

Gatunek rośliny, której dotyczy sprawozdanie: ogórek

Autorzy: GRZEGORZ BARTOSZEWSKI, RENATA SŁOMNICKA, HELENA OLCZAK-WOLTMAN, ALEKSANDRA KORZENIEWSKA, TERESA GALECKA, KAROLINA KAŻMIŃSKA, KATARZYNA NIEMIROWICZ-SZCZYTT

Afilacja: Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodnictwa Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Adres korespondencyjny: Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodnictwa Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

e-mail: grzegorz_bartoszewski@sggw.pl, tel. 22 59 321 77

Informacja o dotacji: Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji HOR.hn.802.17.2018, Zadanie nr 100

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

Title: Improvement of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in terms of angular leaf spot resistance

Słowa kluczowe: *Cucumis sativus* L., *P. syringae* pv. *lachrymans*, resistance, QTL, RNA-seq

Cel zadania

Celem badań w 2018 roku była konstrukcja ulepszonej mapy genetycznej ogórka i jej zagęszczenie w rejonach *loci* odporności na kanciastą plamistość. Opracowano zestaw nowych markerów PCR i SSR, a następnie wykorzystano je do genotypowania populacji mapującej Gy14×B10. Przeprowadzono bioinformatyczną analizę funkcjonalną genów ulegających zróżnicowanej ekspresji po zainfekowaniu roślin ogórka *P. syringae* pv. *lachrymans* i wykonano analizę ekspresji Real-Time PCR dla wybranych genów.

Wyniki

Wykorzystując skonstruowaną dla populacji mapującej Gy14×B10 mapę genetyczną i sekwencje markerów flankujących *loci* odporności na kanciastą plamistość oraz dostępność sekwencji genomów linii rodzicielskich zidentyfikowano rejon genomu ogórka zawierający główny *locus* odporności *psl5.1*. W przypadku genomu wrażliwej linii B10 zidentyfikowano ciągłą sekwencję odpowiadającą *psl5.1* o długości 895 kpz, zaś u linii odpornej Gy14 zidentyfikowano kontigi sekwencyjne reprezentujące ten rejon. W wyniku porównania wskazano insercje-delecje różnicujące te linie. Spośród różnic zidentyfikowanych *in silico*, dla 30 indeli uzyskano wydajną amplifikację PCR, polimorficzne na liniach rodzicielskich były 24 markery, a w obrębie 8 linii RIL 23 markery. Ostatecznie 19 markerów segregowało zgodnie z oczekiwaniami 1:1 na całej populacji mapującej, co potwierdziło ich przydatność do mapowania.

Skonstruowano ulepszoną mapę genetyczną dla populacji mapującej Gy14×B10, składającą się z 7 grup sprzężeń odpowiadających chromosomom ogórka. Całkowita długość mapy wyniosła 599,9 cM. Łącznie na mapę naniesiono 717 markerów SSR i DARtseq, z czego 123 markery na chromosomie 5 ogórka, a średnia odległością między markerami wyniosła 0,84 cM. Na podstawie oceny obecności chlorotycznego halo wokół uszkodzeń chorobowych na liściach zmapowano gen *psl* na chromosomie 5 w pozycji 2,0 cM i dwa *loci* QTL związane z ilościowym nasileniem objawów *psl 5.1* i *psl5.2*. Gen *psl* ulokował się w obrębie *locus psl5.1* (Słomnicka i wsp. 2018). Podjęto próbę zagęszczenia mapy w obrębie *loci* odporności na kanciastą plamistość, wykorzystując nowe markery. Finalnie na mapę naniesiono 13 markerów, które zagęściły głównie obszar wokół genu *psl* i *locus psl5.1*. Zagęszczanie mapy genetycznej spowodowało jednak jej rozciągnięcie i nie udało się zawęzić regionu genomu związanego z odpornością na kanciastą plamistość. Markerami najbliższymi sprzężonymi z *loci* odporności były markery: UW085415, 16327616, IS_16325300, IS_16326693i P066_SSR. Markery te mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w hodowli ogórka, gdzie źródłem odporności jest linia Gy14 lub linie hodowlane wywodzące się z tej linii.

W wyniku sekwencjonowania RNA-seq uzyskano profile transkrypcyjne dla linii Gy14 i B10 w trzech punktach czasowych: przed inokulacją oraz dzień i trzy dni po inokulacji (0, 1 i 3 dpi) a następnie zidentyfikowano geny ulegające zróżnicowanej ekspresji w pierwszych stadiach kanciastej plamistości. Stwierdzono, że znacznie więcej genów ulegało zmianom ekspresji w przypadku linii odpornej Gy14 (4268

genów w pierwszym dniu i 4654 w trzecim dniu po infekcji) w porównaniu z linią podatną B10 (o 40% mniej genów w 1 dniu i o 15% mniej w 3 dniu po infekcji). Sugeruje to bardziej złożoną odpowiedź obronną linii odpornej na porażenie *P. syringae* pv. *lachrymans* w porównaniu z linią podatną. Dla genów ulegających zróżnicowanej ekspresji wykonano analizy funkcjonalne. Stwierdzono, że największą grupę stanowią geny związane z procesami metabolicznymi i komórkowymi, kodujące białka o właściwościach katalitycznych i posiadających zdolność wiązania kofaktorów (Olczak-Woltman i wsp. 2018). Dla wybranych genów ulegających zróżnicowanej ekspresji wykonano analizy BLAST i wykazano, że ich produkty mogą być zaangażowane w biosyntezę hormonów roślinnych, reakcje obronne i inne procesy. Dla 30 wybranych genów wykonano analizy Real-Time PCR, które potwierdziły zróżnicowaną ekspresję genów w pierwszych stadiach kanciastej plamistości. Badane geny prezentowały różne profile ekspresji, co pozwala wskazać niektóre z nich jako potencjalne markery ekspresyjne stresu biotycznego u ogórka. Jako gen kandydacki markera wczesnej reakcji ogórka na stres można wskazać gen kodujący białko dehydrynowe DHN19, którego ekspresja wzrastała w pierwszym, a spadała w trzecim dniu po inokulacji. Geny kodujące białka PR-1 i PR-4 związane z patogenezą można wskazać jako geny kandydackie markerów późnej odpowiedzi na stres biotyczny, gdyż ich ekspresja przed inokulacją i jeden dzień po inokulacji była bliska zeru, natomiast dynamicznie wzrastała w trzecim dniu po inokulacji.

Wnioski

1. Dostępność sekwencji genomów linii Gy14 i B10 ogórka umożliwia identyfikację nowych markerów molekularnych w rejonie loci odporności na kanciastą plamistość.
2. Wszystkie zidentyfikowane w populacji mapującej Gy14×B10 loci odporności na kanciastą plamistość zmapowano w tym samym rejonie genomu ogórka - na górnym ramieniu chromosomu 5.
3. Zidentyfikowane markery sprzężone z loci odporności na kanciastą plamistość mogą znaleźć zastosowanie w hodowli ogórka, gdzie źródłem odporności jest linia Gy14 lub wyprowadzone z niej linie hodowlane.
4. Analizy funkcjonalne wykonane dla genów ogórka ulegających zróżnicowanej ekspresji we wczesnych etapach przebiegu kanciastej plamistości pokazały, że wśród tych genów najliczniejsza jest grupa genów kodująca białka związane z procesami metabolicznymi i komórkowymi o właściwościach katalitycznych.
5. Geny kodujące dehydrynę DHN19 i białka związane z patogenezą PR-1 i PR-4 są interesującymi genami kandydackimi na markery ekspresyjne stresu u ogórka.

Literatura

Olczak-Woltman H, Słomnicka R, Bartoszewski G (2018) Transcriptomic response of resistant and susceptible cucumber lines to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* infection. Proc XIX Diagnostics Conference on Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology, WULS, November 17, 2018, Warsaw, Poland, pp. 90-93

Słomnicka R, Olczak-Woltman H, Korzeniewska A, Gozdowski D, Niemirowicz-Szczytt K, Bartoszewski G (2018) Genetic mapping of *psl* locus and quantitative trait loci for angular leaf spot resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) Mol Breed 38:111