do: chromosomów II i VI (LG2 i LG6 obejmowały homologi a-d), chromosomów I, III i VII (LG1, LG3 i LG7 obejmowały homologi a-c) oraz chromosomów IV i V (LG4 i LG5 obejmowały homologi 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 sprzęt. 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	EMFp049	PvC103	19	znoczp	0,8	3:1
	EMFp049	COBRA	25	znoczp	2,2	3:1
	PvC103	COBRA	6	mbdl	7,8	3:1
LG1B	COBRA	COB17054	24,3	znoczp	0,3	3:1
	COB17054	PEPv14-29	20,7	mbdl	4,9	3:1
LG1C	BFACT003	PvH4171	21,7	mbdl	0,2	3:1
	PvH4171	ARSFL002	28,3	znoczp	0,6	3:1
	BFACT003	ARSFL002	50	znoczp	10,4	3:1
LG2A	ARSFL012	CFVCT015	30	abcaab	3,0	1: 2: 1
	ARSFL012	BFACT002	42	abcaab	3,5	1: 2: 1
	CFVCT015	BFACT002	12	znoczp	0,4	3:1
LG2B	EMFp214	CFACT111	34,3	mbdl	3,5	3:1
LG2C	BFACT002	ARSFL015	18,4	mbdl	0,1	3:1
LG2D	PvH4173	CFVCO316	24,3	mbdl	1,7	3:1
LG3A	UDF0001	PvH4161	18,4	znoczp	4,3	3:1
	UDF0001	PvH4155	26,6	mbdl	0,2	3:1
	UDF0001	PvH4177	46,4	mbdl	0,4	3:1
	UDF0001	PvH4165	70,7	mbdl	2,1	3:1
	PvH4161	PvH4155	8,2	znoczp	0,2	3:1
	PvH4161	PvH4177	28	znoczp	0,0	3:1
	PvH4161	PvH4165	51,6	mbdl	0,8	3:1
	PvH4155	PvH4177	19,8	mbdl	0,7	3:1
	PvH4155	PvH4165	43,4	znoczp	2,3	3:1
	PvH4177	PvH4165	23,6	mbdl	2,6	3:1
LG3B	PvH4169	BFACT036	44,3	mbdl	0,4	3:1
LG3C	PvH4163	PvH4153	36	znoczp	3,3	3:1
	PvH4163	BFACT045	68	znoczp	1,8	3:1
	PvH4153	BFACT045	32	abcaab	5,8	1: 2: 1
LG4A	EMFp132	PvH4164	34,3	abcaab	0,3	1: 2: 1
	EMFp132	PvH456	42	abcaab	3,6	1: 2: 1
	PvH4164	PvH4156	8	znoczp	0,4	3:1
LG4B	COB16733	EMFp007	21,7	znoczp	0,0	3:1

Tabela 3

Table 3

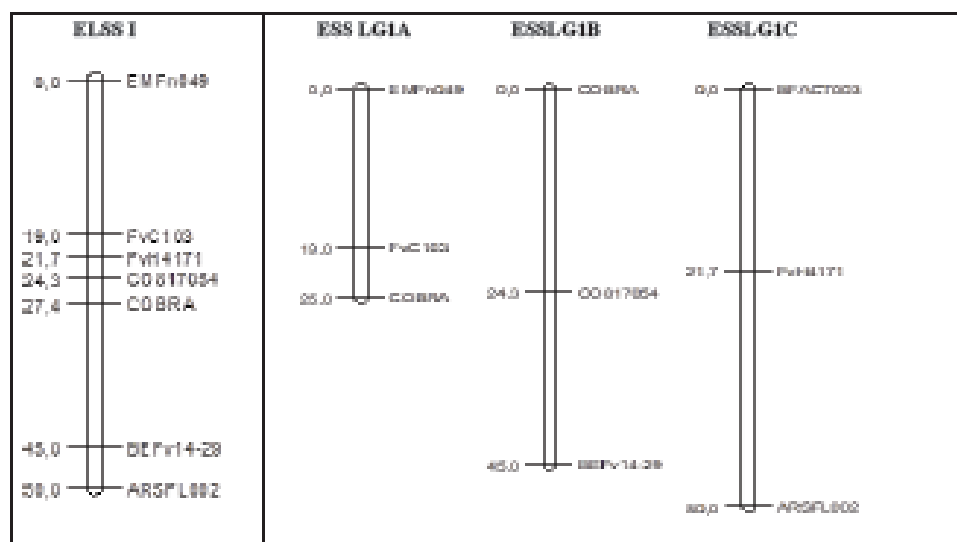
Wyniki analizy rozkładu alleli i frekwencji rekombinacji w populacji mapującej oraz dystans genetyczny zidentyfikowanych loci markerów SSR.

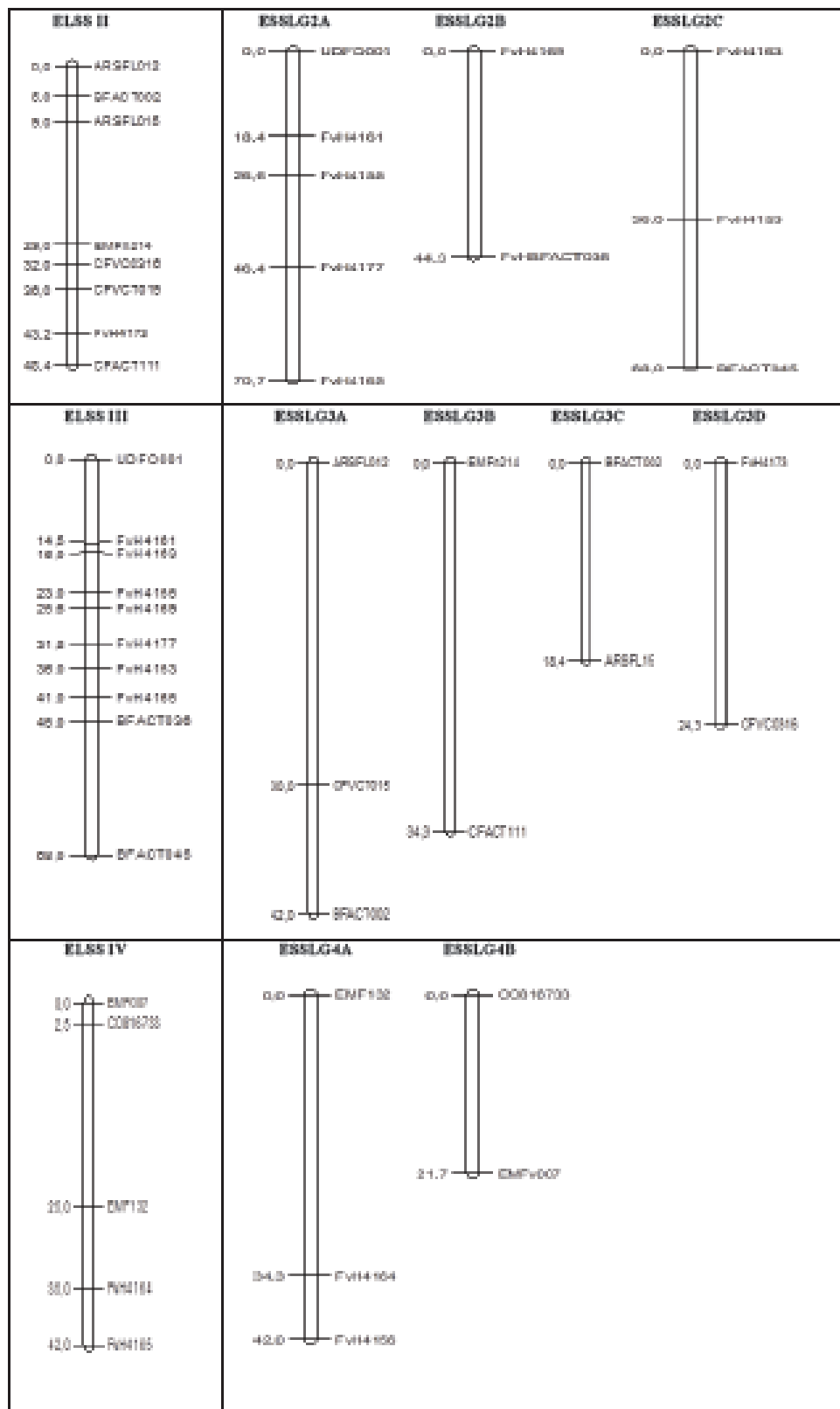
Allele distribution, recombination frequency in the mapping population and genetic distance of identified SSR markers.

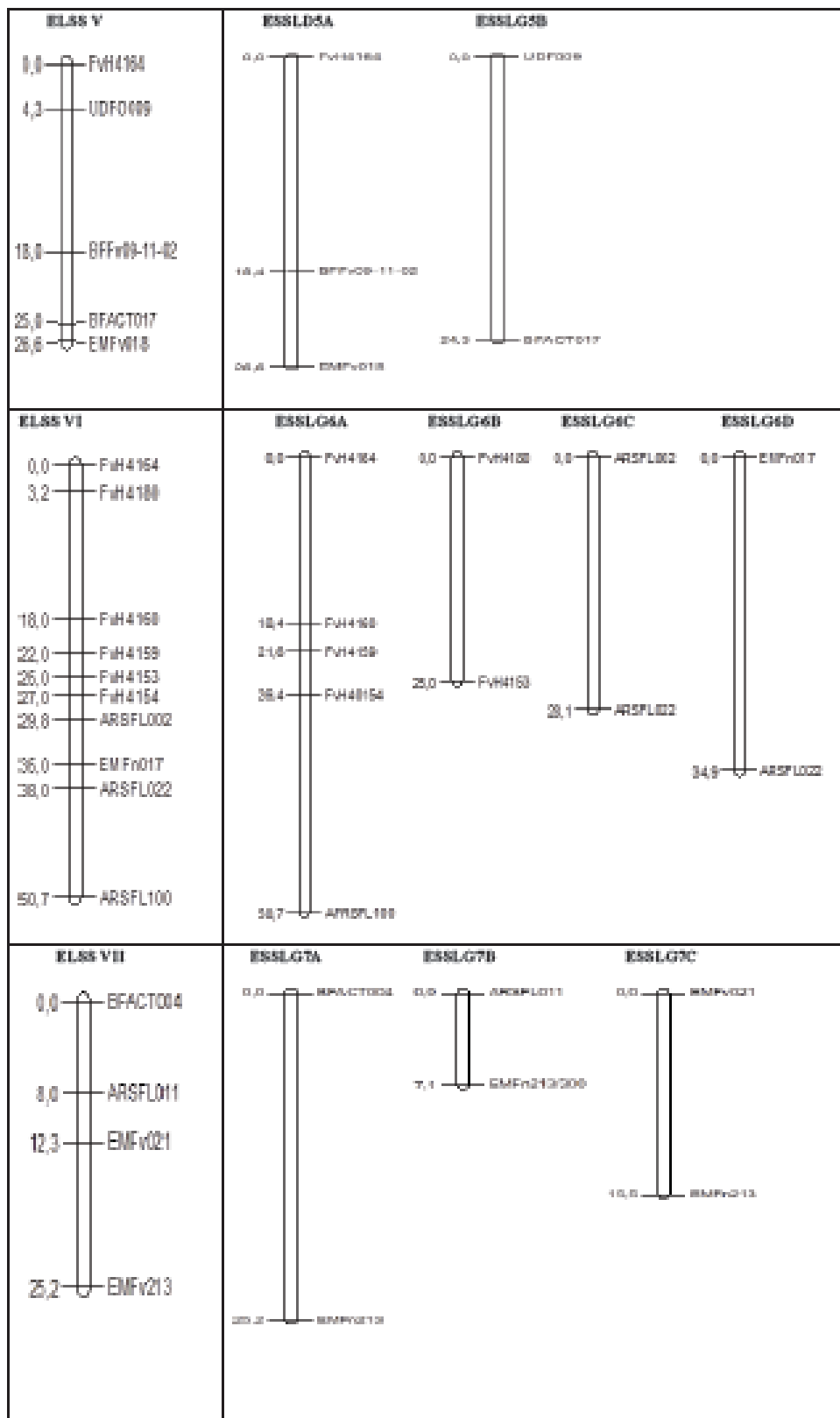
Grupa sprzęt. Linkage group	Locus1	Locus2	Frekwencja rekombinacji/odległość mapowa (cM) Recombination frequency (cM)	Typ segregacji alleli w populacji Segregation type of alleles	Test X2 Chi-square test	Rozkład alleli w populacji Alleles distribution in mapping population
LG5A	PcH4144	BFPv09-11-02	18,4	nsocp	4,1	3:1
	PcH4144	EMFv018	26,6	mixil	0,2	3:1
	BFPv09-11-02	EMFv018	8,2	mixil	3,5	3:1
LG5B	UDF009	BFACT017	24,3	nsocp	1,7	3:1
LG6A	PcH4144	PcH4149	18,4	mixil	12,6	3:1
	PcH4144	PcH4159	21,6	nsocp	2,0	3:1
	PcH4144	PcH4154	26,4	nsocp	4,9	3:1
	PcH4144	ARSFL100	50,7	mixil	0,5	3:1
	PcH4149	PcH4159	3,2	nsocp	0,3	3:1
	PcH4149	PcH4154	8	mixil	2,9	3:1
	PcH4149	ARSFL100	32,3	mixil	0,6	3:1
	PcH4159	PcH4154	4,8	nsocp	0,1	3:1
	PcH4159	ARSFL100	29,1	mixil	4,3	3:1
	PcH4154	ARSFL100	24,3	abocb	0,6	3:1
LG6B	PcH4180	PcH4143	35	mixil	2,5	3:1
LG6C	ARSFL002	ARSFL022	28,1	abocb	1,1	1:2:1
LG6D	EMFv017	ARSFL022	34,9	nsocp	0,0	3:1
LG7A	BFACT004	EMFv213	25,2	nsocp	2,4	3:1
LG7B	ARSFL011	EMFv213	7,1	nsocp	3,2	3:1
	EMFv021	EMFv213	15,5	mixil	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 (oktopleoidem  $2n=8x=56$ ) (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/Y1Y1Y1Y1'ZZZZ (Rousseau-Gueslin i in. 2009) i AAAAABBCC (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 AAAA'BBB'B' (Brinkhurst 1990) sugeruje udział nawet czterech z nich (A, A', B, B') (Hammer i Jamick 2009).

Skomplikowany układ genomu klasyfikuje truskawkę jako bardzo trudny obiekt dla realizowanych 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. chiloensis* FV × FB, (Sargent i in. 2006, 2007, 2008; Zorrilla-Fontanesi i in. 2011) oraz oktopleoidalnych *F. × ananassa* (Isobe i in. 2013; Sargent i in. 2012; Davik i in. 2015). Mapy te zagęszczone są licznymi markerami mikrosatelitarnymi, które (wzglądając 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 Geisler, 2000; Rungis i in., 2005; Semagnin, 2006; Kole i Abbott, 2008; Myles i in., 2009). Najprostszą metodą uzyskiwania populacji mapującej

jest krzyżowanie heterozygotycznych form rodzicielskich CP (*Cross Polimation*, zastosowana również w mniejszych badaniach), ale zależnie od typu dziedziczenia alleli cech stosowane są również populacje  $F_2$ , BC czy  $F_{2n}$ , wywodzące się z krzyżowania genotypów homozygotycznych (Knapp i in. 1990; Rester i in., 1992; Yu i in., 2000; Philips i Vasil, 2001; Vinod, 2006; Hirtalmani 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 obcożylności występowanie potomstwa z nieplanowanych zapylen (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 Geisler 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 Mendla. Inna definicja zakłada również, że powinny one odzwierciedlać allele każdego z reprezentowanych przez nie genów/fragmentów genomu (Griffiths i in. 1996). W mniejszych 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 oktaploidalnych genomów odmian 'Redguntlet' i 'Hapel' mapa referencyjna zawiera 30 grup sprzężeń (chromosomów homologicznych) (Sargeant 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 agronomiczne cechy gatunku *Fragaria*, przydatnych do wczesnej selekcji genotypów hodowlanych wspierających konwencjonalne metody hodowli poprzez wdrożenie procesu MAS (Marker Assisted Selection) (Sargeant i in. 2012).

Dotychczasowe, przeprowadzone m.in. dla odmian „Hancey” 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, potwierdzona 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 szkielet 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 MRRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja NCR, In.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r. Zadanie nr 74.*

## Literatura

- Bringham, R. S. (1990). Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. *Hortic. Sci.* 25: 879-881.
- Darrow, G. M. (1966). *The Strawberry - History Breeding and Physiology*. The New England Inst for Med. Res.
- Davik, J., Sargeant, D. J., Brueberg, M. B., Lien, S., Kent, M., Alshikh. (2015)a. A dRAD based Linkage map of the cultivated strawberry, *Fragaria ananassa*. *PLOS ONE* 10(9): doi:10.1371/journal.pone.0137746
- Davis, T. M., DiMeglio, L. M., Yang, R. H., Syan, 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., Lercesteu-Kohler, E., Rissler, G. (2005). Inheritance of a race-specific resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria × ananassa*. *Phytopathology* 95: 405-412.
- Denoyes-Rothan, B., Lercesteu-Kohler, E., Guerin, G., Bossuet, S., Bariss, J., Martin, E., Roudellac, P. (2004). QTL analysis for resistance to *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* in octaploid 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>
- Fedukova, 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., Conerton, L. F. (1996). Transcription of the *Campylobacter jejuni* cell division gene *ftsZ*. *FEMS Microb. Lett.* 143(1): 83-87.
- Hancock, J. F. (1999). *Strawberries*. CAB International, Oxford, U Hancock, K.
- Hancock, J. F. (2008). *Tangerine fruit crop breeding: from plant to genomics*, Springer Science +Business Media, B.V. New York, USA.
- Hittalmani, S., Girish, T. N., Bindu, H., Meehan, P. J. (2008). Mapping populations: Development, Descriptions and Deployment; Principles and Practices of Plant Genomics: Vol.1: Genome Mapping; Chapter 3, Kolla, C. and Abbott, A.G. Sci. Publishers USA: 69-92.
- Hammer, K. E., Janick, J. (2009). *Roseosae: Taxonomy, economic importance, genomics*. In: Folta, K. Gardiner, S. (eds), *Genetics and Genomics of Roseosae*. Springer Science+Business Media, New York, USA, 1-18.
- Isohe, S. N., Hirakawa, H., Sato, S., Masuda, F., Ishikawa, M., Mori, T., Yamamoto, Y., Shirasawa, K., Kimura, M., Fukami, M., Hoshizane, F., Tsuji, T., Sasamoto, S., Kato, M., Nami, K., Tsurusaka, H., Mizumi, C., Takahashi, C., Wada, T., Ono, A., Kawashima, K., Nakazaki, N., Kishida, Y., Kohno, 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.
- Kola, C., Abbott, A. G. (2008). Fundamentals of plant genome mapping. W: Kola, C., Abbott, A. G., Principles and practices of plant genomics. Genome mapping. Science Publishers USA: 2-67.
- Larocatus-Kohler, E., Roukellac, P., Markocic, M., Guerin, G., Prasad, K., Denczyk-Rothman, B. (2002). The use of molecular markers for durable resistance breeding in the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Acta Hort.* 567: 615-618.
- Liebard, R., Gosala, C. (2000). Possible errors in genome mapping. *Integrated Control of Pome Fruit Diseases IOBC wps Bulletin* 23(12): 127-135.
- Mądry A., Markowski J., Żurawicz E. (2002). Matematyka poprawiania 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.
- Phillips, 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., Seehrik, 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., Goldhardt, C., Selenini, F. (1990). Estimation of recombination frequencies and constructing of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125: 645-654.
- Rousseau-Guérin, M., Guerin, A., Amsouche, A., Amsouche, A., Amsouche, M. L., Olbricht, K., Steink, G., Richard, L., Denczyk-Rothman, 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.
- Rungta, D., Hamberger, B., Barube, Y., Wilkin, J., Bohmann, 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., Aría, 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., Aría, P., Monfort, A., Vilanova, S., Denczyk-Rothman, 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., Colton 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., Śurbancowski, 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., Catty, P. (eds) *Mobile Genetic Elements. Methods in Molecular Biology* 260: Humana Press.
- Semagn, K., Bjørnstad, A., Ndjiondjop, M. N. (2006). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25): (2569)-2587.
- Verma, S., Zorn, J. D., Salinas, N., Mathey, M. M., Denczyk, 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., Pizarrova, A., Noordij, Y., Yilmaz-Temel, H., Meulenderck, 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., Peck, S. J., Poyea, V., Oepts 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(5): 429-434.
- Zorillo-Fontanari, Y., Cabera, A., Torres, A. M. (2011). Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid *Fragaria* and their transferability across the Rosaceae subfamily. *Mol. Breed.* 27: 137-156.