



Ocena zróżnicowania genetycznego odmian truskawki (*Fragaria x ananassa* Duch.) przy użyciu metody ISSR

Anita Kuras, Małgorzata Korbin, Edward Żurawicz
Zakład Hodowli Roślin Sadowniczych, Instytut Sadownictwa
i Kwaciarnictwa, Skierniewice

Evaluation of genetic variation of selected strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars using ISSR technique

Summary

Precise evaluation of the parental forms' genetic variation is the base of rational, modern breeding. DNA patterns obtained in ISSR (*inter simple sequence repeat*) reactions for 24 strawberry cultivars, frequently used in the crossing programme at the Research Institute of Pomology and Floriculture, were analysed. Diversifying genotypes, polymorphic DNA products were observed in reactions with 54 out of 90 tested primers (806-896, #9 UBC). Six primers (811-814, 824, 840) generating 44 polymorphic bands with length from 270 to 2030 bp allowed to diversify all investigated cultivars. The DNA profiles characterising each of genotypes contained 10-19 polymorphic ISSR products.

Key words:

ISSR, polymorphic DNA, strawberry, cultivar diversity.

Adres do korespondencji

Anita Kuras,
Instytut Sadownictwa
i Kwaciarnictwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice,
e-mail: akuras@insad.pl

1. Wstęp

Dobór form rodzicielskich do programu krzyżowań jest ważnym elementem strategii hodowlanych. Ustalenie zróżnicowania genetycznego roślin umożliwia zarówno wyselekcjonowanie donorów nowych cech jak i eliminację genotypów blisko spokrewnionych. Użycie tradycyjnych metod różnicowania (ocena fenotypowa rośliny) jest ograniczone w przypadku coraz częściej

występujących odmian o dużym podobieństwie fenotypowym. Czynnikiem ograniczającym te metody różnicowania może być także wiek i stadium rozwojowe rośliny, a wyniki bywają dodatkowo modyfikowane przez odmienne warunki uprawy porównywanych genotypów.

Rozwijające się w ostatnich latach techniki molekularne, umożliwiają analizę genomowego DNA stosunkowo niezależnie od wymienionych czynników, a uzyskane dane są bardziej precyzyjne niż otrzymane przy zastosowaniu metod tradycyjnych. Technika ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (1), bazująca na łańcuchowej reakcji polimerazy, należy do metod molekularnych często używanych do identyfikacji i oceny pokrewieństwa odmian roślin sadowniczych (2-4). Polega ona na amplifikacji fragmentów analizowanego genomu, które są komplementarne do sekwencji mikrosatelitarnych występujących w genomowym DNA (5).

Celem badań była ocena zróżnicowania genetycznego odmian truskawki używanych w programie krzyżowań ISK poprzez analizę polimorfizmu ich DNA generowanego metodą ISSR.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał roślinny

Analizie poddano rośliny 24 odmian truskawki używane jako formy rodzicielskie w programie krzyżowań ISK. Niezależne próbki pobierano z trzech roślin reprezentujących określony genotyp. Każda z próbek zawierała świeże pąki liściowe o łącznej masie około 1 g.

2.2. Izolacja DNA

Izolację przeprowadzono według metody opracowanej przez Doyle i Doyle (6). Roztartą w ciekłym azocie tkankę (1 g) inkubowano (60°C/30 min) w 15 ml buforu ekstrakcyjnego (2% CTAB, 100 mM Tris HCL pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% PVP-10 oraz 1% merkaptoetanolu) i oczyszczano mieszaniną chloroform/alkohol izoamyłowy (24:1). Kwasy nukleinowe wytrącano izopropanolem i rozpuszczano w 500 µl buforu TE. Degradację RNA przeprowadzano przy użyciu RNazy (Sigma). Stężenie DNA oznaczano w 1% żelu agarozowym oraz spektrofotometrycznie (Gene Quant pro Amersham Pharmacia Biotech).

2.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy

Mieszanina reakcyjna (13 μ l) zawierała 10 ng DNA oraz 0,65 U polimerazy i $10 \times$ bufor (Gibco), 1,1 mM dNTP, 1 mM $MgCl_2$, 0,4 μ M startera. Testowano 90 starterów o powtarzalnych sekwencjach mikrosatelitarnych (806-896), zestaw 9 UBC. Każda reakcja obejmowała 35 cykli (94°C/40s, 55°C/50s, 72°C/1min; termocykler PTC-200, MJ Research). Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym i analizowano w świetle UV.

3. Wyniki i dyskusja

W wyniku reakcji ISSR przeprowadzonych na matrycy DNA z roślin reprezentujących 24 odmiany truskawki uzyskano 178 produktów polimorficznych, o długości od 150 do 2030 pz. Produkty polimorficzne uzyskano w reakcjach z 41 spośród 90 testowanych starterów (808-815, 817-828, 834-836, 840-842, 848, 850, 853-855, 857, 864, 873, 889, 890-891, 895, 899-900). Do analizy zróżnicowania genetycznego posłużyło 6 starterów (811, 812, 813, 814, 824, 840), w reakcji z którymi uzyskano produkty polimorficzne typowe dla każdej z badanych odmian (tab. 1). W reakcji ze starterem 811 uzyskano wzory DNA charakteryzujące 9 odmian, podczas gdy w reakcji ze starterami 812, 813, 814, 824, 840 odpowiednio profile typowe dla 13, 14, 6, 10 i 3 odmian (tab. 2). Każda z odmian została scharakteryzowana na podstawie 10-19 produktów polimorficznych, odróżniających jej DNA od materiału genetycznego pozostałych.

Prawidłowa ocena zmienności w obrębie krzyżowanych form wyjściowych jest niezwykle cenną wskazówką dla hodowców, gdyż pozwala na wyeliminowanie efektu depresji wsobnej i równocześnie na zaplanowanie korzystnych kombinacji w obrębie puli genowej gatunku. Możliwość precyzyjnego odróżnienia genotypów przy użyciu techniki ISSR była stosowana przez wielu badaczy, zwłaszcza w pracach dotyczących odmian lub klonów morfologicznie nierozróżnialnych (7-10). Technika została zaadaptowana także do badań identyfikacyjnych truskawki (11,12), a określenie stopnia zróżnicowania genotypów przy użyciu tej metody było bardziej precyzyjne niż na podstawie obserwacji polowych (11).

W uzyskanych w tych badaniach danych potwierdzono skuteczność techniki do oceny zróżnicowania analizowanych form rodzicielskich truskawki. Wyniki, poszerzone o analizę skupień i ocenę odległości genetycznej, znajdują praktyczne zastosowanie podczas przygotowywania programu krzyżowań dla hodowli twórczej tego gatunku.

Tabela 1

Schemat zróżnicowania genetycznego 24 odmian truskawki przy zastosowaniu techniki ISSR ze starterami 811, 812, 813, 814, 824, 840

Starter	Długość produktu ISSR pz	Syrusz	Dukat	Pandora	Honeye	Real	Filon	Kama	Vikat	Kent	Seal	S. Sengana	Maj 197	Plena	Purpuratka	Heros	Elsanta	Onebor	Paula	Redgauntlet	Karel	Kaster	Selva	Elkat	Ostara
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
811	810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	821	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	835	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	841	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	845	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
	970	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	980	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	1100	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
812	1400	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1
	270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	730	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	800	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
	825	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
	830	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1
	850	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
	890	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
813	1360	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
	1375	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
	570	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
	630	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
	830	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0
	1200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	1375	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	1910	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
814	1980	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2030	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
	841	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
	1015	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1023	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1300	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
824	1375	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
	650	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	1100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	1250	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
824	1820	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	1904	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	2020	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	2030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
840	700	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	
	810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	834	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	
	845	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
	1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	

Tabela 2

Startery ISSR różnicujące rośliny 24 odmian truskawki

Odmiana	Starter					
	811	812	813	814	824	840
Syriusz			+			
Dukat		+	+			
Pandora		+		+	+	
Honeoye	+					
Real						+
Filon		+	+			
Kama	+		+			
Vikat		+			+	
Kent			+	+	+	
Seal	+	+				
S. Sengana						+
Maj 197			+			
Plena		+	+	+	+	
Purpuratka	+		+		+	
Heros		+	+		+	
Elsanta					+	
Onebor	+	+	+	+	+	
Paula	+				+	+
Redgauntlet		+		+		
Karel		+				
Kaster	+	+	+			
Selva	+		+		+	
Elkat	+	+	+			
Ostara		+	+	+		

Literatura

1. Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., (1994), *Genomic*, 20, 176-83.
2. Graham J., McNicol R. J., Greig K., van de Ven W. T. G., (1994), *J. Hort Science*, 69, 123-130.
3. Landry B. S., Li R. Q., Cheung W. Y., Granger R. L., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 847-852.
4. Lanham P. G., Brennan R. M., Hackett C., McNicol R. J., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 90, 166-172.
5. Moreno S., Gogorcena Y., Ortiz J. M., (1995), *Sc. Horticulturae*, 62, 237-243.
6. Doyle J. J., Doyle J. L., (1990), *Focus*, 12, 13-15.
7. Rajesh P. N., Sant V. J., Gupta V. S., Muehlbauer F. J., Ranjekar P. K., (2003), *Euphytica*, 129, 15-23.
8. Chowdhury M. A., Vandenberg B., Warkentin T., (2002), *Euphytica*, 127, 317-325.
9. Patzak J., (2001), *Euphytica*, 121, 9-18.
10. Lanham P. G., Brennan R. M., (1999), *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 74 (3), 361-366.
11. Arnau G., Lallemand J., Bourgoin M., (2003), *Euphytica*, 129, 69-79.
12. Graham J., McNicol R. J., McNicol J. W., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 90, 166-172.