

Badanie molekularnych mechanizmów odporności ogórka na najważniejsze czynniki biotyczne i abiotyczne

Kierownik: dr Urszula Kłosińska, e-mail: urszula.klosinska@inhort.pl

Wykonawcy: dr Urszula Kłosińska, dr Marzena Nowakowska¹, dr Wojciech Szczechura¹,
mgr Katarzyna Nowak¹, inż. Ewa Baigazin¹, Ewa Matysiak¹, lic. Paulina Fydrych-Lichman¹,
prof. dr hab. Mirosław Tyrka²

¹Instytut Ogrodnictwa – PIB, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,
Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych

²Politechnika Rzeszowska, Wydział Chemiczny,
Katedra Biochemii i Biotechnologii

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice



CELE PROJEKTU

- Otrzymanie nasion pokolenia F_7 populacji mapującej RIL wyprowadzonej ze skrzyżowania odpornej na *P. cubensis* linii PI 197088 z podatną linią PI 175695.
- Wygenerowanie populacji mieszańcowych (F_1 , RF_1 , F_2 , Bc_1P_1 , Bc_1P_2) ze skrzyżowania odpornej linii PI 197088 z innymi dwoma źródłami odporności (Ames 2354, PI 330628).
- Ocena odporności/podatności na mączniaka rzekomego w wybranych materiałach ogórka.
- Analiza porównawcza zmian w ekspresji genów pod wpływem stresu suszy w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem badanej.

Wszystkie cele zostały zrealizowane.

Materiały i Metody

Temat badawczy 1

- 115 linii wsobnych populacji mapującej RIL F₆ (PI 197088 x PI 175695) w warunkach szklarniowych rozmnożono wsobnie metodą SSD (*Single Seed Descent*)
- ocena fenotypowa populacji mapującej RIL F₆ (wczesność, cechy morfologiczne owoców i nasienników)



Temat badawczy 2

- 3 nowe źródła odporności na *P. cubensis*: Ames 2354, PI 197088, PI 330628; zapylenia wsobne i krzyżowe
- ocena fenotypowa (wczesność, ekspresja płci, cechy morfologiczne owoców i nasienników)

Temat badawczy 3

- 6 nowych linii z odpornością na *P. cubensis*: Ames 2353, Ames 2354, PI 197085, PI 197086, PI 197088, PI 330628; 3 kontrolne linie/odmiany podatne na *P. cubensis*: PI 175695, Coolgreen, Wisconsin SMR18
- doświadczenie polowe: naturalna infekcja *P. cubensis*, trzy lokalizacje: Skierniewice, Tarnów, Markusy; ocena odporności wg 10. stopniowej skali (0=brak objawów, 9= całkowite porażenie) w dwóch terminach.

Temat badawczy 4

- 2 linie o skrajnej reakcji na suszę : SU 2 (tolerancyjna), SU 6 (wrażliwa)
- doświadczenie w ryzoboksach: kontrola (90-100% PPW), stres suszy (50% PPW) zadawany od momentu wykształcenia się liścieni do fazy 4-5 liścia, izolacja RNA,
- wysokoprzepustowe sekwencjowanie transkryptomów (RNAseq, Illumina)



WYNIKI

Temat badawczy 1

Mapowanie i charakterystyka QTL warunkujących odporność ogórka na *P. cubensis*

- W wyniku rozmnożenia wsobnego metodą SSD uzyskano nasiona pokolenia F₇ dla 115 linii populacji RIL pochodzącej ze skrzyżowania odpornej na *P. cubensis* linii PI 197088 z linią podatną PI 175695. Łącznie otrzymano 1953,5 g nasion. Maksymalna ilość nasion dla linii wynosiła 46 g, zaś minimalna 2 g.
- Uzyskana populacja mapująca RIL F₇ zostanie w przyszłym roku ponownie rozmnożona wsobnie metodą SSD w celu wygenerowania kolejnego pokolenia, które w następnych latach poddane będzie fenotypowej ocenie odporności na *P. cubensis* oraz mapowaniu i charakterystyce loci ilościowych sprzężonych z odpornością ogórka na tego patogena.

c.d. Temat badawczy 1

Mapowanie i charakterystyka QTL warunkujących odporność ogórka na *P. cubensis*

- ❑ Na podstawie przeprowadzonego fenotypowania stwierdzono, że linie RIL pokolenia F₆ były zróżnicowane pod względem analizowanych cech.
- ❑ Największą zmienność rekombinacyjną obserwowano w przypadku cech morfologicznych nasienników (ornamentacja, kształt, długość). Ilość otrzymanych rekombinantów stanowiła 68% populacji mapującej, 26% osobników wytwarzało nasienniki w typie linii matecznej, natomiast 6% w typie linii ojcowskiej.
- ❑ Stwierdzono, że cecha wczesności w populacji RIL F₆ ma rozkład normalny: 18% linii wczesnych, 17% późnych i 65% linii o pośrednim terminie zakwitania.



Temat badawczy 2

Określenie allelizmu czynników odporności na *P. cubensis* w różnych źródłach tej cechy

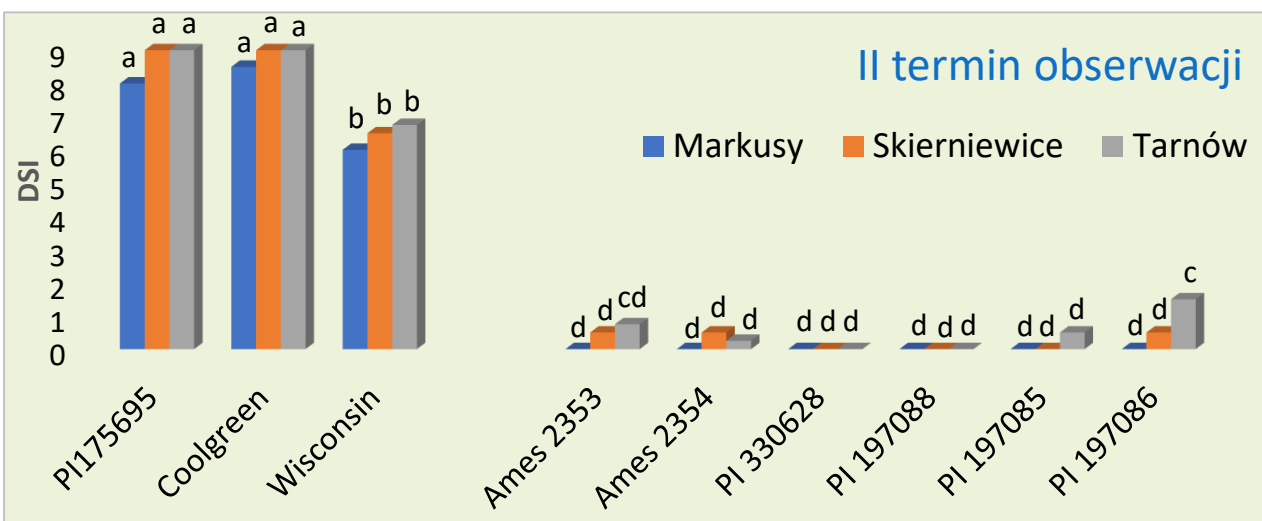
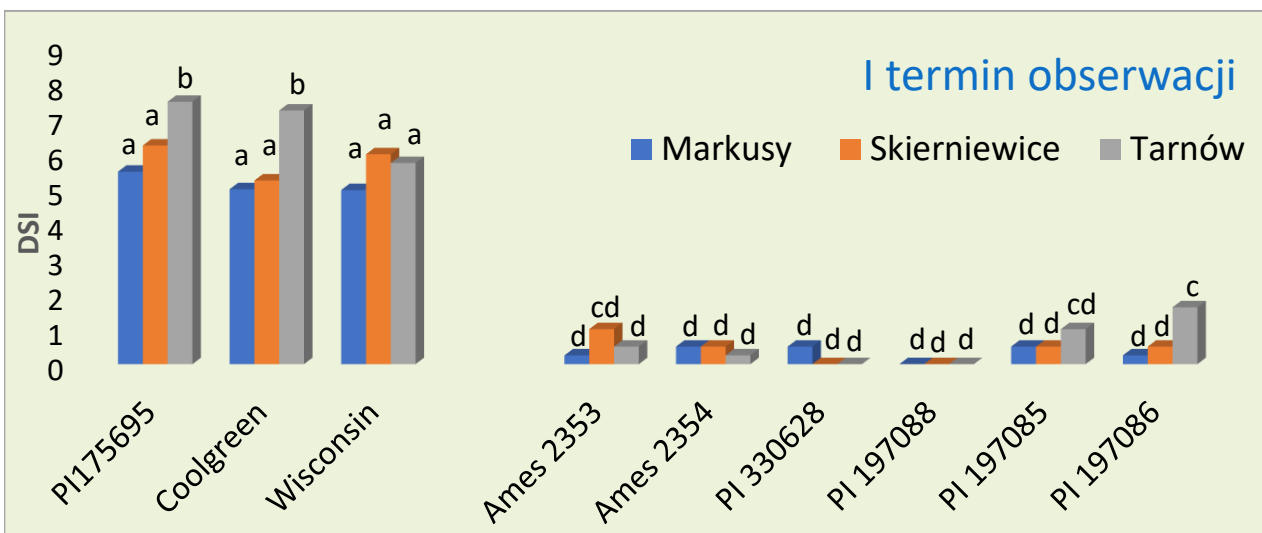
- W wyniku zapyleń wsobnych i krzyżowych otrzymano po pięć populacji mieszańcowych (F_1 , RF_1 , F_2 , Bc_1P_1 , Bc_1P_2) dla każdej z dwóch kombinacji: PI 197088 x PI 330628 oraz PI 197088 x Ames 2354. Ilość uzyskanych nasion była zróżnicowana i wahała się w przedziale od 15 do 102 g. Łącznie przeprowadzono 230 zapyleń ręcznych, w tym 130 krzyżowych oraz 100 zapyleń wsobnych.
- Otrzymane populacje mieszańcowe (F_1 , RF_1 , F_2 , Bc_1P_1 , Bc_1P_2) posłużą w kolejnym roku do zbadania allelizmu czynników genetycznych u nowych źródeł odporności na *P. cubensis*.

Zapylenia krzyżowe	Otrzymane pokolenie
PI 197088 P_1 x PI 330628 P_2	F_1
PI 330628 P_2 x PI 197088 P_1	RF_1
(PI 197088 P_1 x PI 330628 P_2) x P_1	Bc_1P_1
(PI 197088 P_1 x PI 330628 P_2) x P_2	Bc_1P_2
PI 197088 P_1 x Ames 2354 P_2	F_1
Ames 2354 P_2 x PI 197088 P_1	RF_1
(PI 197088 P_1 x Ames 2354 P_2) x P_1	Bc_1P_1
(PI 197088 P_1 x Ames 2354 P_2) x P_2	Bc_1P_2
Zapylenia wsobne	
(PI 197088 P_1 x PI 330628 P_2) x self	F_2
(PI 197088 P_1 x Ames 2354 P_2) x self	F_2
PI 197088 x self	P_1
PI 330628 x self	P_2
Ames 2354 x self	P_2

WYNIKI

Temat badawczy 3

Badanie stabilności odporności na mączniaka rzekomego w nowo zidentyfikowanych odpornych genotypach ogórka



☐ Wszystkie linie odporne, niezależnie od lokalizacji i terminu obserwacji charakteryzowały się bardzo wysokim i stabilnym poziomem odporności, o czym świadczą bardzo niskie średnie wartości wskaźnika DSI (0,0 - 0,6).

☐ Na podstawie porażenia roślin odmian podatnych można wnioskować, że presja *P. cubensis* była słabsza w Markusach, niż w pozostałych dwóch lokalizacjach. Mogło to być spowodowane mniej sprzyjającymi warunkami pogodowymi dla rozwoju choroby, panującymi w północnej Polsce.

WYNIKI

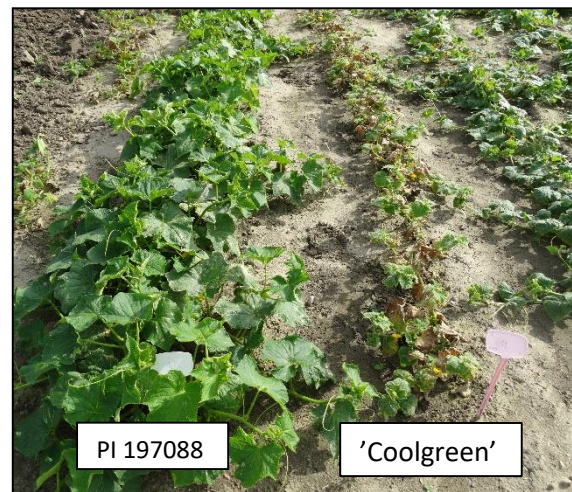
c.d. Temat badawczy 3

Badanie stabilności odporności na mączniaka rzekomego w nowo zidentyfikowanych odpornych genotypach ogórka

- ❑ Spośród sześciu badanych linii odpornych, szczególnie wyróżniła się linia PI 197088, która charakteryzowała się prawie immunnym poziomem odporności na *P. cubensis* we wszystkich trzech lokalizacjach w ciągu całego okresu wegetacji (DSI=0,0).
- ❑ Najsilniejszy rozwój choroby obserwowano u dwóch genotypów podatnych 'Coolgreen' i PI 175695, które w drugim terminie obserwacji zarówno w Skierniewicach, jak i Tarnowie porażone były całkowicie (DSI=9,0).



Markusy: I termin obserwacji



Tarnów: I termin obserwacji



Skierniewice: II termin obserwacji

WYNIKI

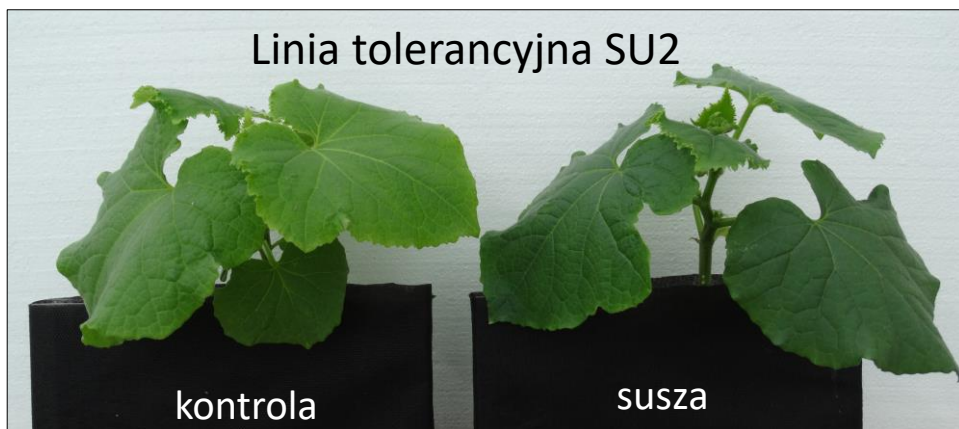
Temat badawczy 4

Analiza porównawcza zmian w ekspresji genów pod wpływem stresu suszy w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem badanej cechy

- Porównawcze analizy transkryptomów metodą RNA-seq obu linii ogórka (SU2 – tolerancyjna, SU6 – wrażliwa) są obecnie wykonywane przez firmę Genomed SA, a otrzymane wyniki zostaną w roku 2022 poddane analizie bioinformatycznej celem wytypowania genów o obniżonej lub podwyższonej ekspresji w odpowiedzi na zadany stres suszy.



Doświadczenie w ryzoboksach



WNIOSKI

- ❑ Fenotypowanie populacji RIL F_6 (PI 197088 x PI 175695) potwierdziło, że metoda SSD umożliwia zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii wsobnych populacji RIL, dzięki czemu stanowią one źródło nowej zmienności. Dlatego też wyprowadzona w następnym roku populacja mapująca RIL F_8 (PI 197088 x PI 175695) posłuży do konstrukcji wysoko zagęszczonej mapy, która oprócz wykorzystania do identyfikacji QTL kontrolujących odporność ogórka na *P. cubensis* będzie mogła być zastosowana do mapowania innych cech tego gatunku.
- ❑ Na podstawie stopnia porażenia kontrolnych odmian podatnych na mączniaka rzekomego można wnioskować, że rozwój choroby, zwłaszcza w I terminie obserwacji, przebiegał wolniej w północnej Polsce, niż w południowej i centralnej.
- ❑ Stwierdzono, że nowe odporne linie charakteryzowały się we wszystkich lokalizacjach wysokim i stabilnym poziomem odporności przez cały okres wegetacji, dzięki czemu stanowią cenny materiał wyjściowy do wykorzystania w programach hodowli ogórka z odpornością na mączniaka rzekomego oraz jako źródło nowej zmienności genetycznej tego gatunku.