

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 2016 roku, w części poświęconej patogenowi, było wykonanie adnotacji funkcjonalnej i porównawczej zsekwencjonowanego genomu szczepu Psl814/98, jak również identyfikacja plazmidów i czynników wirulencji patogena. W części poświęconej badaniom z wykorzystaniem materiału roślinnego wykonano testy odporności linii RIL pokolenia F₆ na bakteryjną kanciastą plamistość, jak również rozmnożono te linie otrzymując nasiona kolejnego pokolenia. Testowanie kolejnego nowego zestawu markerów SSR pozwoliło na wytypowanie kolejnych polimorficznych markerów przydatnych w mapowaniu genów odporności na kanciastą plamistość. Ponadto wykonano genotypowanie DArT-seq identyfikując zestaw polimorficznych markerów SNP. Markery SSR po uzupełnieniu markerami SNP pozwolą na skonstruowanie mapy genetycznej i poszukiwanie markerów genów odporności na kanciastą plamistość. W części poświęconej interakcji patogen-roślina, w 2016 roku kontynuowano prace nad analizą transkryptomyczną odpowiedzi linii Gy14 i B10 ogórka na infekcję *P. syringae* pv. *lachrymans*. Wykonano analizę RNA-seq i otrzymano dane transkryptomiczne dla dwóch linii w trzech punktach czasowych infekcji. Wszystkie cele badań zaplanowane na rok 2016 zrealizowano w całości.

Materiały i metody

Materiałem badawczym w części dotyczącej patogena był zsekwencjonowany w poprzednim roku genom szczepu Psl814/98 *P. syringae* pv. *lachrymans*, charakteryzujący się wysoką wirulencją. Przeprowadzone w tej części analizy zostały wykonane *in silico* przy użyciu ogólnodostępnych programów i narzędzi bioinformatycznych. Roślinnym materiałem badawczym były linie RIL ogórka w pokoleniu F₆, uzyskane ze skrzyżowania linii Gy14 i B10. Rośliny do testów odpornościowych uprawiano w fitotronie, natomiast do wykonania samozapylenia linii RIL oraz zebrania tkanki roślinnej do badań molekularnych uprawiano w tunelu foliowym w warunkach optymalnych dla wzrostu roślin ogórka. Tak jak w poprzednim roku, testy odporności na kanciastą plamistość przeprowadzono inokulując rośliny szczepem Psl814/98. Izolacje DNA i RNA na potrzeby analiz molekularnych wykonano z wykorzystaniem zestawów komercyjnych. Warunki reakcji PCR i typowania sekwencji starterów SSR były takie jak w poprzednim roku projektu. Genotypowanie DArT-seq populacji mapującej wykonano usługowo podobnie jak sekwencjonowanie Illumina RNA-seq dla odpowiedzi ogórka na infekcję Psl814/98. Wyniki DArT-Seq i RNA-seq analizowano wstępnie wykorzystując program MS Excel. Testowanie przydatności genów referencyjnych na potrzeby analiz ekspresji genów w czasie patogenezы wykonano metodami RT-PCR i Real-Time PCR.

Wyniki i dyskusja

W genomie szczepu Psl814/98 zsekwencjonowanym w poprzednim roku badań zidentyfikowano 6024 geny kodujące białka. Średnia długość genu wynosiła 934 pary zasad, przy czym około 400 genów było dłuższych niż 2000 par zasad. Całkowita długość sekwencji genów kodujących białka wynosiła około 5,63 miliona par zasad. W przypadku genów kodujących RNA w sumie zidentyfikowano 92 geny, z czego 62 to geny kodujące tRNA, 16 rRNA i 14 sRNA. Łącznie zidentyfikowano więc 6116 genów, co pozwoliło stwierdzić, że rejony kodujące genomu Psl814/98 stanowią około 86% zaś niekodujące 14%. Adnotacja funkcjonalna genów kodujących białka, wykonana przez przyrównanie sekwencji przewidywanych genów do sekwencji genów zdeponowanych w bazach danych, wykazała, że w genomie Psl814/98 można zidentyfikować ponad 20 klas genów, spośród których najliczniejsze są klasy genów związanych z transportem błonowym oraz metabolizmem aminokwasów i węglowodanów. Porównanie genomu Psl814/98 do genomów Psl L106 i Psl L107 pokazało większe podobieństwo genomu 814/98 do genomu Psl L107. Ponadto w genomie Psl814/98 stwierdzono występowanie kilku unikalnych rejonów. W związku z tym, że wirulencja bakterii jest często związana z obecnością plazmidów wykonano przyrównanie sekwencji genomu Psl814/98 do sekwencji plazmidów występujących u bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Przyrównanie pokazało podobieństwo części skafoldów do plazmidów patowarów *P. syringae*: *lachrymans*, *tomato*, *phaseolicola*, *maculicola*, *syringae*, *glycinea*, *aesculi* i *actinidiae*. W analizie BLAST wyodrębniono skafoldy 8 i 9, które prezentowały wysokie podobieństwo do kilku plazmidów należących do *P. syringae* (lokalnie powyżej 97%). Otrzymane wyniki sugerują, że skafoldy te reprezentują dwa niezależne plazmidy, co potwierdzono identyfikując w tych skafoldach miejsca inicjacji replikacji (ori). Wynik ten potwierdzono także mapując odczyty sekwencyjne na złożonych skafoldach wśród których skafoldy 8 i 9 charakteryzowały się kilkukrotnie wyższym pokryciem odczytami sekwencyjnymi w stosunku do chromosomowych. Identyfikacja komponentów związanych z reakcją patogen-gospodarz pozwoliła wskazać 24 efekторы należące do systemu sekrecji typu trzeciego (T3SS) występujące w szczepie Psl814/98. Zidentyfikowano trzy typy efektorów: (1) występujące we wszystkich genomach referencyjnych *P. syringae* (DC3000, 1448A, B728a), które mogą stanowić efekторы typowe dla *P. syringae*, (2) efekторы występujące w

jednym lub w dwóch z trzech genomów referencyjnych oraz (3) efekторы, których nie wyodrębniono w genomach referencyjnych i można je wstępnie uznać za zestaw efektorów unikalny dla patowaru *lachrymans*. Konieczna jest jednak dalsza analiza bioinformatyczna genomu Ps1814/98 i porównanie do genomów innych patowarów należących do *P. syringae*, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmu porażenia ogórka przez patowar *lachrymans*.

Nasiona 124 linii RIL F₆ stanowiących populację mapującą Gy14 × B10 oraz linii rodzicielskich wysiano, uzyskując rozsądę dla 121 linii RIL i 2 linii rodzicielskich (nasiona 3 linii nie skiełkowały). Stwierdzono, że 50 linii tworzyło tylko kwiaty żeńskie (stanowiąc tzw. linie żeńskie), a 71 linii tworzyło głównie kwiaty męskie i pojedyncze żeńskie na tej samej roślinie (stanowiąc tzw. linie jednopienne). Wyniki te są zgodne z uzyskanymi w pokoleniu F₅. Oceniając barwę kolców owoców stwierdzono, że 62 linie RIL tworzyły owoce o ciemnych kolcach, zaś 59 linii RIL owoce o białych kolcach. Potwierdzono segregację tych cech 1:1 testem χ^2 .

Po osiągnięciu dojrzałości zebrano nasienne 121 linii RIL, uzyskane w wyniku ręcznego samozapylenia kwiatów. Łącznie uzyskano 203 nasienne, przy czym dla 82 linii uzyskano po dwa nasienne, zaś dla 39 linii po jednym. Po oczyszczeniu i policzeniu wszystkich dobrze wykształconych nasion stwierdzono, że ze wszystkich nasiennek 121 linii RIL pokolenia F₆ uzyskano nasiona pokolenia F₇. Liczba nasion poszczególnych linii była jednak bardzo zróżnicowana i zawierała się w przedziale od 3 do 700 sztuk dla danej linii RIL.

Przeprowadzono testy odporności linii RIL na kanciąstą plamistość stosując taką samą metodykę jak w poprzednim roku. Linia Gy14 charakteryzowała się odpornością lub średnią odpornością. Na porażonych liściach występowały drobne lub średniej wielkości plamy nekrotyczne przypominające reakcję nadwrażliwości, a udział porażonej powierzchni liści wahał się od 8 do 25%. Linia B10 wykazywała podatność na kanciąstą plamistość. Na porażonych liściach pojawiały się duże, początkowo silnie uwodnione plamy nekrotyczne z wyciekami bakteryjnymi. Wokół nekroz pojawiały się intensywne, rozległe i bardzo charakterystyczne chlorozy. Stopień nasilenia objawów sięgał od 50% do 75%. Spośród testowanych 110 linii, 48 charakteryzowało się wyraźnie odciętym przejaśnieniem wokół nekroz i tolerancją (typ linii Gy14), a 60 linii wykazywało rozmyte, rozległe chlorozy i podatność na kanciąstą plamistość liści ogórka (typ linii B10). Dla dwóch linii nie udało się wykonać jednoznacznej oceny. Największą podatnością na patogena charakteryzowały się linie RIL 55 i 87. Średnia ocena stopnia porażenia tych roślin wynosiła 3,5. Z kolei największy poziom odporności na patogena wykazywała linia RIL 6, dla której stopień porażenia został oceniony na 6,5. Rozszczepienie fenotypowe 1:1 w odniesieniu do typu reakcji odpornościowej obserwowanej w postaci obecności lub braku chlorotycznego halo potwierdzono statystycznie testem χ^2 .

Kontynuowano prace nad identyfikacją markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej. W wyniku przetestowania w 2016 roku nowego zestawu 90 markerów SSR otrzymano zestaw 40 markerów wykazujących polimorfizm na liniach rodzicielskich i 8 liniach RIL. Stopień polimorfizmu (44%) był nieco niższy w porównaniu z wynikami z roku 2015, jednak nadal można ten wynik uznać za zadowalający. Dla porównania Yang i inni (2012) z zestawu 1266 markerów SSR opracowanych przez Ren i inni (2009) wskazali 731 markerów SSR (57%) potencjalnie różnicujących linie Gy14 i 9930, jednakże eksperymentalnie polimorfizm potwierdzono jedynie dla 312 markerów SSR (25%). Testowanie markerów SSR na całej populacji mapującej Gy14 × B10 pozwoliło uzyskać 57 nowych markerów segregujących w stosunku 1:1, przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej. W przypadku testowania markerów na całej populacji mapującej stopień polimorfizmu wynosił 81%, co można uznać za wynik satysfakcjonujący. Dla porównania w roku 2015 testowano 52 markery SSR, spośród których 88% wykazało przydatność do konstrukcji mapy genetycznej. W sumie w latach 2015 i 2016 przetestowano na całej populacji mapującej 122 markery SSR, z których 103 wykazało przydatność do konstrukcji mapy genetycznej (84%). Otrzymany zestaw markerów SSR stanowi podstawę do dalszych prac związanych z konstrukcją mapy genetycznej.

Przeprowadzono genotypowanie DArT-seq populacji mapującej Gy14 × B10. Przygotowane w poprzednim roku do genotypowania DArT-seq DNA było stabilne, co pozwoliło na udane przeprowadzenie analizy i zidentyfikowanie 3027 markerów DArT-seq, wśród których występowały markery typu polimorfizm pojedynczych nukleotydów SNP (ang. single nucleotide polymorphism) oraz wygenerowane bioinformatycznie markery typu *Insilico* DArT. Spośród wszystkich markerów 2161 (88% całości) różnicowało jednoznacznie linie rodzicielskie, zaś 1906 (63% markerów) segregowało 1:1 w populacji mapującej. Segregację dla tych markerów potwierdzono testem statystycznym χ^2 . Otrzymano zbliżoną liczbę segregujących markerów typu SNP i *Insilico* DArT (964 markery SNP i 942 markery *Insilico* DArT). W obrębie markerów SNP otrzymano markery należące do wszystkich możliwych typów substytucji nukleotydowych, zarówno tranzycji i jak i transwersji. Liczniejszą grupę stanowiły markery o charakterze tranzycji - 61%, podczas gdy markery SNP o charakterze transwersji stanowiły 39%. Największą grupę markerów SNP stanowiły markery o charakterze tranzycji typu G>A i C>T. Uzyskane markery DArT-seq pozwolą na zageszczenie mapy genetycznej populacji Gy14 × B10 ogórka.

Zoptymalizowano procedurę izolacji RNA co pozwoliło na otrzymanie RNA wysokiej jakości wymaganej do sekwencjonowania RNA-seq. W wyniku sekwencjonowania RNA-seq na platformie Illumina HiSeq otrzymano

odczyty dla dwóch linii rodzicielskich ogórka (Gy14 i B10), w trzech punktach czasowych, tj.: przed inokulacją, 1 i 3 dni po inokulacji. Odczyty te miały dobrą jakość. Uzyskano około 44,5 miliona czystych odczytów sekwencyjnych o całkowitej wielkości 4,47 Gpz dla każdej próby. Dla porównania liczba otrzymanych odczytów ogórka porażonego *Botrytis cinerea* wynosiła ponad 33Mb o wielkości 4,14 Gpz, a jakość odczytów była niższa (Kong i in. 2015). Na potrzeby analizy transkryptomów metodą Real-Time PCR wybrano startery genów referencyjnych *CACS*, *TIP41* i *Ubi-ep* do przeprowadzenia wstępnych badań. Dla wszystkich par starterów otrzymano produkty amplifikacji. Liczba przetestowanych genów referencyjnych jest jednak na razie niewystarczająca. Aby można było rzetelnie i wiarygodnie wytypować najlepsze geny referencyjne konieczne jest przetestowanie większej liczby genów referencyjnych.

Wnioski

1. Bioinformatyczna adnotacja funkcjonalna wykazała, że w genomie Psl814/98 występuje 6116 genów i należą one do ponad 20 różnych klas funkcjonalnych, spośród których najliczniej reprezentowane są klasy genów kodujących białka związane z transportem błonowym oraz metabolizmem aminokwasów i węglowodanów.
2. Na poziomie genomu szczep Psl814/98 wykazuje podobieństwo do Psl L107, charakteryzującego się silną wirulencją.
3. Skafoldy 8 i 9 genomu Psl814/98 reprezentują najprawdopodobniej dwa plazmidy występujące w szczepie Psl814/98.
4. Dla szczepu Psl814/98 zidentyfikowano 24 efekторы wirulencji, z których 8 występowało tylko w szczepie Psl814/98 patowaru *lachrymans*.
5. Uzyskując segregację cech płci kwiatów i barwy kolców 1:1 potwierdzono wyniki z poprzedniego roku, co świadczy o poprawnej strukturze genetycznej populacji mapującej Gy14 × B10. Jednocześnie rozmnożono 121 linii RIL F₆ populacji mapującej Gy14 × B10 i uzyskano nasiona pokolenia F₇.
6. W drugim roku doświadczeń potwierdzono, że linie RIL populacji mapującej Gy14 × B10 charakteryzują się dwoma odmiennymi typami reakcji na infekcję silnie wirulentnym szczepem Psl814/98, tj.: typem linii Gy14 i typem linii B10 segregującymi w stosunku 1:1.
7. Ocena populacji mapującej Gy14 × B10 pod względem odporności na bakteryjną kanciastą plamistość wskazuje, że populacja osiągnęła wysoki poziom homozygotyczności i zdecydowana większość linii wsobnych wchodzących w jej skład jest wyrównana genetycznie.
8. Na podstawie testowania 90 markerów SSR na liniach rodzicielskich i 8 wybranych liniach RIL zidentyfikowano 40 polimorficznych markerów SSR, wykazując nieco niższy niż dotychczas otrzymywany, ale nadal satysfakcjonujący polimorfizm (44%).
9. Spośród 70 markerów SSR przetestowanych na populacji mapującej RIL Gy14 × B10 wykazano przydatność 57 markerów do konstrukcji mapy genetycznej ogórka, znacząco zwiększając dotychczasową pulę takich markerów.
10. Uzyskany w wyniku genotypowania DArT-seq zestaw markerów SNP pozwala na wykorzystanie ich w konstrukcji mapy genetycznej populacji Gy14 × B10 oraz w mapowaniu genów związanych z tolerancją/odpornością na kanciastą plamistość ogórka.
11. Uzyskano dobrej jakości odczyty sekwencyjne RNA-seq dla transkryptomów dwóch linii ogórka Gy14 i B10, przed inokulacją oraz 1 i 3 dni po inokulacji szczepem 814/98, które będą wykorzystane w dalszych etapach realizacji zadania.
12. Przetestowanie metodą Real-Time PCR trzech genów referencyjnych wskazuje, że należy przetestować znacznie więcej genów by móc wskazać stabilne geny referencyjne przydatne w badaniach ekspresji genów ogórka podczas porażenia przez *P. syringae* pv. *lachrymans*.