

Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej

**Zadanie nr 34**

Okres realizacji: 01.01.2024 - 31.12.2024

# Badanie molekularnych mechanizmów odporności ogórka na najważniejsze czynniki biotyczne i abiotyczne

**Kierownik:** dr Urszula Kłosińska, e-mail: [urszula.klosinska@inhort.pl](mailto:urszula.klosinska@inhort.pl)

**Wykonawcy:** dr Marzena Nowakowska<sup>1</sup>, dr Wojciech Szczechura<sup>1</sup>, mgr Katarzyna Nowak<sup>1</sup>,  
Ewa Matysiak<sup>1</sup>, lic. Paulina Fydrych-Lichman<sup>1</sup>, mgr Ewa Gołębiowska<sup>1</sup>, prof. dr hab. Mirosław Tyrka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Ogrodnictwa – PIB, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,  
Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych

<sup>2</sup>Politechnika Rzeszowska, Wydział Chemiczny,  
Katedra Biochemii i Biotechnologii

**Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy**  
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3  
96-100 Skierniewice



	Cele zadania w roku 2024	Czy cel został zrealizowany
I	Fenotypowa ocena populacji mapującej RIL F8 otrzymanej ze skrzyżowania odpornej linii PI 197088 z podatną linią PI 175695 pod względem odporności na <i>P. cubensis</i> wywołującego mączniaka rzekomego dyniowatych.	tak
II	Genotypowanie komponentów rodzicielskich i wybranych 92 linii RIL metodą sekwencjonowania następnej generacji na platformie DArTseq na potrzeby dalszych etapów badań dotyczących konstrukcji mapy genetycznej oraz mapowania loci warunkujących odporność ogórka na <i>P. cubensis</i> .	tak
III	Ocena trwałości poziomej odporności na mączniaka rzekomego w nowo zidentyfikowanych odpornych genotypach ogórka.	tak

# Miernik zadania - stopień realizacji

L.p.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
<b>Temat badawczy 1</b>				
1.1	Liczba ocenianych populacji	112	112	1,00
1.2	Liczba wyizolowanych prób zbiorczych gDNA	94	94	1,00
<b>Temat badawczy 2</b>				
2.1	Liczba ocenianych linii/odmian ogórka	9	9	1,00
2.2	Liczba przeprowadzonych doświadczeń polowych	5	5	1,00
			ŚREDNIA	1,00
			% realizacji zadania	100%

# Materiały i Metody

## Temat badawczy 1

- 2 linie rodzicielskie : PI 197088 – odporna i PI 175695 – podatna na *P. cubensis*
- 110 rekombinacyjnych linii wsobnych populacji mapującej RIL F<sub>8</sub> (PI 197088 x PI 175695)
- [test fitopatologiczny](#) w warunkach sztucznej inokulacji *P. cubensis* w szklarni
- [doświadczenie polowe](#) w warunkach naturalnej infekcji *P. cubensis*; dwie lokalizacje: Raciborowice, Skierniewice
- ocena fenotypowa ww. linii wg 10. stopniowej skali (0=brak objawów, 9=całkowite porażenie)
- izolacja DNA z linii rodzicielskich oraz 92 populacji RIL F<sub>8</sub> wg zmodyfikowanej metody z wykorzystaniem CTAB (Inglis i in. 2018)
- wysokoprzepustowe genotypowania metodą sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS) na platformie DArTseq (Diversity Arrays Technologies, Australia – usługa obca)



## Temat badawczy 2

- 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
- doświadczenie polowe; pięć lokalizacji: Raciborowice, Tarnów, Skierniewice, Nochowo, Markusy
- naturalna infekcja *P. cubensis*, dwa terminy obserwacji
- ocena odporności wg 10. stopniowej skali (0=brak objawów, 9=całkowite porażenie)



# WYNIKI

## Mapowanie i charakterystyka QTL warunkujących odporność ogórka na *P. cubensis*

Tabela 1. Wartość współczynnika podatności DSI, addytywności  $a_A$  i dominowania  $d_A$  w testach przeprowadzonych w warunkach naturalnej infekcji w polu w Skierniewicach i Raciborowicach.

Lokalizacja doświadczenia	Wartość współczynnika					
	DSI			m	$a_A$	$d_A$
	$P_1$	$P_2$	RIL $F_8$			
<b>Skierniewice</b>	0,20 a	8,67 a	6,18a	4,40 a	-4,20 a	1,78 a
<b>Raciborowice</b>	0,40 a	9,00 a	7,10 b	4,70 a	-4,30 a	2,40 b



DSI – współczynnik podatności; m – średnia rodziców;  $a_A$  – współczynnik addytywności;  $d_A$  – współczynnik dominowania

Średnie porównano testem HSD Tukey'a przy  $\alpha = 0.05$ . Wartości liczbowe w obrębie tej samej kolumny oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie.

- Najwyższym poziomem odporności (DSI = 0,2) charakteryzowała się linia mateczna PI 197088 ( $P_1$ ), której wskaźnik porażenia wynosił 0,2 i 0,4 odpowiednio dla Skierniewic i Raciborowic. Natomiast średni wskaźnik porażenia DSI wszystkich 110 linii reprezentujących populację mapującą RIL  $F_8$  wynosił 6,18 i 7,10 odpowiednio dla Skierniewic i Raciborowic i był istotnie wyższy od średniej rodziców (m) wynoszącej 4,40 i 4,70.
- Zanotowano wysoką wartość współczynnika  $a_A$ , co wskazuje na istotne działanie genów addytywnych w zwiększaniu odporności na *P. cubensis*. Stwierdzono także istotny wpływ genów dominujących na cechę odporności, na co wskazują wysokie wartości współczynnika  $d_A = 1,8$  oraz 2,4, odpowiednio dla Skierniewic i Raciborowic.

# WYNIKI

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

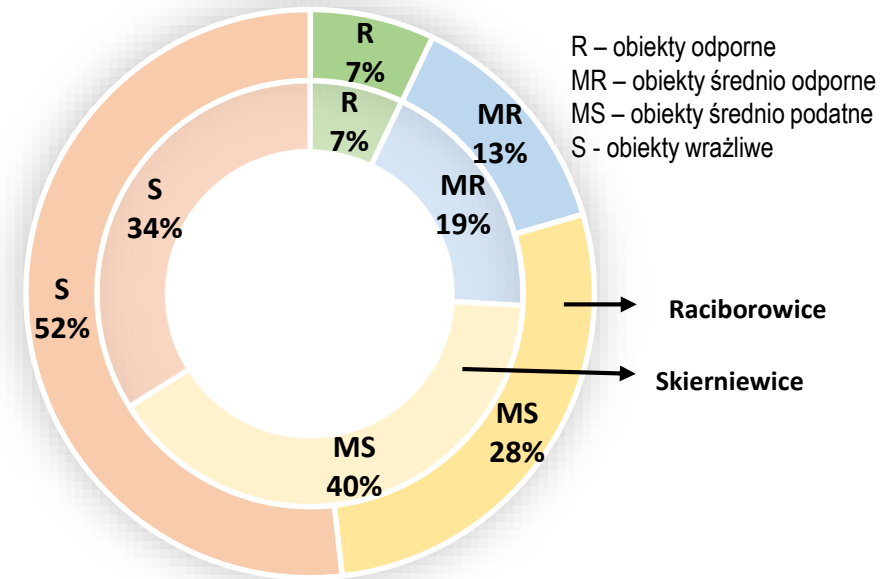
Tabela 2. Zróżnicowanie fenotypowe 110 linii populacji mapującej RIL F<sub>8</sub> (PI 197088 x PI 175695) pod względem poziomu odporności na *P. cubensis* w warunkach naturalnej infekcji w polu w dwóch lokalizacjach: Skierniewice i Raciborowice.

Lokalizacja doświadczenia	Min	Max	Średnia	SD	Kurtoza	Skośność	CV
Skierniewice	1,20	9,00	6,18	1,8	0,13	-0,67	28,93
Raciborowice	0,80	9,00	7,10	1,9	1,86	-1,47	26,76

- Na podstawie przeprowadzonego fenotypowania stwierdzono, że wsobne linie rekombinacyjne populacji mapującej RIL F<sub>8</sub> (PI197088 x PI 175695) charakteryzują się średnim do małego zróżnicowaniem pod względem odporności na *P. cubensis*, patogena wywołującego mączniaka rzekomego (CV = 28,9 i 26,8).
- W przypadku doświadczenia w Skierniewicach rozkład fenotypów w pokoleniu F<sub>8</sub> zbliżony jest do rozkładu normalnego na co wskazuje wartość kurtozy zbliżona do zera (K = 0,1), a niewielka ujemna wartość skośności (S = - 0,7) wskazuje na jego niewielkie przesunięcie w prawą stronę, co z kolei oznacza że większość linii populacji F<sub>8</sub> ma wartości powyżej średniej. Natomiast w przypadku doświadczenia zlokalizowanego w Raciborowicach, stwierdzono że rozkład fenotypów oddalony jest od normalnego i znacznie przesunięty w prawą stronę o czym świadczą wysokie wartości kurtozy i skośności wynoszące odpowiednio 1,9 i -1,5.

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

- Niezależnie od lokalizacji, najmniej liczną była grupa linii odpornych, których udział w badanej populacji  $F_8$  w obu lokalizacjach wynosił 7%. Nieco więcej linii zaklasyfikowano do grupy średnio odpornych 13 i 19%, odpowiednio dla Raciborowic i Skierniewic. Najliczniej reprezentowane były linie średnio podatne (MS), które stanowiły 40 i 28% populacji mapującej oraz linie podatne (S), których udział wynosił 34 i 52% odpowiednio w Skierniewicach i Raciborowicach.



Rysunek 1. Dystrybucja linii RIL  $F_8$  w poszczególnych grupach porażenia w dwóch lokalizacjach: Skierniewice i Raciborowice.



Raciborowice, druga połowa września 2024 r.



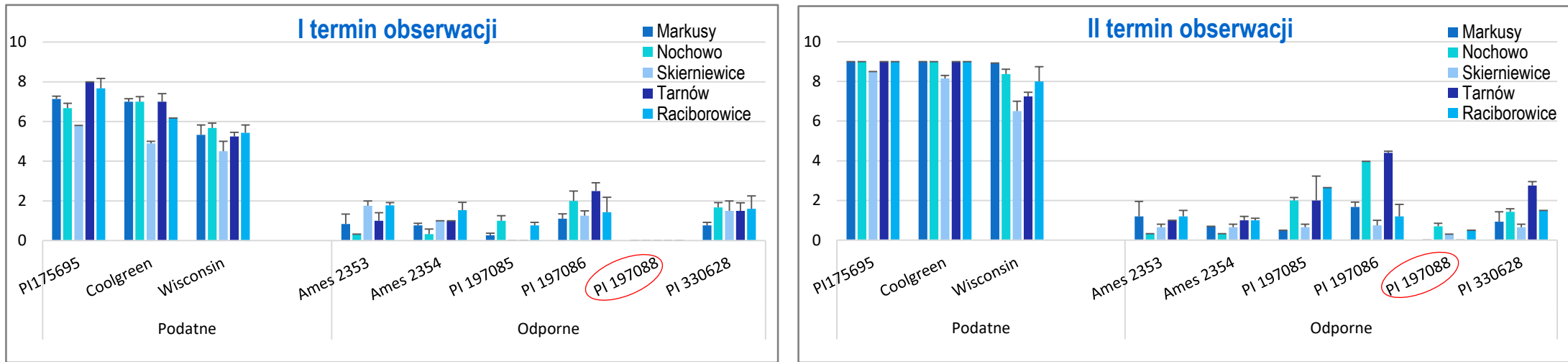
Odporna linia RIL  $F_8$  nr 104



Skierniewice, druga połowa IX 2024 r.; Odporna linia RIL  $F_8$  nr 104



## Temat badawczy 2: Badanie stabilności odporności na mączniaka rzekomego w nowo zidentyfikowanych odpornych genotypach ogórka



Rys. 3. Reakcja 9 linii/odmian ogórka na *P. cubensis* w pięciu lokalizacjach: Markusy, Nochowo, Skierniewice, Tarnów, Raciborowice w dwóch terminach obserwacji.

- Średni stopień porażenia odmian podatnych w I terminie obserwacji kształtował się w przedziale 6,4 – 6,8 we wszystkich lokalizacjach, za wyjątkiem Skierniewic (DSI = 5,1). Także w II terminie obserwacji DSI obiektów podatnych w Skierniewicach wynosiło 7,9 i było niższe niż w pozostałych czterech lokalizacjach (DSI = 8,4 - 8,8).
- Najmniejszy średni wskaźnik porażenia linii odpornych w I i II terminie obserwacji stwierdzono na północy Polski w Markusach (DSI = 0,6 i 0,9) oraz w centralnej Polsce w Skierniewicach (DSI = 0,8 i 0,7), natomiast dla pozostałych lokalizacji wskaźnik ten mieścił się w granicach 0,9 - 1,2 i 1,2 - 1,7).
- Wszystkie linie odporne, za wyjątkiem PI 197086 potwierdziły swój bardzo wysoki i stabilny poziom odporności na *P. cubensis* niezależnie od lokalizacji doświadczania. Podobnie jak w latach poprzednich, szczególnie wyróżniła się linia **PI 197088**, która niezależnie od lokalizacji i terminu obserwacji charakteryzowała się najwyższym średnim poziomem odporności **DSI = 0,2**.



- Wyniki fenotypowania wykazały, że wsobne linie rekombinacyjne populacji mapującej RIL F<sub>8</sub> (PI197088 x PI 175695) charakteryzują się średnim do małego zróżnicowaniem pod względem odporności na *P. cubensis* w warunkach naturalnej infekcji w Skierniewicach (woj. łódzkie) i w Raciborowicach (woj. małopolskie).
- Segregacja fenotypów w pokoleniu F<sub>8</sub> w Skierniewicach zbliżona była do **rozkładu normalnego**, co wskazuje że odporność na *P. cubensis* u linii PI 197088 ma **charakter poligeniczny**. Natomiast w przypadku doświadczenia zlokalizowanego w Raciborowicach, stwierdzono że rozkład fenotypów oddalony jest od normalnego i znacznie przesunięty w prawą stronę o czym świadczą wysokie wartości bezwzględne kurtozy i skośności wynoszące odpowiednio 1,9 i -1,5.
- Zaobserwowany w Raciborowicach większy udział obiektów podatnych niż średnio podatnych w porównaniu do Skierniewic, może świadczyć o korzystniejszych do rozwoju patogenu warunkach pogodowych panujących na południu Polski, min. większa wilgotność powietrza, większa ilość opadów.
- Cztery odporne linie: **PI 197088**, **PI 197085**, **Ames 2353**, i **Ames 2354** potwierdziły wysoki i stabilny poziom odporności na *P. cubensis* w pięciu różnych rejonach Polski, dzięki czemu stanowią cenny materiał wyjściowy do wykorzystania w programach hodowli ogórka z odpornością na mączniaka rzekomego oraz jako źródło nowej zmienności genetycznej tego gatunku.
- Na podstawie stopnia porażenia badanych obiektów można wnioskować, że rozwój mączniaka rzekomego, przebiegał szybciej w południowej, zachodniej i północnej Polsce, niż w centralnej, co może być związane z mniej sprzyjającymi warunkami pogodowymi do rozwoju patogena panującymi w tej części kraju w 2024 r.

# PREZENTACJA WYNIKÓW BADAŃ

Załącznik nr 1

Poster prezentowany podczas Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Innowacyjne ogrodnictwo źródłem produktów wysokiej jakości”, Lublin, 04-06 czerwca 2024 r.



Wojciech Szczechura, Urszula Klośńska, Katarzyna Nowak, Marzena Nowakowska  
Instytut Ogródnictwa – Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierzwice



## Porównawcze analizy transkryptomów metodą RNA-Seq w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem tolerancji na stres suszy

### WSTĘP

Spójność stresów abiotycznych susza jest jednym z głównych czynników ograniczających wzrost i rozwój rośliny. W związku z postępującymi zmianami klimatycznymi, występowanie suszy w środowisku stanowi coraz bardziej poważniejszy i znaczący problem, przyczyniając się do poważnych strat w plonowaniu roślin uprawnych, w tym ogórka (*Cucumis sativus* L.). Opracowywanie strategii uzyskiwania nowych odmian ogórka wykazujących lepszą tolerancję na stres suszy jest obecnie jednym z głównych priorytetów hodowli tego gatunku. Szczegółowe poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za odpowiedź roślin na stres suszy, który jest złożonym procesem regulowanym przez wiele genów, może pomóc w opracowaniu odpowiednich strategii. Celem wytypowania genów ulegających zróżnicowanej ekspresji (DEG, Differently Expressed Genes) pod wpływem stresu suszy przeprowadzono porównawczą analizę profilu transkryptomicycznych dwóch linii ogórka skrajnie zróżnicowanych w odpowiedzi na badany czynnik stresowy.

### Procedura identyfikacji genów ulegających zróżnicowanej ekspresji pod wpływem stresu suszy z wykorzystaniem RNA-seq



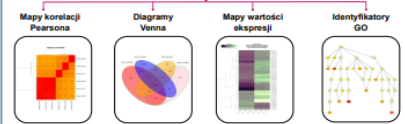
Izolacja całkowitego RNA (Zeng i Yang, 2000)  
Optymalnie nawadnianie (C) vs ograniczone nawadnianie (3 dni: D3, 7 dni: D7)

Przygotowanie bibliotek cDNA (18 próbk)  
NEBNext<sup>™</sup> Ultra<sup>™</sup> II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup> (NEB)

Sekwencjonowanie  
Illumina NovaSeq6000 2 x 150 bp

Filtrowanie danych i analiza jakości odczytów (FASTQ)  
Mapowanie odczytów (Hisat2, HTSeq) - *Cucumis sativus* (Gy14) genome v2

Analiza różnicowej ekspresji genów (DEG): log<sub>2</sub> krotności zmiany poziomu ekspresji ≥ 1,5 lub ≤ -1,5; FDR (False Discovery Rate) < 0,05 (DESeq2)



### Walidacja wyników RNA-seq

- Odczerna transkrypcja do cDNA: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystem
- qPCR: PowerTrack<sup>™</sup> SYBR Green Master Mix, Applied Biosystem, LightCycler<sup>®</sup> 480 II (Roche)
- Ocena stabilności genów referencyjnych: geNorm, NormFinder, ΔCT, BestKeeper, CACS i UBI-1 jako optymalne geny referencyjne do normalizacji wyników qPCR

- Walidacja wyników RNA-seq: podobny układ doświadczalny jak w przypadku analizy RNA-seq, 15 genów o zróżnicowanej ekspresji pod wpływem stresu suszy
- Dla siedmiu wybranych DEG przeprowadzono analizę zmian ekspresji w rozszerzonym zakresie punktów czasowych (3, 7, 14, 21, 28, 35 dni) ograniczonego podlewania
- Poziom względnej ekspresji badanych genów: metoda podwójnej delty (Livak i Schmittgen 2001)

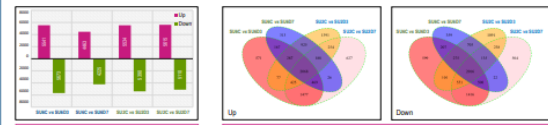


Fig. 1. Liczba zidentyfikowanych genów o zróżnicowanej (nie-łączącej) ekspresji w analizowanych kombinacjach.

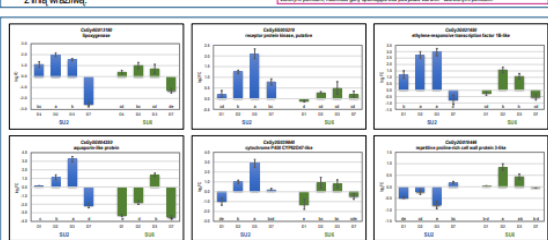
• Zidentyfikowano od 8688 do 11214 genów o zróżnicowanej ekspresji z wzorem zmian uzależnionym od reakcji badanej linii na stres niedoboru wody (Rys. 1-3).

• Najwięcej (11214) i najmniej (8688) genów odcnotowano w wrażliwej linii SU6 odpowiednio w trzeciej i 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 ograniczonego podlewania.

• Nie obserwowano znaczących różnic w procentowym udziale genów o podwyższonej i obniżonej ekspresji w całkowitej liczbie zidentyfikowanych genów.

• Różnice we wzorze zmian ekspresji zidentyfikowanych genów o zróżnicowanej ekspresji 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 u linii tolerancyjnej w porównaniu z linią wrażliwą.



### PODSUMOWANIE

- Wytypowano siedem genów jako potencjalnie związanych z podwyższoną tolerancją na suszę, który wykazywał wzorce ekspresji odróżniające tolerancyjną linię SU2 od linii wrażliwej SU6. Szczególnie interesującym genem jest *CsGy2G025730*, kodujący enzym z rodziny cytochromu P450 (CYP82D47-like), który wykazywał zróżnicowaną ekspresję tylko w tolerancyjnej na suszę linii SU2, podczas gdy nie był wykrywalny w linii wrażliwej SU6.
- Geny zidentyfikowane jako te, które ulegają specyficznemu wzorcowi ekspresji charakterystyczne dla genotypu tolerancyjnego w warunkach suszy stanowią swoisty wzór mogący ułatwić selekcjonowanie genotypów tolerancyjnych ogórka na suszę, jednakże dalsze szczegółowe badania są niezbędne w tym zakresie.

Fig. 3. Wyniki walidacji podwójnej delty: log<sub>2</sub> FDR, odczytany z tabeli od zmiany wartości ekspresji log<sub>2</sub> (Estimate) FoldChange genów badanych względem genów kontrolnych (geny o 100% ekspresji) w momencie podlewania suszą, geny o log<sub>2</sub> (Estimate) FoldChange > 1,5 są oznaczone czerwonymi punktami, natomiast geny wykazujące odwrócony wzór - czarnymi punktami.

Załącznik nr 2

Abstrakt zamieszczony w materiałach konferencyjnych Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Innowacyjne ogrodnictwo źródłem produktów wysokiej jakości”, Lublin, 04-06 czerwca 2024 r.

## Porównawcze analizy transkryptomów metodą RNA-Seq w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem tolerancji na stres suszy

Wojciech Szczechura, Urszula Klośńska, Katarzyna Nowak, Marzena Nowakowska

Pracownia Hodowli i Genetyki Roślin Warzywnych, Zakład Hodowli Roślin Ogródniczych,  
Instytut Ogródnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierzwice

e-mail: wojciech.szczechura@inhort.pl

Opracowywanie strategii uzyskiwania odmian ogórka (*Cucumis sativus* L.) o lepszej tolerancji na suszę jest obecnie jednym z priorytetów hodowli tego gatunku, a szczegółowe poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za odpowiedź roślin na stres suszy może pomóc usprawnić ten proces. W celu wytypowania genów ulegających zróżnicowanej ekspresji pod wpływem stresu suszy przeprowadzono porównawczą analizę profili transkryptomicycznych dwóch linii ogórka: tolerancyjnej SU2 i wrażliwej SU6. Materiał do izolacji RNA pobierano z 5-tygodniowych roślin w 3. i 7. dniu ograniczonego podlewania (stres) oraz z roślin optymalnie nawadnianych (kontrola). Ilościowa analiza ekspresji genów wykazała różnice w ekspresji pomiędzy roślinami optymalnie nawadnianymi i poddawaniymi stresowi niedoboru wody z wzorem zmian uzależnionym od reakcji badanej linii na stres suszy. Najwięcej genów wykazywało zmiany ekspresji w 3. dniu ograniczonego podlewania, przy czym łączna liczba zidentyfikowanych genów była nieznacznie wyższa w linii wrażliwej SU6. Odwrotną zależność w zmianach ekspresji między liniami obserwowano przy porównaniu profili dla roślin nawadnianych optymalnie i poddanych stresowi przez 7 dni, gdzie linia tolerancyjna wykazywała o 21% więcej genów ulegających zróżnicowanej ekspresji. Zidentyfikowano również geny o unikatowym wzorcu ekspresji dla tolerancyjnej linii SU2 odróżniającym się od profilu linii wrażliwej SU6. Trzy geny: *CsGy5G005210* (receptorowa kinaza białkowa), *CsGy5G004250* (czynnik transkrypcyjny ERF 1B-like) i *CsGy2G025730* (CYP82D47-like) zostały wytypowane jako potencjalnie związane z podwyższoną tolerancją na suszę linii SU2. Zidentyfikowane geny specyficzne dla linii tolerancyjnej stanowią potencjalne geny kandydackie do dalszych badań nad zwiększaniem tolerancji ogórka na suszę, a wyniki naszych badań mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów regulujących odpowiedź roślin na stres suszy.

## Comparative transcriptome analyses using RNA-Seq in cucumber lines with contrasting drought responses

Developing drought-tolerant varieties is a key priority in cucumber (*Cucumis sativus* L.) breeding. Understanding the genetic mechanisms behind plant response to drought stress is crucial for developing effective strategies. To identify genes responsive to drought stress, we conducted a comparative transcriptomic analysis of two cucumber lines with contrasting drought responses: tolerant (SU2) and sensitive (SU6), performing high-throughput RNA sequencing. Material for RNA isolation was collected from 5-week-old plants at 3rd and 7th day of limited watering (stress) and from optimally watered plants (control). Analysis revealed differences in gene expression between well-watered and drought-stressed plants, with patterns varying based on the line's response to drought. The highest number of genes underwent expression changes on the third day of drought exposure with a slightly higher number of differentially expressed genes observed in the drought-sensitive SU6. Conversely, the tolerant line SU2 exhibited 21% more differentially expressed genes compared to SU6 for the seventh day of limited watering. Additionally, unique gene expression patterns specific to the drought-tolerant line SU2 were identified, including three potential candidate genes associated with drought tolerance: *CsGy5G005210* (protein receptor kinase), *CsGy5G004250* (transcription factor ERF 1B-like), and *CsGy2G025730* (CYP82D47-like). These findings shed light on the genetic mechanisms underlying cucumber's response to drought stress and provide potential candidate genes for further research on enhancing drought tolerance in cucumber breeding programs.