

Badanie molekularnych mechanizmów odporności ogórka na najważniejsze czynniki biotyczne i abiotyczne

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

Wykonawcy: dr Marzena Nowakowska¹, dr Wojciech Szczechura¹, mgr Katarzyna Nowak¹,
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_8 populacji mapującej RIL wyprowadzonej ze skrzyżowania odpornej na *P. cubensis* linii PI 197088 z podatną linią PI 175695
- Ocena odporności na *P. cubensis* populacji mieszańcowych (F_1 , RF_1 , F_2 , Bc_1P_1 , Bc_1P_2) otrzymanych ze skrzyżowania odpornej linii PI 197088 z innymi dwoma źródłami odporności (Ames 2354, PI 330628)
- Ocena trwałości poziomej odporności na mączniaka rzekomego w wybranych materiałach ogórka
- Wytypowanie genów ulegających zróżnicowanej ekspresji pod wpływem stresu suszy na podstawie wyników sekwencjonowania transkryptomów dwóch linii ogórka o skrajnie zróżnicowanej reakcji na badany czynnik stresowy

Wszystkie cele zostały zrealizowane

Materiały i Metody

Temat badawczy 1

- 115 linii wsobnych populacji mapującej RIL F₇ (PI 197088 x PI 175695) w warunkach szklarniowych rozmnożono wsobnie metodą SSD (*Single Seed Descent*)
- ocena fenotypowa populacji mapującej RIL F₇ (wczesność, cechy morfologiczne nasienników)

P1
PI 197088



P2
PI 175695



Temat badawczy 2

- 5 populacji mieszańcowych: F₁, RF₁, F₂, Bc₁P₁, Bc₁P₂ dla każdej z dwóch kombinacji PI 330628 x PI 97088 i Ames 2354 x PI 197088 oraz 3 linie rodzicielskie odporne na *P. cubensis*: Ames 2354, PI 197088, PI 330628;
- doświadczenie polowe w warunkach naturalnej infekcji *P. cubensis* w dwóch lokalizacjach: **Skierniewice, Tarnów**
- doświadczenie szklarniowe w warunkach sztucznej inokulacji *P. cubensis*

Temat badawczy 3

- 6 linii odpornych 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: cztery lokalizacje: Raciborowice, Skierniewice, Tarnów, Markusy; naturalna infekcja *P. cubensis*, ocena odporności wg 10. stopniowej skali (0=brak objawów, 9= całkowite porażenie) w dwóch terminach



Temat badawczy 4

- bioinformatyczna analiza porównawcza odczytów sekwencjonowania RNAseq dla dwóch linii skrajnie różniących się reakcją na stres suszy **SU2-tolerancyjna**, **SU6 – wrażliwa** w warunkach optymalnego (kontrola) i ograniczonego nawadniania (2 punkty czasowe: 3 i 7 doba od momentu ograniczenia nawadniania):
usunięcie adapterów: Cutadapt
mapowanie odczytów do genomu referencyjnego *Cucumis sativus* Gy14 v2.0: Hisat2
analiza różnicowej ekspresji: pakiet DESeq2 w środowisku R
analiza terminów GO: pakiet topGO w środowisku R

WYNIKI

Temat badawczy 1: Mapowanie i charakterystyka QTL warunkujących odporność ogórka na *P. cubensis*

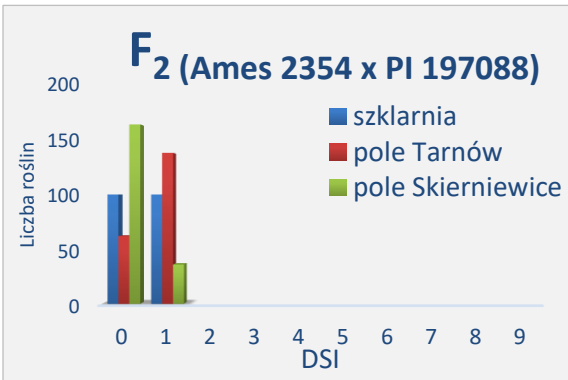
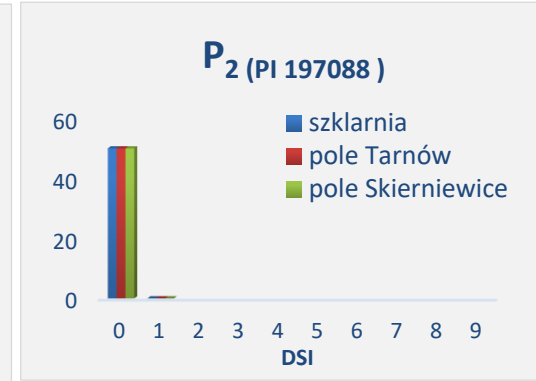
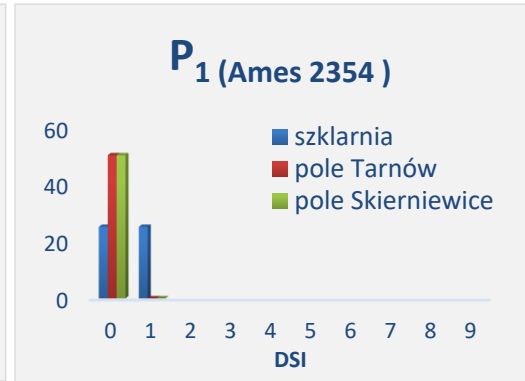
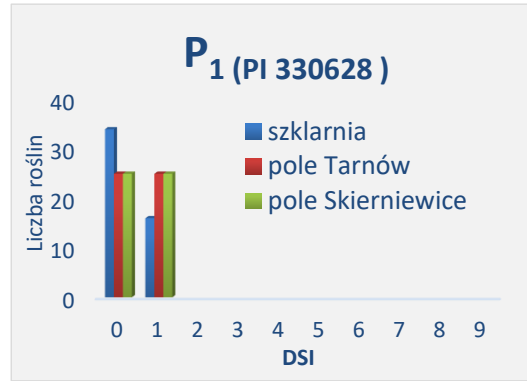
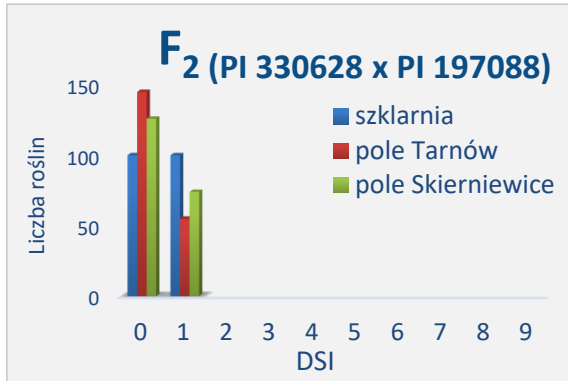
- ❑ W wyniku rozmnożenia wsobnego metodą SSD uzyskano nasiona pokolenia F₈ dla 115 linii populacji RIL pochodzącej ze skrzyżowania odpornej na *P. cubensis* linii PI 197088 z linią podatną PI 175695, co umożliwi realizację dalszych etapów badań.
- ❑ Na podstawie przeprowadzonego fenotypowania stwierdzono, że linie RIL pokolenia F₇ były zróżnicowane pod względem analizowanych cech.
- ❑ Największą zmienność rekombinacyjną obserwowano w przypadku cech morfologicznych nasiennej. Charakteryzowały się one różnorodnością kształtów: od kulistych do walcowatych; długością: od bardzo krótkich do długich i bogatą paletą barwy skórki począwszy od kremowej, poprzez beżową, karmelową, pomarańczową do brunatnej oraz brakiem lub różnorodną strukturą osiatkowania owocu.
- ❑ Stwierdzono, że cecha wczesności w populacji RIL F₇ ma rozkład normalny: 22% linii wczesnych, 15% późnych i 63% linii o pośrednim terminie zakwitania.



Zróżnicowanie linii RIL F7 pod względem cech morfologicznych nasiennej

WYNIKI

Temat badawczy 2: Określenie allelizmu czynników odporności na *P. cubensis* w różnych źródłach tej cechy



- ❑ Badania nad określeniem allelicznego charakteru czynników odporności ogórka na *P. cubensis* przeprowadzono w oparciu o rozkład fenotypów w pokoleniach mieszańcowych (F₁, RF₁, F₂, Bc₁P₁, Bc₁P₂) otrzymanych dla każdej z dwóch kombinacji: PI 197088 x PI 330628 oraz PI 197088 x Ames 2354.
- ❑ Nie obserwowano segregantów w pokoleniu F₂, ani w obu skrzyżowaniach wstecznych (Bc₁P₁, Bc₁P₂), a rozkład cechy w analizowanych populacjach był bardzo zbliżony do tolerancyjnych komponentów rodzicielskich i obejmował dwie klasy porażenia „0” i „1”, co sugeruje, że trzy nowe odporne linie ogórka: Ames 2354, PI 197088 i PI 330628 posiadają podobne uwarunkowania genetyczne cechy odporności na *P. cubensis*.

WYNIKI

Temat badawczy 2: Określenie allelizmu czynników odporności na *P. cubensis* w różnych źródłach tej cechy

- Zarówno linie rodzicielskie (PI 197088; PI 330628; Ames 2354), jak i ich populacje mieszańcowe (F1, RF1, F2, Bc1P1, Bc1P2) charakteryzowały się wysokim poziomem odporności na *P. cubensis* (DSI=0,0 – 1,2).
- Niezależnie od rodzaju skrzyżowania nie obserwowano istotnych różnic między wskaźnikami podatności DSI dla każdej populacji ocenianej w warunkach polowych zarówno w Tarnowie, jak i w Skierniewicach.

Rodzaj testu	Linia/ populacja mieszańcowa						
	P ₁	P ₂	F ₁	RF ₁	F ₂	Bc ₁ P ₁	Bc ₁ P ₂
Ames 2354 (P ₁) x PI 197088 (P ₂)							
I	0,5 a	0,0 a	0,7 a	1,2 b	0,5 a	1,2 b	0,5 a
II	0,0 a	0,0 a	0,5 a	0,3 a	0,7 a	0,4 a	0,4 a
III	0,0 a	0,0 a	0,3 a	0,0 a	0,2 a	0,0 a	0,0 a
PI 330628 (P ₁) x PI 197088 (P ₂)							
I	0,3 a	0,0 a	1,0 ab	1,0 ab	0,5 a	0,2 a	0,0 a
II	0,5 a	0,0 a	0,5 a	0,5 a	0,3 a	0,5 a	0,2 a
III	0,5 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,4 a	0,6 a	0,0 a
Średnia dla linii/mieszańca	0,3	0,0	0,5	0,5	0,4	0,5	0,2

I - warunki sztucznej inokulacji *P. cubensis* w szklarni

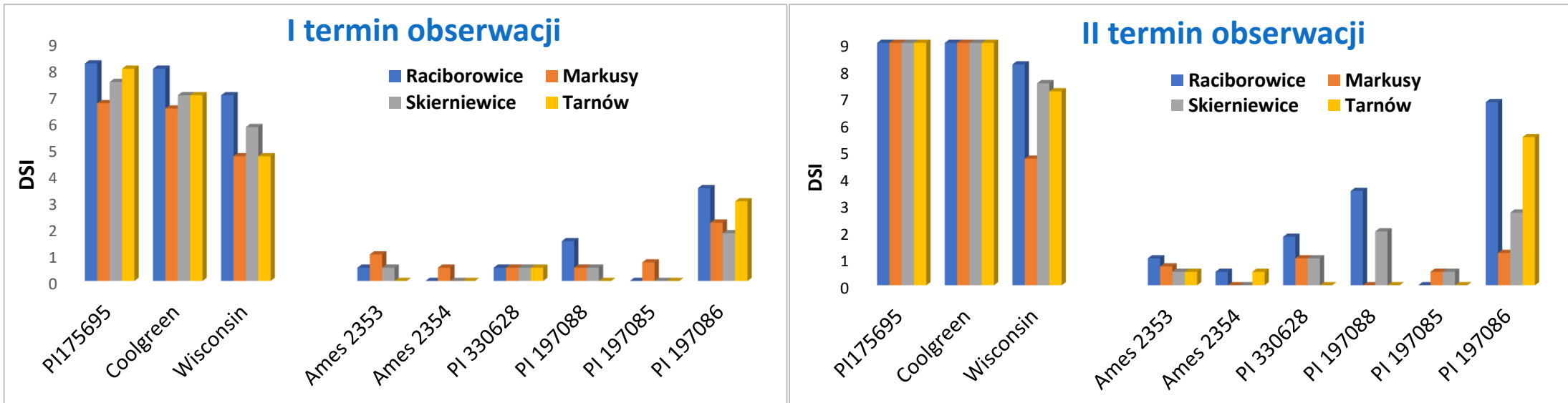
II - warunki naturalnej infekcji *P. cubensis* w polu - Tarnów

III - warunki naturalnej infekcji *P. cubensis* w polu - Skierniewice

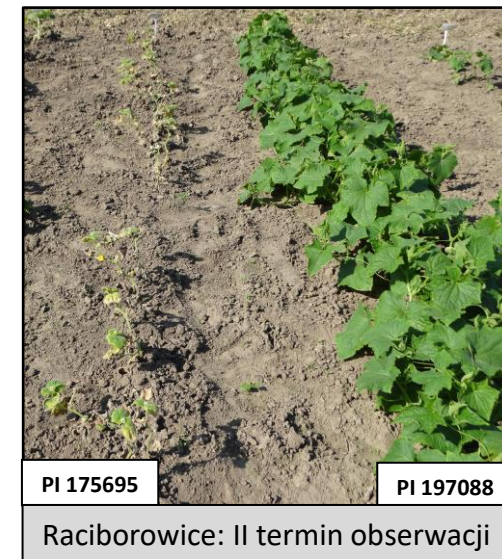
Ocena podatności wg 10. stopniowej skali bonitacji: 0 - brak objawów choroby, 9 - rośliny porażone w 100%



Temat badawczy 3: Badanie stabilności odporności na mączniaka rzekomego w nowo zidentyfikowanych odpornych genotypach ogórka



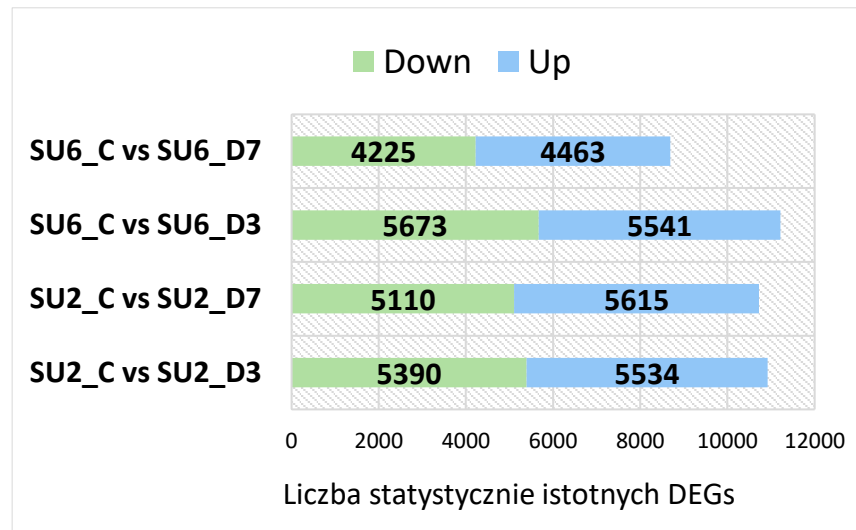
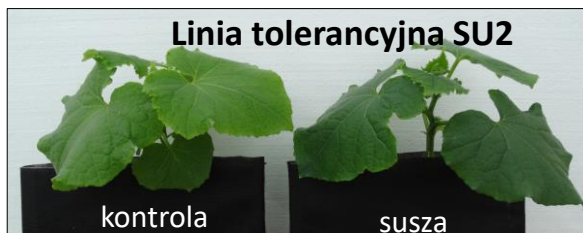
- ❑ Cztery (PI 330628, PI 197085, Ames 2354, Ames 2353) spośród sześciu badanych odpornych linii potwierdziły swój bardzo wysoki i stabilny poziom odporności na *P.cubensis* w czterech różnych rejonach Polski. Natomiast u odpornej linii PI 197086 stwierdzono najwyższy wskaźnik porażenia we wszystkich lokalizacjach.
- ❑ Natomiast odporna linia PI 197088 w Tarnowie i Markusach nie wykazała objawów mączniaka rzekomego, podczas gdy w Raciborowicach i Skierniewicach w II terminie zanotowano u niej DSI o wartości odpowiednio 3,5 i 2,0.
- ❑ Niezależnie od terminu obserwacji, najwyższe wskaźniki podatności stwierdzono w Raciborowicach, zarówno dla linii podatnych, jak i odpornych.



WYNIKI

Temat badawczy 4: Analiza porównawcza zmian w ekspresji genów pod wpływem stresu suszy w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem badanej cechy

- ❑ Zidentyfikowano od 8688 do 11214 genów o istotnie zróżnicowanej ekspresji (DEGs) z wzorem zmian uzależnionym od reakcji badanej linii na stres niedoboru wody.
- ❑ U wrażliwej linii SU6 najwięcej genów odnotowano w trzeciej dobie, a najmniej w siódmej dobie ograniczonego podlewania w porównaniu do roślin optymalnie nawadnianych.
- ❑ W porównaniu do linii SU6, u linii tolerancyjnej SU2 o ok. 3% mniej genów ulegało zróżnicowanej ekspresji w trzeciej dobie i o ok. 23% więcej - w siódmej dobie.
- ❑ Nie obserwowano znaczących różnic w procentowym udziale genów o podwyższonej i obniżonej ekspresji w całkowitej liczbie zidentyfikowanych genów.



Liczba zidentyfikowanych genów o podwyższonej (up) i obniżonej (down) ekspresji w analizowanych kombinacjach

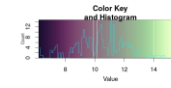


Diagram Venna przedstawiający zależności pomiędzy zidentyfikowanymi DEG o podwyższonej (a) i obniżonej (b) ekspresji pod wpływem stresu suszy u linii SU2 i SU6.

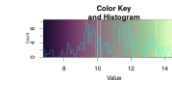
Temat badawczy 4: Analiza porównawcza zmian w ekspresji genów pod wpływem stresu suszy w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem badanej cechy

SU6_C vs SU6_D7

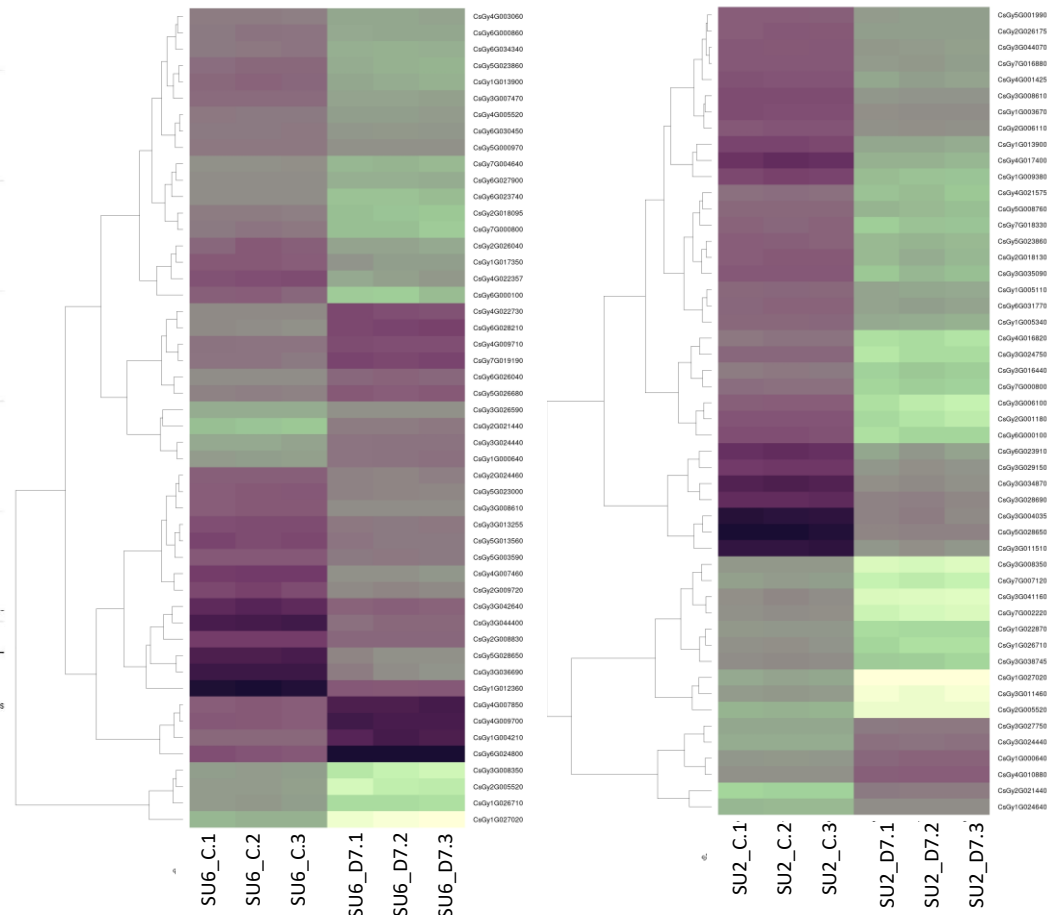
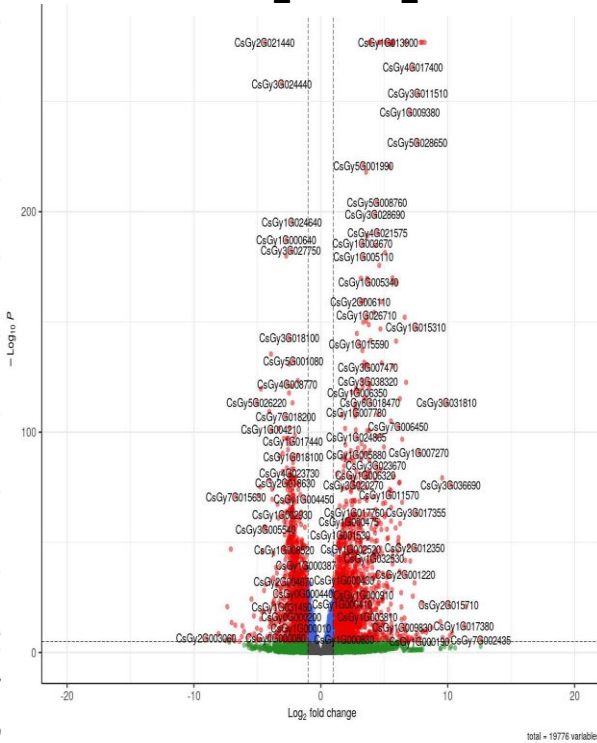
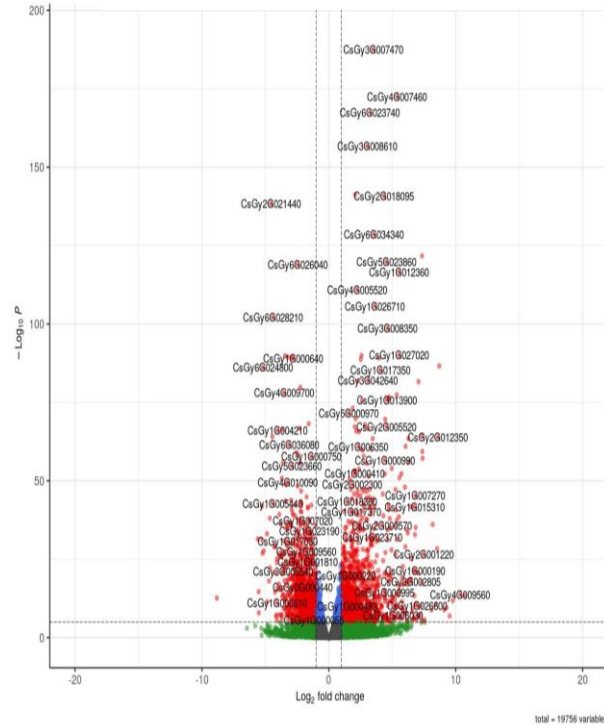
SU2_C vs SU2_D7



Mapa ciepła dla DEGs w SU6_C vs SU6_D7



Mapa ciepła dla DEGs w SU2_C vs SU2_D7



Wykres Volcano przedstawiający zależność \log_{10} FDR_adjusted_p_value (wartość p testu statystycznego na istotność zmiany ekspresji genu z uwzględnieniem poprawki dla wielokrotnego testowania); \log_2 Estimated_FoldChange (\log_2 z n-krotności zmiany ilości transkryptu próby badawczej względem próby kontrolnej)

Mapa ciepła dla 50 DEGs o najwyższej wartości FDR

WNIOSKI

- Fenotypowanie populacji RIL F₇ (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 bieżącym roku populacja mapująca RIL F₈ 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.
- Analiza allelizmu czynników determinujących odporność na *P. cubensis* wykazała, że trzy nowe odporne linie ogórka: **Ames 2354, PI 197088 i PI 330628** posiadają podobne uwarunkowania genetyczne cechy odporności na *P. cubensis*.
- Na podstawie stopnia porażenia badanych obiektów stwierdzono, że rozwój choroby przebiegał wolniej w północnej Polsce, co może być związane z mniej sprzyjającymi warunkami pogodowymi do rozwoju patogena panującymi w tej części kraju.
- Cztery odporne linie: PI 330628, PI 197085, Ames 2354, Ames 2353 potwierdziły wysoki i stabilny poziom odporności na *P. cubensis* w czterech różnych rejonach Polski. Natomiast u odpornej linii PI 197086 w II terminie obserwacji w Raciborowicach i Tarnowie stwierdzono objawy mączniaka rzekomego o wartości DSI odpowiednio 6,8 i 5,5, co może wskazywać na przełamanie odporności przez patogena u tej linii.
- Różnice we wzorze zmian ekspresji zidentyfikowanych genów w czasie zadawania stresu suszy pomiędzy tolerancyjną linią SU2 a wrażliwą SU6, szczególnie wyraźne w siódmej dobie, mogą sugerować bardziej złożoną późną odpowiedź obronną na stres niedoboru wody w linii tolerancyjnej w porównaniu z linią wrażliwą.