

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 100

Tytuł zadania: Doskonalenie ogórka (*Cucumis sativus* L.) pod względem odporności na kanciastą plamistość

Kierownik zadania: dr hab. Grzegorz Bartoszewski

Cel zadania

Celem badań w 2015 roku było uzyskanie danych sekwencyjnych i przygotowanie technik oraz materiałów biologicznych pozwalających w kolejnych latach podjąć próbę mapowania genów odporności na kanciastą plamistość liści ogórka oraz identyfikacji genów związanych z przebiegiem tej choroby. W ramach realizacji zadania wykonano sekwencjonowanie genomu wirulentnego szczepu *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* i złożono jego genom oraz przeprowadzono wstępną identyfikację rejonów przydatnych w diagnostyce molekularnej patogena. Wykonano rozmnożenie linii RIL F₅ stanowiących populację mapującą Gy14 × B10 i uzyskano nasiona oraz przetestowano w warunkach fitotronowych odporność tej populacji na kanciastą plamistość. W kolejnym etapie badań przetestowano zestaw markerów SSR i wytypowano te, które są przydatne do konstrukcji mapy genetycznej badanej populacji. Przygotowano DNA na potrzeby wysokoprzepustowego genotypowania populacji mapującej oraz rozpoczęto prace nad uzyskaniem odpowiedniej ilości RNA na potrzeby analizy transkryptomicznej odpowiedzi linii ogórka na infekcję *P.syringae* pv. *lachrymans*.

Materiały i metody

Materiałem badawczym w części dotyczącej patogena był szczep 814/98 *P. syringae* pv. *lachrymans* (*Psl* 814/98), który charakteryzuje się wysoką wirulencją. Do testowania starterów dla loci mikrosatelitarnych, mającego na celu wytypowanie potencjalnych markerów do wykorzystania w diagnostyce *Psl*, wykorzystano panel szczepów należących do patowarów *lachrymans*, *syringae* i *tomato*. Izolacje DNA i reakcje PCR przeprowadzono standardowymi technikami biologii molekularnej zaś sekwencjonowanie genomowe *Psl* 814/98 wykonano metodą Illumina.

Roślinnym materiałem badawczym było 130 linii RIL ogórka w pokoleniu F₅, uzyskanych ze skrzyżowania linii Gy14 (tolerancyjna na kanciastą plamistość) i linii B10 (wrażliwa). Rośliny do testów odpornościowych uprawiano w fitotronie, natomiast do wykonania samozapylenia oraz zebrania tkanki do badań molekularnych uprawiano w tunelu foliowym w warunkach optymalnych dla wzrostu roślin ogórka. Testy odporności na kanciastą plamistość przeprowadzono używając szczepu *Psl* 814/98 oraz własnej metodyki opracowanej wcześniej. Izolacje DNA i RNA wykonano z wykorzystaniem komercyjnych zestawów. Sekwencje starterów SSR do testowania na formach rodzicielskich i wybranych liniach RIL ogórka zaczerpnięto z literatury i wytypowano w oparciu o wstępne analizy bioinformatyczne. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR, jak i wizualizacja na żelu poliakrylamidowym, były dostosowane do tego typu markerów i producenta odczynników.

Wyniki i dyskusja

Wykonano izolację bakteryjnego DNA ze szczepu *Psl* 814/98 wytypowanego do zsekwencjonowania genomowego. Po dokładnym sprawdzeniu jakości wyizolowanego DNA wytypowano próbki do dalszych prac i na potrzeby sekwencjonowania skonstruowano dwie biblioteki DNA, które następnie zostały poddane sekwencjonowaniu z wykorzystaniem platformy Illumina HiSeq2000. Uzyskano odczyty o długości około 100 pz, które poddano obróbce bioinformatycznej. Łącznie uzyskano odczyty dobrej jakości o długości około 1056 Mpz. W wyniku składania odczytów otrzymano sekwencję genomu reprezentowaną przez 102 kontigi sekwencyjne, które następnie złożono w 35 scaffoldów. Wielkość genomu szczepu *Psl* 814/98 oszacowano na 6.58 Mb, a zawartość zasad GC na 57.97%, jednakże pewne obszary genomu pozostają niezsekwencjonowane. Uzyskanie pełnej sekwencji genomu wymaga dalszych prac na przykład sekwencjonowania uzupełniającego z wykorzystaniem technologii długich odczytów lub amplifikacji PCR niezsekwencjonowanych rejonów i sekwencjonowania uzyskanych produktów PCR.

Uzyskana sekwencja genomu została wykorzystana do identyfikacji powtórzeń bezpośrednich DNA. Wykorzystując metody bioinformatyczne zidentyfikowano trzy klasy powtórzeń: długie bezpośrednie powtórzenia, minisatelity i mikrosatelity. Łączna długość bezpośrednich powtórzeń stanowiła 50 kbp (mniej niż 1% genomu). Na podstawie wyników przyrównania sekwencji do sekwencji nukleotydowych i białkowych zdeponowanych w publicznych bazach NCBI i JGI oraz liczby powtórzeń w *locus* wytypowano 3 *loci* do wstępnego testowania przydatności diagnostycznej. Zaprojektowano 15 par starterów flankujących te *loci* mikrosatelitarne i przetestowano metodą PCR wykorzystując 8 dostępnych szczepów należące do *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* i *P. fluorescence* oraz szczep 814/98 jako kontrolę. Wykonano także sekwencjonowanie amplikownów dla szczepów *P. syringae* pv. *lachrymans*. Wstępna ocena trzech *loci* mikrosatelitarnych sugeruje, że wśród szczepów *Psl* występują dwie grupy szczepów: pierwszą stanowią szczepy *Psl* 814/98, CCM2757 i BG283, zaś drugą szczepy LMG5070 i BG966 wykazujące podobieństwo do *P. syringae* pv. *tomato*. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze badania i ocenę zróżnicowania genetycznego wykonaną metodą MLST. Pięć testowanych par starterów wykazało przydatność diagnostyczną gdyż uzyskano produkty amplifikacji tylko dla pierwszej grupy szczepów: silnie wirulentnych *Psl* 814/98 i CCM2857 oraz u awirulentnego szczepu *Psl* BG283. W przypadku jednej pary starterów uzyskano produkty amplifikacji dla wszystkich szczepów z grupy *Psl* i dla Pst3 przynależnego do *P. syringae* pv. *tomato*. Przetestowano wstępnie reakcje multipleks PCR z dwoma parami starterów diagnostycznych, stosując jako kontrolę pozytywną startery specyficzne do rejonu ITS i potwierdzono ich przydatność diagnostyczną umożliwiającą identyfikację szczepów z pierwszej grupy.

Badając 130 linii RIL F₅ stanowiących populację mapującą Gy14 × B10 oceniono dla każdej linii cztery cechy: płeć roślin, barwę kolców, liczbę nasienników oraz liczbę uzyskanych nasion. Ocena płci roślin w badanej populacji pokazała, że wśród 130 linii RIL 55 stanowią linie żeńskie, zaś 75 jednopienne. Jest to spodziewany wynik, gdyż linia mateczna populacji (Gy14) jest żeńska, zaś ojcowska (B10) jednopienna. W przypadku linii żeńskich niezbędne było azotanowanie aby uzyskać nasiona w wyniku samozapylenia. Obserwacje barwy kolców owoców pokazały, że 68 linii posiadało ciemne kolce, zaś 62 linie kolce białe. Jest to oczekiwany wynik, gdyż linia mateczna Gy14 posiada białe kolce zaś linia ojcowska B10 kolce czarne. Test statystyczny chi² potwierdził segregację 1:1 tych dwóch cech, co świadczy o właściwej strukturze genetycznej populacji Gy14 × B10. Dla 124 linii spośród 130 badanych uzyskano nasienniki i oszacowano liczbę uzyskanych nasion. Liczba uzyskanych nasion w poszczególnych nasiennikach była zróżnicowana i wahała się od 30 do 497 sztuk i w dużym stopniu zależała od płci roślin - niższą liczbę nasion w nasienniku uzyskiwano dla roślin żeńskich.

Testom patogeniczności poddano 110 linii RIL F₅ populacji Gy14 × B10. Stopień nasilenia objawów chorobowych określano w oparciu o skalę bonitacyjną. Jako standard tolerancyjny i wrażliwy w ocenie posłużyły linie rodzicielskie Gy14 i B10. Linia Gy14 charakteryzowała się średnią odpornością na kanciąstą plamistość: na porażonych liściach obserwowano drobne lub średniej wielkości plamy nekrotyczne przypominające reakcję nadwrażliwości. Linia B10 wykazywała podatność na kanciąstą plamistość. Na porażonych liściach pojawiały się duże, początkowo silnie uwodnione plamy, przechodzące w nekrozy z pojawiającymi się wyciekami bakteryjnymi. Wokół nekroz pojawiały się intensywne, rozległe chlorozy. Spośród badanych 110 linii RIL 51 charakteryzowało się wyraźnie odciętym przejaśnieniem wokół nekroz i tolerancją, zaś 55 wykazywało rozmyte i rozległe chlorozy typowe dla podatności na kanciąstą plamistość liści ogórka. Zakres ocen stopnia porażenia RIL scharakteryzowanych jako typ Gy14 (tolerancyjny) od 5,3 do 6,6 natomiast typ linii B10 (wrażliwy) od 2,8 do 4,9. Testowane rozszczepienie fenotypowe 1:1 w odniesieniu do reakcji odpornościowej zweryfikowane testem chi² potwierdziło, że cecha ta jest determinowana monogenicznie. Wyniki testów w obrębie linii RIL potwierdziły też, że populacja Gy14 × B10 osiągnęła wysoki poziom homozygotyczności, a linie wchodzące w jej skład są wyrównane genetycznie.

Dostępność sekwencji genomów ogórka linii B10 i Gy14 pozwoliła na zastosowanie analizy bioinformatycznej do porównania sekwencji *loci* mikrosatelitarnych i identyfikacji, spośród dostępnych w literaturze, markerów SSR różnicujących te linie. Wytypowano w ten sposób zestaw

markerów SSR polimorficznych *in silico*. Spośród tych markerów wytypowano 160, zsyntetyzowano startery i przetestowano doświadczalnie na liniach rodzicielskich oraz ośmiu wybranych liniach RIL. Potwierdzono polimorfizm dla 103 markerów SSR. Zakres wielkości amplikonów dla testowanych markerów SSR wynosił od 107 do 460 pz, natomiast różnice w wielkości amplikonów między liniami rodzicielskimi wahały się od 2 do 60 pz, przy czym dla większości markerów był to zakres od 2 do 10 pz. Liczba markerów dla poszczególnych chromosomów była nierównomierna. Najwięcej markerów zidentyfikowano dla chromosomu 3 zaś najmniej dla chromosomu 2. Przetestowano 52 markery SSR na całej populacji i wykazano przydatność 46 markerów do konstrukcji mapy genetycznej ogórka. Dla każdego spośród tych markerów segregację 1:1 potwierdzono testem statystycznym χ^2 . Istnieje potrzeba dalszego testowania markerów SSR na całej populacji mapującej na potrzeby konstrukcji mapy genetycznej. Na podstawie charakterystyki cech morfologicznych (płec, barwa kolców), dostępności nasion oraz wyników testowania na kanciastą plamistość populacji Gy14 × B10 wytypowano 96 linii (94 RIL i 2 linie rodzicielskie) na potrzeby analizy genotypowania z wykorzystaniem sekwencjonowania. Zgodnie z instrukcjami firmy genotypującej wyizolowano DNA i wykonano rozcieńczenia DNA. Potwierdzono stabilność DNA poprzez sprawdzenie czy nie ulega degradacji w temperaturze 37°C. Wysokoprzepustowa analiza genotypowania powinna umożliwić zagęszczenie mapy genetycznej badanej populacji mapującej ogórka.

Zastosowanie komercyjnego zestawu do izolacji RNA pozwoliło otrzymać RNA dla wszystkich badanych prób zbiorczych dla linii B10 i Gy14. Otrzymano RNA o dobrej jakości o zakresie koncentracji od 15,0 do 59,1 ng/ μ l. Potrzebna jest dalsza optymalizacja metody izolacji RNA w celu zwiększenia koncentracji i całkowitej ilości uzyskiwanego RNA.

Wnioski

1. Uzyskano dobrej jakości sekwencję genomu wirulentnego szczepu *Psl* 814/98. Sekwencja ta umożliwiła zidentyfikowanie *loci* mikrosatelitarnych. Niezbędne są dalsze analizy bioinformatyczne i wykonanie adnotacji funkcjonalnej.
2. Oceniono przydatność diagnostyczną trzech *loci* mikrosatelitarnych patogena, jednakże opracowanie systemu diagnostycznego w oparciu o takie *loci* wymaga dalszych prac i analizy większej liczby *loci* mikrosatelitarnych oraz szczepów.
3. Ocena populacji mapującej Gy14 × B10 pod względem cechy odporności na bakteryjną kanciastą plamistość wskazuje, że populacja ta osiągnęła wysoki poziom homozygotyczności, a linie wsobne wchodzące w jej skład są wyrównane genetycznie. Umożliwia to wykorzystanie tej populacji do mapowania genów odporności/tolernacji na kanciastą plamistość liści ogórka.
4. Uzyskano nasiona dla 124 linii RIL pokolenia F₆, które będą wykorzystane w dalszych etapach realizacji projektu. Potwierdzono spodziewaną segregację cech odporności koloru kolców i płci kwiatów, co świadczy o poprawnej strukturze genetycznej populacji mapującej.
5. Wysoki udział polimorficznych markerów SSR potwierdza przydatność analizy bioinformatycznej *loci* mikrosatelitarnych w celu typowania markerów SSR na potrzeby mapowania genetycznego.
6. Spośród 52 markerów SSR przetestowanych w populacji mapującej Gy14 × B10 wykazano przydatność 46 markerów do konstrukcji mapy genetycznej tej populacji ogórka, jednakże konieczne jest dalsze mapowanie markerów SSR.
7. Przygotowane próbki DNA dla 94 RIL oraz linii rodzicielskich spełniają wymogi dotyczące stabilności i jakości, co pozwala wykorzystać je w analizie wysokoprzepustowego genotypowania.
8. RNA wyizolowane z roślin porażonych przez *P. syringae* pv. *lachrymans* charakteryzuje się dobrą jakością i czystością, jednakże istnieje potrzeba optymalizacji metodyki izolacji w celu podwyższenia koncentracji i ilości uzyskiwanego RNA.