

ELŻBIETA KACZMARSKA

**Ocena zróżnicowania genetycznego potomstwa
Fragaria moschata x *Potentilla fruticosa*
przy użyciu markerów RAPD**

Estimation of Genetic Differentiation of Progenies
Fragaria moschata x *Potentilla fruticosa* by RAPD Markers

Synopsis. Jednym ze sposobów poszerzania zmienności genetycznej u roślin jest krzyżowanie odległych taksonów, dlatego w wielu programach hodowlanych wykonywane są krzyżowania międzygatunkowe a nawet międzyrodzajowe. W niniejszej pracy badano zróżnicowanie genetyczne potomstwa F₁ pochodzącego z krzyżowania międzyrodzajowego: *Fragaria moschata* x *Potentilla fruticosa*. Oba gatunki należą do rodziny *Rosaceae* o podstawowej liczbie chromosomów $x = 7$. Obliczony na podstawie analizy markerów RAPD współczynnik podobieństwa wg Dice'a dla form rodzicielskich wynosił tylko 0,13. Analiza markerów molekularnych wykazała większe podobieństwo mieszańców do formy matecznej – *F. moschata*. Średni współczynnik podobieństwa genetycznego wynosił w tym przypadku 0,717, natomiast do formy ojcowskiej – *P. fruticosa* – 0,442.

Słowa kluczowe – key words: krzyżowanie międzyrodzajowe – intergeneric crossing, markery molekularne – molecular markers, mieszańce – hybrids

WSTĘP

W wielu programach hodowlanych krzyżowanie oddalone stosuje się, aby uzyskać rośliny o nowych korzystnych cechach i zwiększyć zmienność genetyczną. Próby krzyżowania gatunków z rodzaju *Fragaria* i *Potentilla* były uzasadnione ze względu na dość bliskie pokrewieństwo obu rodzajów (należą one do rodziny *Rosaceae* o podstawowej liczbie chromosomów $x = 7$). Rodzaj *Fragaria* obejmuje gatunki zielne, trwałe, rozmnażające się przez nasiona lub wegetatywnie. Jedną z cech odróżniających gatunki z rodzaju *Fragaria* od gatunków z rodzaju *Potentilla* jest przekształcanie dna kwiatowego w mięsisty owoc.

Autorzy wielu prac (Ellis, 1962; Szangin-Berezowskij, 1963; Asker, 1971; Niemirowicz-Szczytt, 1985) obserwowali, że rośliny potomne pochodzące z krzyżowania rodzajów *Fragaria* i *Potentilla* są fenotypowo bardzo podobne do formy macecznej, co określa się jako dziedziczenie matroklinalne. Matroklinarność oznacza, że potomstwo powstało apomiktycznie, a więc w tym wypadku bez udziału formy zapylającej (Niemirowicz-Szczytt, 1980). Tylko u niektórych roślin obserwowano cechy typowe dla ojcowskiego gatunku *Potentilla*. Najczęściej cechami markerowymi wskazującymi na mieszańcowy charakter roślin było żółte lub kremowe zabarwienie kwiatów typowe dla gatunków *Potentilla*.

Metodą, która w ostatnim czasie zdobyła uznanie dla identyfikacji mieszańców, jest stosowanie markerów molekularnych, uzyskanych na drodze losowej amplifikacji polimorficznego DNA techniką RAPD (Karp, 2000). W ten sposób potwierdzono m. in. mieszańcowość roślin otrzymanych w wyniku krzyżowań: *Hydrangea macrophylla* x *H. arborescens* (Kudo i Niimi, 1999) oraz *Lilium nobilissimum* x *L. regale* (Obata i wsp., 2000). Markery RAPD były również stosowane do potwierdzenia obecności genomów obydwu partnerów w mieszańcach oddalonych *Brassica oleracea* x *Camelina sativa* (Hansen, 1998).

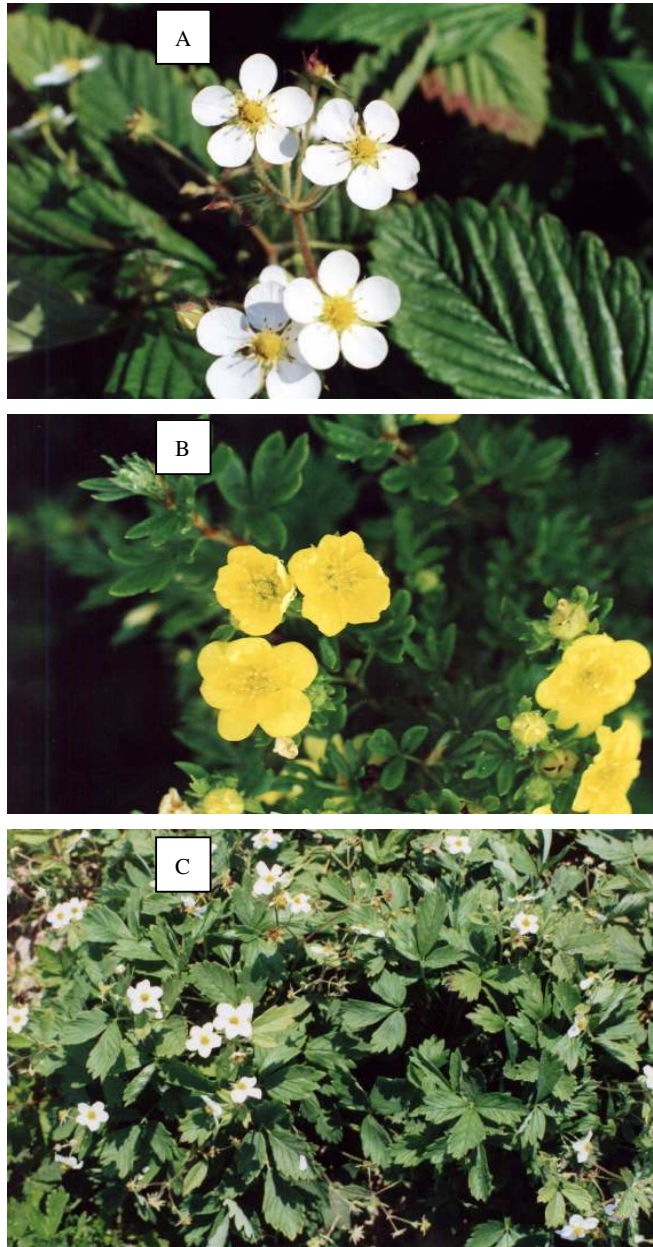
Określenie mieszańcowego charakteru roślin F_1 jest szczególnie potrzebne tam, gdzie potomstwo jest fenotypowo bardzo podobne do rośliny macecznej. Jak podaje Kowalska i in. (2001) w przypadku krzyżowań *Fragaria* x *Potentilla* maceczny wygląd roślin F_1 jest bardzo częstym zjawiskiem. Celem podjętych w niniejszej pracy badań było określenie zróżnicowania genetycznego w potomstwie F_1 powstałym z krzyżowania międzyrodzajowego *Fragaria moschata* z *Potentilla fruticosa* przy użyciu markerów RAPD.

MATERIAŁ I METODA

Materiałem doświadczalnym były rośliny F_1 uzyskane z kontrolowanego krzyżowania międzyrodzajowego pomiędzy heksaploidalną *Fragaria moschata* (Duch.) (liczba chromosomów: $2n = 6x = 42$) jako forma maceczna i diploidalną *Potentilla fruticosa* (L.) ($2n = 2x = 14$ chromosomach) jako dawca pyłku. *F. moschata* jest byliną dorastającą do 0,4 m, u nasady krótkich pędów nadziemnych wyrastają 3-listkowe liście, tworząc gęstą rozetkę. Z kątów liści wyrastają wici, zwane rozłogami, na których tworzą się młode rośliny. Badane osobniki miały kwiaty męskosterylnne, małe, o białych płatkach korony (Fot. 1.A). Po zapyleniu, z rozrośniętego dna kwiatowego powstaje mięsisty owoc rzekomy o korzennym smaku.

Charakterystyczne cechy fenotypowe *P. fruticosa* to: zdrewniałe pędy, wysoki wzrost (ok. 1 m), krzewiasty pokrój, żółta barwa kwiatów i bardzo obfite kwitnienie – kilkaset lub więcej kwiatów na roślinie; roślina ta nie tworzy rozłogów (Fot. 1.B).

Żadna z analizowanych roślin F_1 nie posiadała w/w cech formy ojcowskiej. Kształt liści u potomstwa był zbliżony do *F. moschata*, lecz były one znacznie mniejsze. Wśród roślin F_1 wystąpiły formy o pokroju zwartym i krótkich kwiatostanach lub luźnym pokroju z długimi ogonkami liściowymi, wysokich kwiatostanach i małą liczbą liści w rozecie. Najbardziej zmienną cechą mierzalną była liczba rozłogów; niektóre rośliny nie posiadały rozłogów, a inne tworzyły ich bardzo dużo. Wszystkie rośliny F_1 wytwarzały kwiatostany (Fot. 1.C), jednakże ok. 30% potomstwa było bezpłodne. Większość roślin tworzyła kwiaty męskie z bardzo słabo wykształconym dnem kwiatowym, podobnie jak u *P. fruticosa*.



Fot. 1. Kwitnące rośliny *F. moschata* (A), *P. fruticosa* (B) i mieszańca F_1
Flowering plants *F. moschata* (A), *P. fruticosa* (B) and F_1 hybrid

Analizowano czterdzieści pięć roślin potomnych i obie populacje rodzicielskie reprezentowane przez 10 roślin stanowiących klon. Pobieranie materiału do analizy RAPD przeprowadzono w czerwcu 2002 roku. Izolację komórkowego DNA wykonano w oparciu o procedurę opracowaną przez Doyle & Doyle i zmodyfikowaną przez Rowland i Nauyen (1993). Stężenie uzyskanego DNA mierzono na spektrofotometrze Gene Quantt i rozcieńczono sterylną wodą do stężenia $40 \text{ mg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. DNA amplifikowano techniką PCR-RAPD stosując 10 starterów o następującej sekwencji nukleotydów:

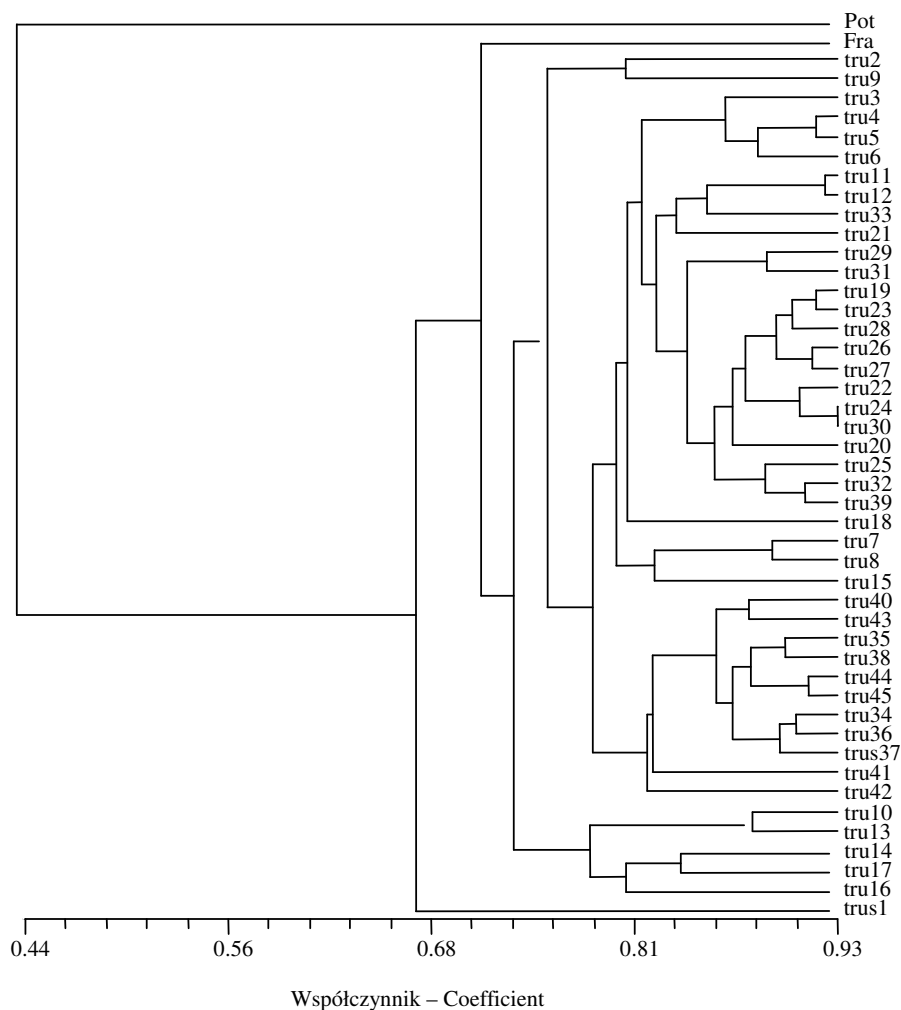
Symbol	Sekwencja nukleotydowa 5'-3'
J13	-CCACACTACC-
J19	-GGACACCACT-
D16	-AGGGCGTAAG-
H17	-CACTCTCCTC-
T4	-GTCCTCAACG-
T2B	-CTACACAGGC-
G01	-GGGAATTTCGG-
G02	-TGCTGCAGGT-
G09	-TCGCGACCGC-
G10	-CCGATATCCC-

Reakcje zostały przeprowadzone w termocyklerze firmy Perkin–Elmer DNA Thermal Cycler 480. Zastosowano następujące cykle termiczne: wstępna denaturacja przez 2 min w 95°C ; 45 cykli: 94°C – 45 sekund, 37°C – 45 sekund, 72°C – 45 sekund, z końcową inkubacją w 72°C przez 10 minut. Uzyskane w reakcji produkty rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,01%) przez 1,5 godziny przy napięciu 80V. Analizę elektroforogramów przeprowadzono przy użyciu programu Scion Image. Analizę skupień przeprowadzono metodą UPGMA (Unweighted Pair – Group Method with Arithmetic averages) w oparciu o wartości podobieństw (F) liczonych według wzoru Dice'a: $F = 2 \times N_{xy} / ((2 \times N_{xy}) + N_x + N_y)$ (za Nei i Li 1979), gdzie N_{xy} jest liczbą prążków wspólnych dla genotypów X i Y, N_x i N_y to całkowite liczby prążków uzyskanych dla genotypu X i Y. Następnie, pokrewieństwa pomiędzy badanymi genotypami zostały przedstawione na dendrogramie (ryc. 1).

WYNIKI

Analizowano tylko powtarzalne produkty amplifikacji, dość intensywne i różniące się wielkością od fragmentów sąsiednich. Liczba fragmentów amplifikowanych przez jeden starter wahała się od 3 do 9 (tab. 1).

Pierwszym etapem poszukiwania markerów do testowania mieszańcowości było znalezienie polimorfizmu w genotypach partnerów. W wyniku reakcji przeprowadzonych na DNA form rodzicielskich uzyskano łącznie 56 prążków,



Ryc. 1. Dendrogram UPGMA uzyskany na podstawie podobieństw Dice'a
Dendrogram generated by UPGMA clustering of the similarity matrix

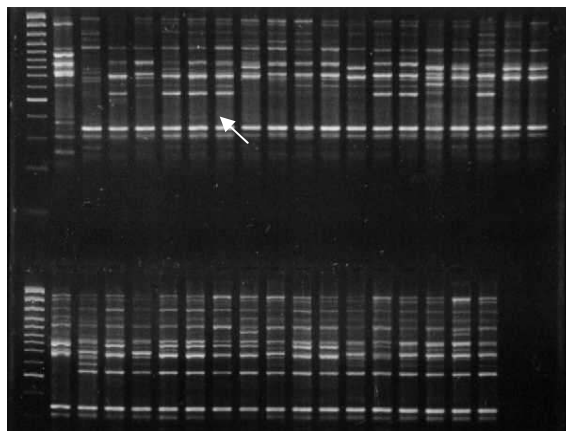
z czego aż 52 (tj. 92,85%) to produkty polimorficzne, a tylko 4 to prążki wspólne. Wyniki te świadczą o dużym zróżnicowaniu genetycznym gatunków rodzicielskich *F. moschata* i *P. fruticosa*, co potwierdza także bardzo niski współczynnik podobieństwa wg Dice'a wynoszący tylko 0,13.

Spośród łącznej liczby 61 obserwowanych u roślin F_1 markerów RAPD-33 (53,20%) pochodziło od matczynej *F. moschata* a 19 (31,14%) pochodziło od ojcowskiej *P. fruticosa*.

Tab. 1. Zestawienie produktów RAPD uzyskanych przy użyciu 10 starterów i obserwowanych u roślin F₁ i form rodzicielskich
The statement of RAPD products obtained by 10 primers and characteristic for F₁ plants and parental genotypes

Lp. No	Starter Primer	Liczba prążków ogółem total number of bands	Liczba prążków Number of bands			% roślin F ₁ posiadających prążki % F ₁ plants with bands				
			wspólnych dla obu rodziców common for both parents	matecznej maternal <i>F. m.</i>	ojcowskiej paternal <i>P. f.</i>	F ₁	mateczne maternal	ojcowskie paternal	wspólne common	F ₁
1.	H17	7	0	2	3	2	76,67	51,11		15,56
2.	T2B	6	0	5	1		67,11	77,78		
3.	G10	3	0	1	2		97,78	64,45		
4.	G2	5	2	3	0		94,07		72,22	
5.	G1	5	0	4	1		73,33	4,44		
6.	G9	9	0	5	3	1	81,78	62,22		75,55
7.	T4	6	0	3	2	1	70,37	61,11		26,60
8.	J19	7	1	3	3		79,26	73,33	71,11	
9.	J13	7	0	4	3		79,45	57,03		
10.	D16	6	1	3	1	1	68,88	82,22	77,77	82,00
Razem liczba prążków Total number of bands		61	4	33	19	5	Średnio – Mean			
% prążków % bands		100,00	6,56	54,09	31,15	8,2	78,87	59,30	73,30	50,00

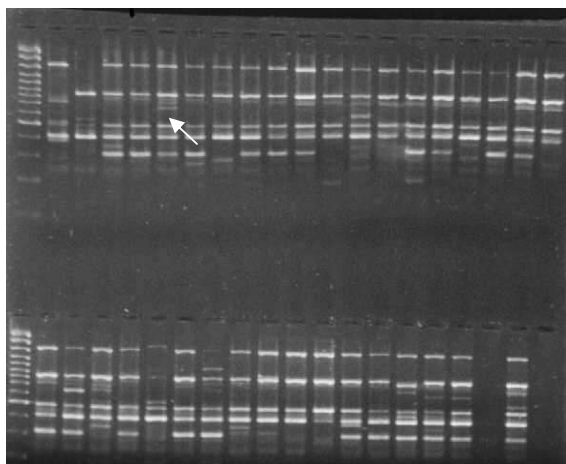
L P F



Fot. 2. Obraz elektroforetyczny, uzyskany w wyniku reakcji RAPD przy użyciu startera G 09 na DNA rodzicielskim i roślin F_1 . Kolejność profili: marker masy cząsteczkowej (L), *P. fruticosa* (P), *F. moschata* (F), 17 roślin F_1 w górnym rzędzie, 17 roślin F_1 w dolnym rzędzie.

Strzałką zaznaczono prążek różnicujący 830 pz występujący wyłącznie w F_1
 RAPD pattern obtained with primer G 09 on parental DNA and F_1 plants. Patterns: molecular weight marker (L), *P. fruticosa* (P), *F. moschata* (F), 17 F_1 plants in high line, 17 F_1 plants in down line. The arrow indicates polymorphic band 830 bp occurring only in F_1 plants

L F P



Fot. 3. Obraz elektroforetyczny, uzyskany w wyniku reakcji RAPD przy użyciu startera D 16 na DNA rodzicielskim i roślin F_1 . Kolejność profili: marker masy cząsteczkowej (L), *F. moschata* (F), *P. fruticosa* (P), 17 roślin F_1 w górnym rzędzie, 17 roślin F_1 w dolnym rzędzie. Strzałką zaznaczono prążek ojcowski 960 pz obecny u 82,2% potomstwa

RAPD pattern obtained with primer D 16 on parental DNA and F_1 plants. Patterns: molecular weight marker (L), *F. moschata* (F), *P. fruticosa* (P), 17 F_1 plants in high line, 17 F_1 plants in down line. The arrow indicates paternal band 960 bp occurring in 82.2% of progenies

Tab. 2. Zestawienie współczynników podobieństwa roślin F_1 do matczynej *F. moschata* i ojcowskiej *P. fruticosa*
 The statement of genetic pairwise similarities between F_1 plants and maternal *F. moschata* and paternal *P. fruticosa*

Numer rośliny Number of plants	Współczynnik podobieństwa do: Similarity coefficient to:	
	<i>F. moschata</i> ♀	<i>P. fruticosa</i> ♂
1	0,667	0,400
2	0,605	0,516
3	0,718	0,438
4	0,684	0,462
5	0,692	0,469
6	0,720	0,393
7	0,741	0,507
8	0,703	0,433
9	0,723	0,435
10	0,730	0,400
11	0,725	0,455
12	0,747	0,464
13	0,685	0,475
14	0,658	0,475
15	0,707	0,559
16	0,639	0,414
17	0,667	0,426
18	0,789	0,355
19	0,747	0,464
20	0,725	0,485
21	0,658	0,492
22	0,700	0,515
23	0,753	0,479
24	0,734	0,431
25	0,750	0,424
26	0,786	0,400
27	0,756	0,412
28	0,765	0,418
29	0,750	0,394
30	0,734	0,400
31	0,658	0,407
32	0,750	0,455
33	0,707	0,441
34	0,753	0,451
35	0,701	0,444
36	0,732	0,441
37	0,750	0,485
38	0,738	0,486
39	0,756	0,471
40	0,769	0,313
41	0,692	0,375
42	0,701	0,444
43	0,684	0,387
44	0,675	0,464
45	0,716	0,448
Średni – Mean	0,717	0,442
Maksymalny – Maximum	0,789	0,556
Minimalny – Minimum	0,605	0,313

Stwierdzono także 5 produktów (8,20%), które nie występowały u żadnej z form rodzicielskich ale pojawiły się u roślin F_1 . Tylko 2 prążki z 19 charakterystycznych dla ojcowskiej *P. fruticosa* wystąpiły u wszystkich roślin potomnych. Obecność tych markerów u roślin F_1 wskazuje na udział obu form rodzicielskich w powstawaniu potomstwa, a markery te można uznać za różnicujące. Pozostałe prążki „ojcowskie” stwierdzono u znacznie mniejszej liczby potomstwa, bo średnio u 59,3% roślin.

Na podstawie uzyskanych profili RAPD dla roślin potomnych i obu form rodzicielskich wyliczono współczynniki podobieństwa genetycznego. Ich wartości zamieszczono w tabeli 2. Ponad 90% roślin F_1 charakteryzowała się stosunkowo niskim współczynnikiem podobieństwa do ojcowskiej *P. fruticosa* wynoszącym średnio 0,44, a tylko u 8,89% potomstwa współczynnik ten był nieco wyższy i wynosił 0,51–0,56.

Współczynniki podobieństwa roślin F_1 do matecznej *F. moschata* były znacznie wyższe niż do formy ojcowskiej i wynosiły średnio 0,72. Aż 95,5% potomstwa charakteryzowało się stosunkowo wysokimi współczynnikami podobieństwa do formy matecznej zawierającymi się w przedziale 0,66–0,80. U pozostałych 4,5% roślin F_1 współczynnik ten wynosił: 0,61–0,65.

DYSKUSJA

Uzyskane profile RAPD wskazują, że udział obu rodziców w potomstwie F_1 jest nierówny. Krzyżowane gatunki są heterozygotyczne i mają różną liczbę genomów. Mateczna *F. moschata* jest heksaploidem, więc może przekazać potomstwu 3 genomy, a diploidalna *P. fruticosa* tylko 1 genom. Dlatego też rośliny F_1 mogą mieć inną liczbę genomów niż formy rodzicielskie lub zróżnicowaną liczbę genomów. Jak podaje Tarkowski (1974), mieszańce międzyrodzajowe w pierwszym pokoleniu często są podobne fenotypowo do jednego z rodziców. Na ogół podobieństwo jest tym większe, im więcej chromosomów wnosi forma rodzicielska. Poza tym w pokoleniu F_1 ujawniają się cechy dominujące i dopiero w pokoleniu drugim następuje ich rozszczepienie. Pojawiają się wówczas różne fenotypy – zbliżone mniej lub bardziej do jednego z rodziców (najczęściej żeńskiego) oraz formy pośrednie.

Wiele badań dotyczących możliwości uzyskania mieszańców oddalonych przeprowadziła K. Niemirowicz-Szczytt (1980, 1982, 1985). Krzyżowania wykonane przez autorkę między matecznymi *F. virginiana* i *F. ananassa* oraz sześcioma gatunkami pięciorników doprowadziły do powstania sześciu dojrzałych roślin mieszańcowych przypominających żeńskiego rodzica. W innej pracy (1982) zapyłono dziesięć odmian truskawki pyłkiem dziewiętnastu gatunków *Potentilla*. Wśród uzyskanego potomstwa nie zaobserwowano podobieństwa do pięciorników pod względem żadnej z badanych cech morfologicznych i określono to potomstwo jako matroklinalne. Mc Farlane-Smith i Jones (1985) oraz

Kowalska (1999, 2001) w swoich pracach sugerują taki sposób powstawania potomstwa w przypadku krzyżowania roślin z rodzaju *Fragaria* i *Potentilla*.

Obserwowana w uzyskanym potomstwie segregacja cech morfologicznych wskazuje na występującą wśród tych roślin zmienność, co może oznaczać, że jest to potomstwo mieszańcowe. Z przedstawionych wyników badań wynika, że potomstwo powstałe z krzyżowania międzyrodzajowego *F. moschata* x *P. fruticosa* było bardziej podobne do formy matecznej niż do ojcowskiej.

WNIOSKI

1. Uzyskane markery RAPD wskazują na znaczny polimorfizm obu krzyżowanych gatunków rodzicielskich. Współczynnik podobieństwa genetycznego między nimi wynosił 0,133.

2. Średni współczynnik podobieństwa roślin F_1 do formy matecznej wynosił 0,717, natomiast do formy ojcowskiej był niższy – 0,442.

3. Obecność u wszystkich roślin F_1 prążków H17-1190 i T4-280 charakterystycznych dla *P. fruticosa* może wskazywać na ich mieszańcowy charakter.

4. Użycie starterów: H17, T4, T2B, G09, G10, J19, J13, D16 pozwoliło na uzyskanie markerów różnicujących badany materiał roślinny.

PIŚMIENNICTWO

- A s k e r S., 1971. Some viewpoints on *Fragaria* x *Potentilla* intergeneric hybridization. *Hereditas*. 67: 181–190.
- E l l i s J. R., 1962. *Fragaria* – *Potentilla* intergeneric hybridization and evolution in *Fragaria*. *Proc. Linn. Soc.* 173: 99–106.
- H a n s e n L. N., 1998. Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleracea* L. and *Camelina sativa* (L.) Cranz. *Euphytica*. 104: 173–179.
- K a r p A., 2000. Molecular tools for detecting genetic diversity. *Acta Hort.*, 530: 17–29.
- K o w a l s k a B., 1999. Mieszańce międzyrodzajowe *Fragaria* x *Potentilla*. *Mat. Ogólnopol. Konf. Nauk.*, pt. „Genetyka i Taksonomia Roślin”. Poznań: 21.
- K o w a l s k a B., T y r k a M., H o r t y Ń s k i J. A., 2001. Phenotypic and molecular characters of *Fragaria* and *Potentilla* hybrids. XVIth Eucarpia Congress „Plant Breeding: Sustaining the Future”. Edinburgh. Book of Abstracts: 47.
- K u d o N., N i i m i Y., 1999. Production of interspecific hybrid plants through cotyledonary segment culture of embryos derived from crosses between *Hydrangea macrophylla* f. *hortensia* (Lam.) Rehd. and *H. arborescens* L. J. *Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 803–809.
- M c F a r l a n e - S m i t h W. H., J o n e s J. K., 1985. Intergeneric crosses with *Fragaria* and *Potentilla*. Crosses between *Fragaria moschata* and *Potentilla fruticosa*. *Euphytica*. 34: 725–735.
- N e i M., L i W. H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5269–5273.
- N i e m i r o w i c z - S z c z y t t K., 1980. Osiągnięcia w zakresie krzyżowania rodzajów *Fragaria* – *Potentilla*. *Wiad. Bot.*, 24–4: 139–146.
- N i e m i r o w i c z - S z c z y t t K., 1982. Apomiksja w rodzinie różowatych. *Wiad. Bot.*, 26: 19–28.

- Nie mirowicz – Szczytt K., 1985. Results of intergeneric *Fragaria* and *Potentilla* ssp. crosses. Acta Hort., 159: 135–147.
- O b a t a Y., N i i m i Y., N a k a n o M., O k a z a k i K., M i y a j i m a I., 2000. Interspecific hybrids between *Lilium nobilissimum* and *L. regale* produced via ovules with placenta tissue culture. Sci. Hort. 84: 191–204.
- R o w l a n d L. J., N g u y e n B., 1993. Use of PEG for purification of DNA from leaf tissue of woody plants. BioTechniques 14: 735–736.
- S z a n g i n - B e r e z o w s k i j G. N., 1963. Distant hybridization in strawberries. Trudy Inst. Genet. 30: 321–356.
- T a r k o w s k i C., 1974. Genetyka. Hodowla roślin. Nasiennictwo. PWN. Warszawa.

SUMMARY

One method of extension genetic variability in plants is crossing between distant taxa. In many breeding programs interspecies and intergeneric crossing are realized. Genetic differentiation in the F₁ progeny of *Fragaria moschata* x *Potentilla fruticosa* was studied in the experiment. Both of these species belong to the *Rosaceae* family with basic chromosome number $x = 7$. Genetic similarity by Dice obtained by RAPD markers was very low – 0,13. Molecular markers analysis proved, that hybrids were more similar to mother's *F. moschata*. An average genetic similarity in this case was 0.717, whereas to father's form – *P. fruticosa* – 0.442.