

Cel zadania

Głównym celem pracy w 2017 roku była konstrukcja mapy genetycznej ogórka w oparciu o wyniki genotypowania SSR i DArT-seq uzyskane w latach poprzednich. Rejony mapy związane z podatnością na kanciastą plamistość ogórka były w bieżącym roku dodatkowo zagęszczone polimorficznymi markerami SSR. Wykonano statystyczne opracowanie dwuletnich wyników testowania odporności na kanciastą plamistość linii RIL pokolenia F₅ i F₆, stanowiących populację mapującą Gy14 × B10. Przeprowadzono identyfikację genów referencyjnych na potrzeby Real-Time RT-PCR i wstępną analizę wyników transkryptomicznych RNA-seq odpowiedzi ogórka na infekcję *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. W ramach sekwencjonowania i składania genomu wirulentnego szczepu 814/98 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* wykonano analizy bioinformatyczne unikalnych rejonów genomu i oceniono ich przydatność diagnostyczną.

Cele we wszystkich częściach zadania udało się osiągnąć w całości.

Materiały i metody

Do konstrukcji mapy genetycznej wykorzystano markery SSR i DArT-seq segregujące w populacji mapującej Gy14×B10 w stosunku 1:1. Mapę genetyczną skonstruowano w programie JoinMap 4.0 przy zastosowaniu funkcji Haldane'a i minimalnej wartości LOD=8. Dla markerów DArT-seq wykonano analizy bioinformatyczne, umożliwiające przypisanie ich do poszczególnych chromosomów. Nasilenia objawów (DSI) wykorzystano do identyfikacji QTL stosując mapowanie interwałowe. Prawdopodobieństwo występowania QTL w określonym przedziale mapowym zweryfikowano na podstawie analizy krzywej wartości LOD, gdzie maksimum krzywej LOD wynosiło 4.0 przy poziomie istotności $\alpha=0,01$. W celu zagęszczenia rejonów występowania genów związanych z odpornością na kanciastą plamistość ogórka zidentyfikowano dodatkowe loci mikrosatelitarne. Dla 49 polimorficznych loci mikrosatelitarnych zaprojektowano startery SSR w programie Primer3. Ocenę poziomu odporności na kanciastą plamistość linii RIL i populacji mapującej Gy14 × B10 analizowano w programie Statistica (hipotezę o braku istotnych różnic pomiędzy latami zweryfikowano testem U-Manna-Whitneya, a korelację między obecnością/brakiem chlorotycznego halo i wskaźnikiem DSI obliczono za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana). Wykonano analizę wyników transkryptomicznych RNA-seq odpowiedzi ogórka na infekcję *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* i identyfikację genów referencyjnych na potrzeby analiz Real-Time PCR weryfikujących dane transkryptomiczne. Dla sekwencji genomu *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 814/98 wykonano analizy unikalnych rejonów. Dla dwóch genów plazmidowych (*rep*, *traY*) i dla ośmiu efektorów T3SS zaprojektowano startery PCR i przetestowano z wykorzystaniem panelu szczepów *Pseudomonas*.

Wyniki i dyskusja

Statystyczne opracowanie wyników z dwóch lat testów podatności linii na kanciastą plamistość w populacji mapującej Gy14×B10 potwierdziło, że linie RIL są wyrównane i wykazują wysoki poziom homozygotyczności. Ocena obecności chlorotycznego halo związanego z genem *psl* w obu latach testów była zbieżna dla 103 ze 110 badanych linii. Ocena DSI dla 100 ze 110 linii nie wykazała statystycznie istotnych różnic. Na podstawie współczynnika rang Spearmana potwierdzono korelację między obecnością lub brakiem chlorotycznego halo a wskaźnikiem DSI. Linie RIL bez chlorotycznego halo mają znacznie wyższy wskaźnik DSI niż linie z chlorozami, czyli przy wyższym wskaźniku DSI istnieje mniejsze prawdopodobieństwo występowania chloroz. Statystyczne opracowanie wyników potwierdziło przydatność badanej populacji mapującej do konstrukcji mapy genetycznej i zasadność wykorzystania jej do mapowania genów związanych z kanciastą plamistością ogórka.

Do konstrukcji mapy wykorzystano 546 polimorficznych markerów, dla których zweryfikowano segregację 1:1 testem χ^2 . Wykorzystano cztery typy markerów: SSR, SNP, *in silico* DArT oraz markery morfologiczne (barwa kolców, żeńskość i cechę obecności lub brak chlorotycznego halo związaną z genem *psl*). Skonstruowana mapa ma siedem grup sprzężeń i długość całkowitą 707,1 cM o średniej odległości między markerami 1,3 cM. Długość grup sprzężeń waha się od 70,5 cM (LG_7) do 140,1 cM (LG_3) przy średniej odległości pomiędzy markerami od 0,76 (LG_7) do 1,77 (LG_6). Liczba markerów tworzących poszczególne grupy sprzężeń była zróżnicowana i waha się od 50 markerów dla grupy 2 do 105 dla grupy 3. Liczba grup sprzężeń odpowiada siedmiu chromosomom ogórka. Grupy sprzężeń przypisano do chromosomów w oparciu o markery SSR, dla których znana jest lokalizacja chromosomowa (Ren i in. 2009, Yang i in. 2012, Shen i in. 2015). Z kolei wykonując analizy BLAST dla markerów DArT-seq (SNP, *in silico* DArT) przypisano je do poszczególnych chromosomów (na podstawie genomu linii Gy14). Udało się zmapować gen *psl*, oznaczający obecność (cecha dominująca) lub brak (cecha recesywna) halo wokół plamy nekrotycznej na liściu oraz cechy ilościowe (QTL) związane z nasileniem objawów kancastej plamistości (na podstawie wskaźnika DSI).

Stwierdzono, że zarówno gen *psl*, jak i dwa QTL-e (oznaczone *psl 5.1* i *psl 5.2*) zlokalizowane są na chromosomie 5. Gen *psl* jest pomiędzy markerami flankującymi 16326275 i 16326048, w pozycji 31,1 cM. Główny QTL zlokalizowany bardzo blisko genu *psl* i wyjaśnia 79,9% fenotypowej zmienności (LOD = 32,6, a wartość krytyczna LOD = 4.0). Drugi QTL *psl 5.2* zlokalizowany jest między markerami SSR00398 (5,1 cM) a 16327512 (27,6 cM i wyjaśnia pomiędzy 24,1% a 44,7% zmienności fenotypowej, przy wartości parametru LOD między 5,6 a 12. Dotychczas opracowano około 30 map genetycznych ogórka, głównie dla populacji mapujących linii amerykańskich, indyjskich i chińskich (Ren i in. 2009, Miao i in., 2011, Yang i in., 2012). Jednak dotąd nie skonstruowano zaawansowanej mapy genetycznej dla linii ogórka, przystosowanych do uprawy w klimacie środkowoeuropejskim. Jak dotychczas nie zmapowano genów warunkujących odporność na kanciastą plamistość liści ogórka, bowiem koncentrowano się na odpornościach na mączniaka rzekomego i prawdziwego czy parch dyniowatych. W niniejszej pracy po raz pierwszy zmapowano geny związane z odpornością kanciastą plamistość, otrzymując zadowalające wyniki. Wyniki te są zbieżne z pracami dotyczącymi identyfikacji genów odporności, kodujących białka NBS-LRR, które dowodzą, że grupa genów odporności występuje na chromosomie 5 (Huang i in. 2009, Wang i in. 2013, Yang i in. 2013).

Analiza bioinformatyczna pozwoliła znaleźć zestaw nowych markerów SSR, które można wykorzystać do zagęszczania rejonów związanych z kanciastą plamistością. W pierwszym etapie wytypowano 636 loci mikrosatelitarnych, z których 63 były polimorficzne między liniami rodzicielskimi. Na podstawie analiz wytypowano 49 loci mikrosatelitarnych (15 dla regionu *psl 5.1* i 34 dla regionu *psl 5.2*), zaprojektowano startery i stwierdzono, że 24 z nich wykazały polimorfizm na liniach rodzicielskich i ośmiu losowo wybranych liniach populacji mapującej w warunkach labolatoryjnych. Zakres wielkości uzyskanych amplikonów dla testowanych markerów SSR wynosił od 140 do 400 par zasad. Na całej populacji mapującej przetestowano pięć wybranych par starterów SSR zaprojektowanych do loci mikrosatelitarnych zidentyfikowanych w obrębie rejonu *psl 5.1*. Segregację 1:1 dla każdego markera SSR zweryfikowano statystycznie testem χ^2 . Dla czterech przetestowanych markerów SSR potwierdzono przydatność do konstrukcji mapy genetycznej. Jest to wynik satysfakcjonujący. Dla porównania Yang i in. (2012) z zestawu 1266 markerów SSR opracowanych przez Ren i in. (2009) wskazali 731 markerów SSR (57%) potencjalnie różnicujących linie Gy14 i 9930, jednakże eksperymentalnie polimorfizm potwierdzono jedynie dla 312 markerów SSR (25%). Zagęszczanie markerami rejonów chromosomu 5 jest kolejnym etapem niezbędnym w poszukiwaniu genów związanych z odpornością na kanciastą plamistość. Zarówno marker fenotypowy *psl* związany z cechą chlorotycznego halo jak i QTL-e zidentyfikowano w piątej grupie sprzężeń mapy genetycznej ogórka, co potwierdza zasadność poszukiwania nowych markerów dla chromosomu piątego ogórka.

W ramach badania interakcji patogen-roślina analizowano transkryptomy uzyskane dla linii rodzicielskich ogórka (Gy14 i B10) w trzech punktach czasowych, tj.: przed inokulacją, w pierwszym oraz trzecim dniu po inokulacji. Czyste odczyty sekwencyjne zostały zmapowane na genomie referencyjnym ogórka linii 9930, uzyskując wysoki odsetek właściwie zmapowanych odczytów, w tym unikalnie zmapowanych odczytów, co świadczy o dobrej jakości danych transkryptomicznych. Wstępnie zidentyfikowano geny ogórka ulegające zróżnicowanej ekspresji w czasie porażenia liści przez *P. syringae* pv. *lachrymans*. Wyniki te będą weryfikowane metodą Real-Time PCR, gdzie badając ekspresja wybranych genów różnicujących będzie oceniana w odniesieniu do tak zwanych genów referencyjnych, które charakteryzują się stałą ekspresją w tkankach roślinnych, zarówno natywnych, jak i po zainfekowaniu fitopatogenną bakterią. Dobranie odpowiednich genów referencyjnych dla danego układu badawczego jest kluczowe w analizach Real-Time PCR i umożliwia zweryfikowanie wyników analiz transkryptomicznych. Na podstawie literatury wybrano 13 potencjalnych genów referencyjnych. Reakcje Real-Time PCR były poprzedzone reakcją kontrolą PCR. Brak produktu dla kontroli negatywnej (matryca RNA) świadczył o dobrej jakości preparatu RNA, a obecność produktu dla kontroli pozytywnej (matryca DNA) pozwalał stwierdzić, że reakcja PCR przebiegała prawidłowo. Po takiej weryfikacji syntezyowano każdorazowo cDNA na matrycy RNA i wykonywano kontrolną reakcję RT-PCR z tymi samymi starterami na matrycy cDNA. Obecność produktów reakcji RT-PCR dla wszystkich badanych prób oraz w próbie pozytywnej potwierdza, że synteza cDNA przebiegała właściwie. Po kilkuetapowej weryfikacji otrzymano cDNA, które używano w reakcji Real-Time PCR z 10 testowanymi parami starterów. Po wykonaniu analiz Real-Time PCR wskazano *CACS* i *TIP41* jako najlepsze geny referencyjne w oparciu o bioinformatyczny ranking stabilności ekspresji.

W bieżącym roku finalizowano badania związane z genomem szczepu *Psl 814/98*. Analiza porównawcza z innymi zsekwencjonowanymi genomami patowaru *lachrymans* pozwoliła na zidentyfikowanie rejonów unikalnych. Na skafoldzie 3 znaleziono pięć rejonów występujących wyłącznie u *Psl 814/98*, a trzy takie rejony znaleziono na skafoldzie 5. Ponadto skafoldzie 3 znaleziono sześć rejonów występujących w genomie *Psl 814/98* i PLA107 i siedem rejonów występujących w genomie *Psl 814/98* i PLA106 Baltrus i in. (2011). Z kolei na skafoldzie 5 znaleziono geny kodujące białka wykazujące podobieństwo do znanych białek znalezionych u *P. syringae*, m.in. różnych białek transportowych. W rejonach unikalnych na skafoldzie 3 i 5 zidentyfikowano też różne typy transpozaz, co potwierdza obecność ruchomych elementów genetycznych w genomie *Psl 814/98*. Analiza CRISPR nie zidentyfikowała w genomie *Psl 814/98* powtórzeń palindromowych, związanych z odpowiedzią komórek bakteryjnych na wirusy. Chociaż system CRISPR/Cas9 jest częstym systemem obrony bakterii przed bakteriofagami, to jednak dotychczasowe badania bakterii należących do *P. syringae* nie potwierdziły jego obecności u tego gatunku (Dudnik i Dudler 2014, Sultanov i in. 2016). Analiza

porównawcza sekwencji genów plazmidowych wykazała, że większość genów plazmidowych jest na skafoldach 8 i 9. Na obu tych skafoldach znaleziono geny inicjacji replikacji (*rep*). Na skafoldzie 8 zidentyfikowano również szereg genów *tra*, związanych z procesem koniugacji, gen efektorowy *hopAW1* oraz gen *pilT*. Na skafoldzie 9 zidentyfikowano kilka genów *virB*, związanych z systemem sekrecji typu IV (T4SS). Ponadto znaleziono kilka genów plazmidowych na skafoldach 3, 5, 10 i 13 (gen awirulencji *avrD*, gen mobilności *mob* odpowiadający za transfer plazmidu, gen *parA*). Przydatność diagnostyczną do identyfikacji i różnicowania szczepów patowaru *lachrymans* przez geny plazmidowe lub kodujące efekторы T3SS zweryfikowano w warunkach laboratoryjnych. Wybierając efekторы do analiz założono, że będą one identyfikować szczepy *lachrymans* w następujący sposób: *hopAW1* i *hopBD1* – szczepy należące do patowaru *lachrymans*, *hopAB3* i *hopBK1* – zidentyfikowane silnie wirulentne szczepy patowaru *lachrymans*, *hopAB2* i *hopC1* – zidentyfikowane średnio wirulentne szczepy patowaru *lachrymans*, *avrE1* i *hopM1* – różne szczepy należące do gatunku *P. syringae*. Testowanie w warunkach laboratoryjnych przydatności diagnostycznej 10 zaprojektowanych par starterów nie potwierdziło wyników analiz bioinformatycznych. Jedną z trudności w ocenie przydatności diagnostycznej tych starterów było otrzymywanie wielu produktów amplifikacji (dla *hopAB3*, *hopBD1*, *hopBK1*), których nie wyeliminowano pomimo optymalizacji reakcji PCR przeprowadzonej dla każdej pary starterów. W reakcji ze starterami *hopAW1* (efektor zidentyfikowany bioinformatycznie we wszystkich szczepach *lachrymans*) otrzymano produkty o wielkości ok. 450 pz dla szczepów Psl 814/98, Psl BG283, Psl BG966 i Psp 1448A. Nie otrzymano produktów dla dwóch innych szczepów patowaru *lachrymans* tj. Psl CCM2857 i Psl LMG5070. Reakcja ze starterami *hopC1* i *hopAB2* (efektory zidentyfikowane bioinformatycznie u średnio wirulentnych szczepów *lachrymans*) wykazała dwa odmienne profile amplifikacyjne w panelu zastosowanych szczepów (dla *hopC1* otrzymano produkty o wielkości 510 pz tylko dla Psl CCM2857 i dwóch szczepów patowaru *tomato*, a dla startera *hopAB2* produkty o wielkości 740 pz dla wszystkich szczepów). Dla starterów *avrE1* i *hopM1* (efektory występujące powszechnie w gatunku *P. syringae*) uzyskano również rozbieżności w porównaniu z analizą bioinformatyczną. W przypadku *avrE1* produkty amplifikacji o wielkości ok. 870 pz otrzymano dla silnie i średnio wirulentnych szczepów patowaru *lachrymans* (Psl 814/98, Psl CCM2857, Psl LMG5070 i Psl BG966) oraz dla szczepów patowaru *tomato* (Pst DC3000 i Pst3). Z kolei dla *hopM1* otrzymano produkty o wielkości ok. 600 pz dla szczepów Psl BG966, Pst DC3000 i Pst 3. W reakcji ze starterami *repA* (gen plazmidowy) otrzymano produkty o wielkości ok. 1480 pz dla szczepów Psl 814/98, Psl CCM2857, Psl BG966, Psp1448A i Pst DC3000 oraz dla Pss 2905 i Pf PD2760 o innej wielkości. W przypadku drugiego genu plazmidowego (*traY*) otrzymano produkty o wielkości ok. 960 pz dla szczepów Psl 814/98, Psl CCM2857, Psl BG283, Psl BG966, Pst DC3000 i Pst 3. Produkty reakcji z testowanymi starterami zsekwencjonowano, jednakże dla 64% z nich nie udało się złożyć sekwencji z uzyskanych odczytów. Nie udało się otrzymać sekwencji dla wszystkich amplikonów otrzymanych po reakcji ze starterami *hopAW1* i *repA*. Sekwencje złożono dla produktów reakcji ze starterami *hopC1*, *hopM1* i *hopAB2*. Przyrównanie tych sekwencji (*hopC1* i *hopAB2*) do sekwencji zdeponowanych w bazie PPI wykazało istnienie pojedynczych substytucji.

Wnioski

1. Na podstawie markerów morfologicznych, SSR, SNP i *in silico* DArT skonstruowano dobrej jakości mapę genetyczną, składającą się z siedmiu grup sprzężeń o całkowitej długości 707,1 cM i średniej odległości 1,3 cM pomiędzy markerami.
2. Gen *psl* zmapowano w piątej grupie sprzężeń, która odpowiada chromosomowi 5 ogórka, w pozycji 31,1 cM. Dwa QTL związane z odpornością na kanciastą plamistość zmapowano również na chromosomie piątym.
3. Na podstawie testowania 49 markerów SSR na liniach rodzicielskich i ośmiu wybranych liniach RIL zidentyfikowano 24 nowe polimorficzne markery wykazując satysfakcjonujący poziom polimorfizmu i 5 z nich przetestowano na populacji mapującej.
4. Analiza statystyczna poziomu odporności populacji mapującej ogórka Gy14×B10 na kanciastą plamistość wskazuje, że populacja osiągnęła wysoki poziom homozygotyczności i większość linii wsobnych wchodzących w jej skład jest wyrównana genetycznie, co czyni ją wiarygodną do konstrukcji mapy genetycznej i mapowania genów lub regionów związanych z rozwojem tej choroby.
5. Stopień nasilenia objawów DSI jest skorelowany z obecnością chlorotycznego halo w populacji mapującej Gy14×B10.
6. Uzyskano dobrej jakości transkryptomy dla dwóch linii ogórka Gy14 i B10, przed inokulacją oraz w pierwszym i trzecim dniu po inokulacji, które zmapowano do genomu referencyjnego identyfikując wstępnie geny ogórka ulegające różnicowanej ekspresji podczas infekcji.
7. Za najlepsze geny referencyjne do analiz Real-Time PCR związanych z odpowiedzią ogórka na infekcję *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* uznano geny *CACS* i *TIP41*.
8. Testowanie przydatności diagnostycznej 10 zaprojektowanych starterów dla genów plazmidowych i efektorowych *Pseudomonas* sp. nie potwierdziło ich przydatności diagnostycznej.