

Zadanie 102

Opracowanie genetycznych, fizjologicznych i biochemicznych podstaw tolerancji ogórka na stres niedoboru wody

W roku 2020 badania prowadzono w ramach trzech tematów.

Temat badawczy 1

Ocena parametrów morfologicznych i fizjologicznych u wybranych linii ogórka w warunkach deficytu wody i optymalnego nawadniania

Celem niniejszego tematu było porównanie parametrów fizjologicznych i morfologicznych oraz dynamiki wzrostu systemów korzeniowych u 10. linii ogórka uprawianych w ryzoboksach w warunkach stresu suszy oraz optymalnej wilgotności gleby. Stwierdzono, że niedobór wody znacząco obniżył natężenie fotosyntezy i transpiracji oraz przewodność szparkową. Spośród pięciu badanych parametrów fizjologicznych u wszystkich ocenianych linii najsilniej została zredukowana przewodność szparkowa (o ok. 60-75% względem kontroli). Wyjątek stanowiła linia B8, u której parametr ten został obniżony o ok. 30%. Analizując reakcje poszczególnych linii, największe obniżenie natężenia fotosyntezy, transpiracji i przewodności szparkowej obserwowano u B3, SU6 i SU9. Natomiast najmniejszą redukcję natężenia fotosyntezy i transpiracji stwierdzono u B 8 SU1 i SU2. Wartości wskaźnika fluorescencji Fv/Fm były wyższe w warunkach deficytu wody u pięciu linii B8, PW1, PW2a, SU6 i SU7, u trzech linii B3, SU1 i SU2 - na poziomie roślin kontrolnych, natomiast u pozostałych dwóch linii SU6 i SU9 były wyższe w warunkach optymalnego nawadniania. U wszystkich linii pod wpływem stresu suszy obserwowano wzrost natężenia zielonej barwy liści, co świadczy o zwiększonej zawartości chlorofilu u roślin stresowanych.

Największą średnią redukcję dla 10 linii w warunkach deficytu wody stwierdzono dla masy korzenia (46%), następnie dla masy części nadziemnej (35%), wysokości rośliny (24%), a najmniejszą dla liczby liści (13%). Wyjątek stanowiła powierzchnia liści, której średnia wartość dla wszystkich badanych obiektów wzrosła o 6%. Najmniejszą redukcją czterech z pięciu ocenianych cech morfologicznych odznaczało się pięć linii SU1, SU2, SU5, SU6 i SU7, a w przypadku powierzchni liści zanotowano u nich wzrost tego parametru w warunkach stresu suszy względem kontroli o 22-54%. Wysokość roślin u linii SU2 i SU5 wzrosła odpowiednio o 11 i 20% w odniesieniu do kontroli, natomiast u linii SU6 pozostała na poziomie roślin optymalnie nawadnianych. Również u dwóch linii SU5 i SU6 zanotowano wzrost liczby liści względem kontroli.

Na podstawie analizy zeskanowanych obrazów wykazano różnice w dynamice wzrostu i sumarycznej długości systemów korzeniowych między liniami zarówno w warunkach kontrolowanych, jak i stresowych. Niezależnie od zadanego poziomu nawodnienia u wszystkich linii stwierdzono znaczne różnice w długości korzeni pomiędzy trzema terminami obserwacji. Największą redukcję długości korzenia (50%) w stresie suszy zaobserwowano u linii SU1. U trzech linii SU5, SU6 i SU2 parametr ten obniżony był odpowiednio o 13, 21 i 27% względem kontroli, a u linii PW1 był na poziomie kontroli. U pozostałych pięciu linii SU7, SU9, PW2A, B3 i B8 w warunkach niedoboru wody w II i III terminie obserwacji zanotowano istotnie dłuższy korzeń niż w warunkach optymalnego nawadniania. Na wyróżnienie zasługuje linia SU 9, która w stresie suszy charakteryzowała się najbardziej dynamicznym wzrostem korzeni oraz największą jego długością we wszystkich trzech datach pomiarów wykonanych w odstępach tygodniowych.

Temat badawczy 2

Charakterystyka tła genetycznego tolerancji ogórka na niedobór wody

Celem niniejszego zadania badawczego było określenie allelizmu czynników tolerancji ogórka na stres deficytu wody zadany w fazie kiełkowania nasion. Materiał do badań stanowiły nasiona dwóch

komponentów rodzicielskich B 3 (P₁) i B 8 (P₂) o bardzo dobrej zdolności kiełkowania w warunkach stresu suszy oraz ich populacje mieszańcowe: F₁, RF₁, F₂, Bc₁P₁, Bc₁P₂. Nasiona wykładano do szalek wcześniej wyłożonych bibułą nasączoną 18% PEG₈₀₀₀, indukującym stres suszy. W czwartej dobie wszystkie badane populacje charakteryzowały się bardzo dobrą energią kiełkowania na poziomie 99-100%. Nie stwierdzono także pomiędzy nimi istotnych różnic pod względem wskaźnika DTG określającego średni czas kiełkowania nasion, którego wartości mieściły się w bardzo wąskim przedziale od 2 do 2,24.

Badania nad określeniem allelicznego charakteru czynników tolerancji ogórka na stres suszy w fazie kiełkowania nasion przeprowadzono w oparciu o rozkład fenotypów w pokoleniach mieszańcowych otrzymanych ze skrzyżowania dwóch tolerancyjnych linii B3 i B8. Mieszańce F₁ ze skrzyżowań tych linii, bez względu na kierunek krzyżowania (F₁ vs RF₁) nie wykazały różnic we wskaźnikach DTG oraz w rozkładzie fenotypów. Nie obserwowano także segregantów w pokoleniu F₂ ani w obu skrzyżowaniach wstecznych (Bc₁P₁, Bc₁P₂), a rozkład cechy w analizowanych populacjach był bardzo zbliżony do tolerancyjnych komponentów rodzicielskich, co sugeruje iż obie linie rodzicielskie posiadają podobne uwarunkowania genetyczne zdolności kiełkowania nasion w warunkach niedoboru wody.

Temat badawczy 3

Porównawcze analizy transkryptomów tolerancyjnych i wrażliwych linii ogórka na stres niedoboru wody

Celem badań była analiza porównawcza zmian w ekspresji genów pod wpływem stresu suszy w czterech liniach ogórka zróżnicowanych pod względem badanej cechy, w tym linie: B3 (tolerancyjna) i SU6 (wrażliwa), które w 2018 roku zostały poddane wyskoprzepustowemu sekwencjonowaniu transkryptomów. Na podstawie uzyskanych wyników RNAseq zidentyfikowano 944 genów ulegających istotnie zróżnicowanej ekspresji (DEGs, *differentially expressed genes*). Geny wykazujące podobne tendencje w profilach ekspresji, pogrupowano w 9 klastrów z wykorzystaniem hierarchicznego klastrowania i aglomeracyjnej metody grupowania Warda.

Na podstawie otrzymanych wyników profili ekspresji z analizy RNAseq oraz danych literaturowych, dotyczących genów odgrywających znaczącą rolę w mechanizmach tolerancji ogórka, wybrano 18 genów, których ekspresję weryfikowano metodą qPCR. Zauważono wyraźne różnice we wzorze zmian ekspresji pod wpływem stresu niedoboru wody u większości wybranych do walidacji genów pomiędzy analizą RNAseq i qPCR. U jedenastu z 18 walidowanych genów odnotowano wyższy poziom ekspresji po 8 godzinach od momentu zadania czynnika stresowego u tolerancyjnej linii B3 w porównaniu do wrażliwej SU6. Wraz z upływem czasu (poddawanie roślin stresowi niedoboru wody) poziom ekspresji tych genów ulegał obniżeniu u linii B3. Natomiast w przypadku wrażliwej linii SU6 ilość ww. transkryptów kształtowała się na relatywnie niskim i dość wyrównanym poziomie przez cały okres zadawania stresu lub ulegała niewielkim fluktuacjom (wzrost/spadek) w analizowanych progach czasowych. Na szczególne wyróżnienie w grupie tych genów zasługują cztery geny: *CsGy4G012200*, *CsGy6G005230*, *CsGy2G012510* oraz *CsGy7G015300*, kodujące odpowiednio białka: argonaut 5, ERD6-like 16 związane z transportem cukrów, dehydrynę LEA oraz białko związane z wczesną odpowiedzią na odwodnienie. Ich poziom względnej ekspresji w pierwszych 8 godzinach od momentu zadania stresu niedoboru wody był przynajmniej trzykrotnie wyższy w tolerancyjnej linii B3 aniżeli u linii wrażliwej SU6.

Analizowano również względny poziom ekspresji badanych genów po trzech tygodniach trwania eksperymentu (22 dni od momentu zadania czynnika stresowego) u czterech liniach różniących się reakcją na stres niedoboru wody (wrażliwa linia SU6, trzy linie o różnym poziomie tolerancji: B3, SU2 i SU5). W przypadku 11 genów poziom względnej ekspresji był największy u wrażliwej linii SU6, przewyższając znacznie pod tym względem wszystkie trzy tolerancyjne linie.

Podsumowanie i najważniejsze osiągnięcia projektu

1. Opracowano metodę testowania ogórka na stres niedoboru wody w warunkach laboratoryjnych (faza kiełkowania nasion i faza siewek) oraz w warunkach szklarniowych (faza rozsady, kwitnienia i owocowania), która umożliwiła efektywną selekcję genotypów tolerancyjnych i wrażliwych.
2. Określono parametry morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne, które mogą być wskaźnikiem tolerancji ogórka na deficyt wody.
3. Wyjaśniono mechanizm dziedziczenia zdolności kiełkowania nasion ogórka w warunkach deficytu wody u tolerancyjnej linii B3 oraz wykazano podobne uwarunkowania genetyczne tej cechy u dwóch linii tolerancyjnych B3 i B8, co umożliwi wybór odpowiedniej metody introdukcji tolerancji na stres suszy w fazie kiełkowania do wrażliwych odmian/linii ogórka.
4. Na podstawie analizy transkryptomów zidentyfikowano trzy geny, które cechowały się zwiększoną względną ekspresją u tolerancyjnej linii B3, i z tego względu mogą być potencjalnie wykorzystane do identyfikacji markerów związanych z tolerancją roślin ogórka na stres niedoboru wody.
5. Uzyskane wyniki badań były prezentowane na pięciu konferencjach zagranicznych oraz opublikowane w oryginalnej publikacji:
Kłosińska U., Kozik E.U., Treder W., Klamkowski K. 2016. Differential effects of drought stress on germination and seedling growth of cucumber accessions. In: Kozik E.U., Paris H.S. (eds) Proceedings of Cucurbitaceae XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding. Warsaw, 24-28 lipca 2016: 217-221 <https://cucurbit.info/wp-content/uploads/2019/04/cuc2016proceedings.pdf>