

Badanie molekularnych mechanizmów odporności ogórka na najważniejsze czynniki biotyczne i abiotyczne

Kierownik: dr Urszula Kłosińska, e-mail: urszula.klosinska@inhort.pl

Wykonawcy: dr Marzena Nowakowska¹, dr Wojciech Szczechura¹, mgr Katarzyna Nowak¹,
Ewa Matysiak¹, lic. Paulina Fydrych-Lichman¹, mgr Ewa Gołębiwska, prof. dr hab. Mirosław Tyrka²

¹Instytut Ogrodnictwa – PIB, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,
Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych

²Politechnika 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 2023	Czy cel został zrealizowany
I	Fenotypowa ocena odporności na <i>P. cubensis</i> mapującej populacji RIL wyprowadzonej ze skrzyżowania odpornej linii PI 197088 z podatną linią PI 175695.	tak
II	Ocena trwałości poziomu odporności na mączniaka rzekomego w nowo zidentyfikowanych odpornych genotypach ogórka.	tak
III	Weryfikacja roli genów zaangażowanych w odpowiedź ogórka na stres suszy, zidentyfikowanych na podstawie sekwencjonowania transkryptomów dwóch linii ogórka o skrajnie zróżnicowanej reakcji na badany czynnik stresowy.	tak

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 F₈ (PI 197088 x PI 175695)
- doświadczenie szklarniowe w warunkach sztucznej inokulacji *P. cubensis*
- ocena fenotypowa ww. materiałów wg 10. stopniowej skali (0=brak objawów, 9=całkowite porażenie)
- izolacja DNA z linii rodzicielskich i populacji RIL F₈ zmodyfikowaną metodą Doyle and Doyle www.diversityarrays.com
- rozmnożenie wsobne metodą SSD (*Single Seed Descent*) 40 linii pokolenia F₇ → RIL F₈ na potrzeby dalszych badań

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

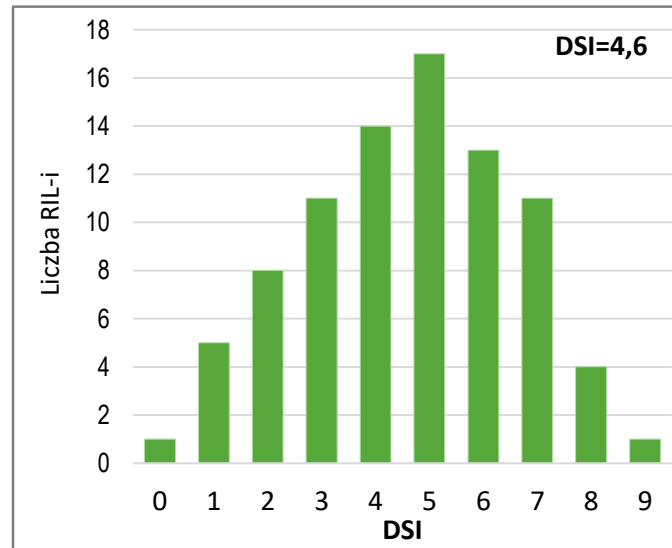


Temat badawczy 3

- 2 linie: SU2-tolerancyjna, SU6-wrażliwa w warunkach optymalnego (K) i ograniczonego nawadniania (4 punkty czasowe: 1, 2, 3 i 7 doba od momentu ograniczenia nawadniania – ozn. D1, D2, D3 i D7)
- analiza stabilności 10 genów referencyjnych (HKG), 5 algorytmów (BestKeeper, geNorm, NormFinder, ΔCt, RefFinder)
- weryfikacja wiarygodności wytypowanych HKG: po 2 najbardziej i najmniej stabilne HKG, 3 geny o zróżnicowanej ekspresji (DEG) wytypowane z eksperymentu RNA-Seq
- analiza metodą qPCR 20 genów o zróżnicowanej ekspresji (RNA-Seq) w reakcji ogórka na stres suszy

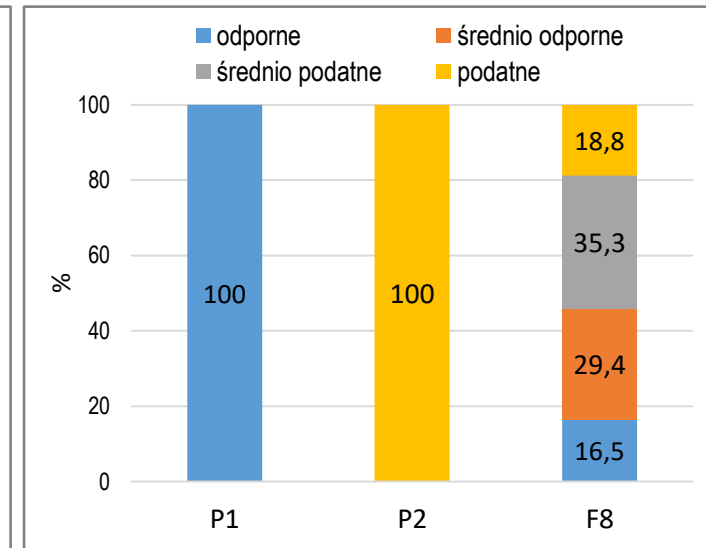
Temat badawczy 1: Mapowanie i charakterystyka QTL warunkujących odporność ogórka na *P. cubensis*

- Na podstawie przeprowadzonego fenotypowania stwierdzono, że wsobne linie rekombinacyjne populacji mapującej RIL F₈ (PI197088 x PI 175695) charakteryzują się dużym zróżnicowaniem pod względem odporności na *P. cubensis*, patogena wywołującego mączniaka rzekomego.
- Segregacja fenotypów w pokoleniu F₈ obejmowała wszystkie klasy porażenia od 0 do 9, a rozkład linii RIL F₈ w poszczególnych klasach zbliżony był do **rozkładu normalnego** z przewagą roślin o średnim stopniu odporności i podatności, co wskazuje że odporność na *P. cubensis* u linii PI 197088 ma charakter poligeniczny (Rys. 1, 2).
- Najliczniejszą grupę stanowiły linie średnio odporne (klasy 3 - 4) i średnio podatne (klasy 5 - 6), które stanowiły odpowiednio 29,4 % i 35,3% całej populacji mapującej (Rys. 2).



Rys.1. Zakres zmienności porażenia przez *P. cubensis* populacji mapującej RIL F₈.

Ocena podatności wg 10. stopniowej skali bonitacji:
0 – brak objawów choroby, 9 – rośliny porażone w 100%



Rys. 2. Udział poszczególnych grup genotypów o zróżnicowanej odporności na *P. cubensis* w badanej populacji mapującej RIL F₈ i liniach rodzicielskich PI 197088 (P₁) i PI 175695 (P₂).

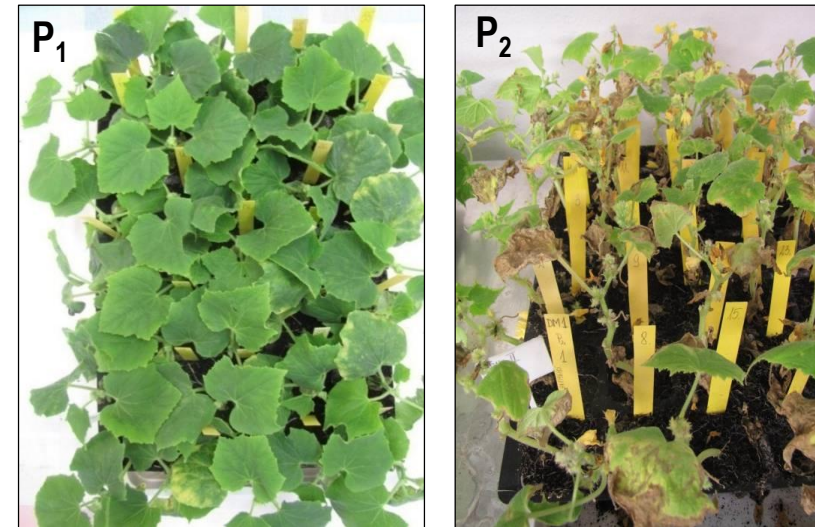
c.d. Temat badawczy 1: Mapowanie i charakterystyka QTL warunkujących odporność ogórka na *P. cubensis*

- Najniższy średni wskaźnik podatności DSI = 0,25 zanotowano u odpornej linii rodzicielskiej PI197088 (P_1), a najwyższy DSI = 8,25 u podatnej linii PI175695 (P_2). Natomiast średni wskaźnik porażenia DSI wszystkich linii reprezentujących populację mapującą RIL F_8 wynosił 4,6 i nie różnił się istotnie od średniej rodziców (m) wynoszącej 4,5 (Tabela 1).
- Stwierdzono wysoką wartość współczynnika addytywności (a_A), co wskazuje na istotne działanie genów addytywnych w zwiększaniu odporności na *P. cubensis*. Natomiast bardzo niska wartość współczynnika dominowania ($d_A = 0,1$), wskazuje na brak istotnego wpływu genów dominujących na cechę odporności na tego patogena (Tabela 1).
- Kontynuowano rozmnożenie metodą SSD 40. linii wsobnych pokolenia F_7 uzyskując odpowiednią ilość nasion populacji mapującej RIL F_8 (PI 197088 x PI 175695), co pozwoli na realizację dalszych etapów badań.

Tabela 1. Wartość współczynnika podatności DSI, addytywności a_A i dominowania d_A .

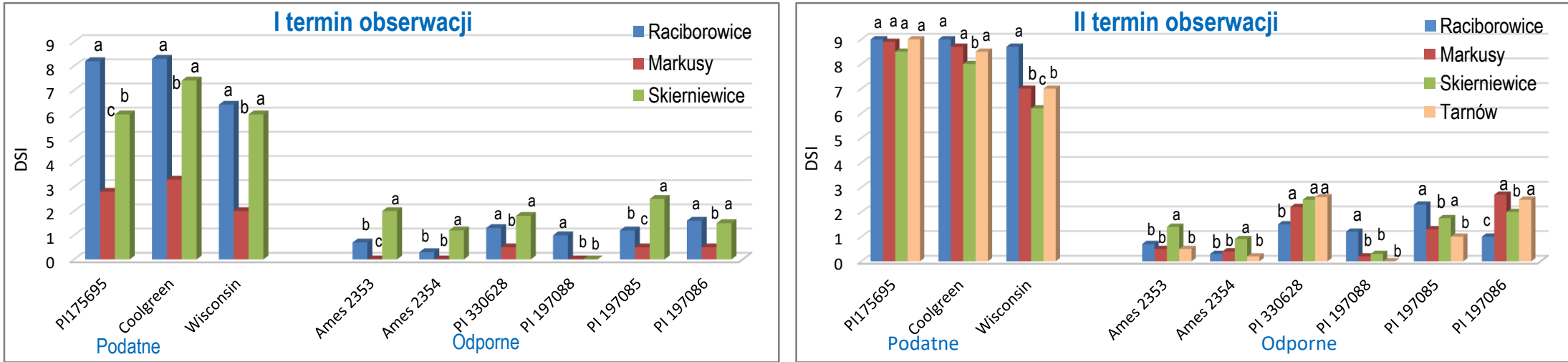
Wartość współczynnika					
DSI			m	a_A	d_A
P_1	P_2	RIL F_8			
0,25	8,25	4,60	4,50	-4,00	0,10 ^{ns}

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



Fot. 1. Reakcja odpornej linii PI 197088 (P_1) i podatnej linii PI 175695 (P_2) na porażenie przez *P. cubensis* w warunkach testów infekcyjnych w szklarni.

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 czterech lokalizacjach: Markusy, Skierniewice, Tarnów, Raciborowice w dwóch terminach obserwacji. Średnie porównano testem HSD Tukey'a przy $\alpha = 0.05$. Wartości liczbowe w obrębie jednej linii oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie w danym terminie obserwacji we wszystkich lokalizacjach.

- ❑ Stwierdzono, że na północy Polski w Markusach, w I terminie obserwacji wszystkie badane linie, zarówno podatne jak i odporne charakteryzowały się istotnie mniejszym stopniem porażenia przez *P. cubensis*. Średni wskaźnik DSI dla linii podatnych wynosił 2,7, podczas gdy w pozostałych rejonach kraju kształtował się w przedziale 6,5-7,6.
- ❑ Najwyższy wskaźnik podatności zanotowano dla linii/odmian podatnych w Raciborowicach w obu terminach obserwacji. W przypadku linii odpornych najmniejszy średni wskaźnik porażenia (DSI = 0,2) w I terminie obserwacji stwierdzono na północy Polski w Markusach, natomiast dla pozostałych lokalizacji mieścił się w granicach 1,0 – 1,5.
- ❑ Zanotowano niewielkie różnice w wartości DSI linii odpornych pomiędzy rejonami Polski. Trzy linie (Ames 2353, Ames 2354, PI 197088,) potwierdziły swój bardzo wysoki i stabilny poziom odporności na *P. cubensis* niezależnie od lokalizacji doświadczania.

WYNIKI

Temat badawczy 3. Porównawcze analizy transkryptomów metodą RNA-Seq w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem tolerancji na stres suszy

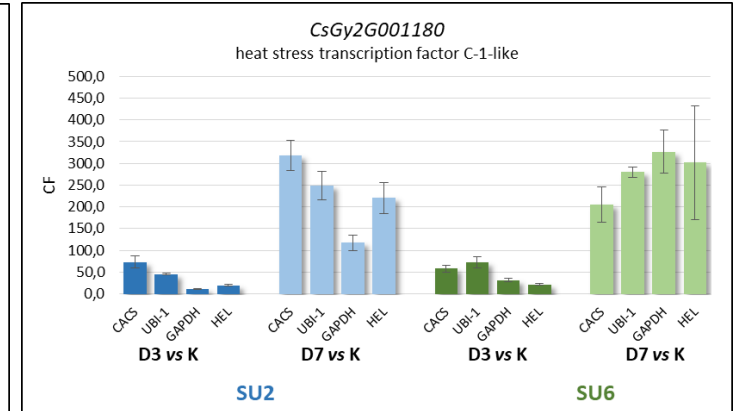
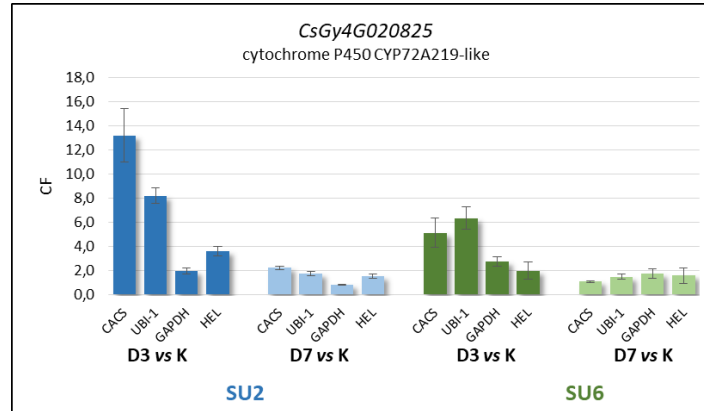
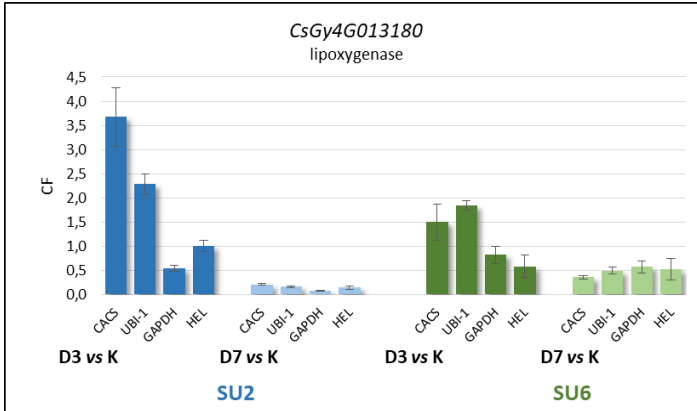
Tabela 1. Ranking stabilności ekspresji 10 kandydatów na geny referencyjne, obliczony przez pięć różnych rodzajów oprogramowania.

Gen		NormFinder	geNorm	BestKeeper	Delta Ct	RefFinder	Śr. geom.	Ogólny ranking
wszystkie algorytmy								
CACS	<i>Clathrin adaptor complex subunit</i>	1	1	5	1	1	1,38	1
TIP41	<i>TIP41-like (PP2A phosphatase activator)</i>	4	4	4	3	2	3,29	3
UBI-1	<i>Ubiquitin-like protein</i>	3	1	2	4	3	2,35	2
F-BOX	<i>F-box protein</i>	5	5	1	5	4	3,47	4
CYP	<i>Cyclophilin</i>	2	3	8	2	5	3,44	5
EF1	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	6	6	6	7	6	6,19	6
UBQ	<i>Polyubiquitin</i>	7	7	7	6	7	6,79	7
ACT	<i>Actin</i>	8	8	9	8	8	8,19	9
HEL	<i>Helicase</i>	10	10	3	10	9	7,70	8
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	9	9	10	9	10	9,39	10

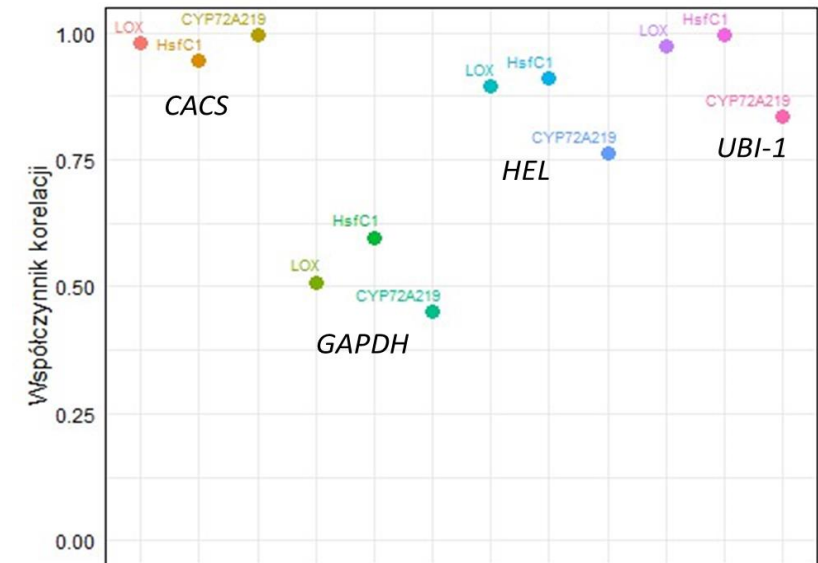
- ❑ Wyniki rankingu stabilności badanych genów referencyjnych (HKG) były niespójne i zależały od zastosowanego algorytmu oceny.
- ❑ Ogólny ranking wskazywał na geny: **CACS**, **UBI-1** i **TIP41** jako potencjalnie **najlepsze** do normalizacji transkryptów w roślinach ogórka poddawanych stresowi suszy oraz: **GAPDH**, **ACT** i **HEL** jako **najgorsze**.

WYNIKI

c.d. Temat badawczy 3. Porównawcze analizy transkryptomów metodą RNA-Seq w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem tolerancji na stres suszy



- ❑ Względne poziomy ekspresji trzech badanych genów, uzyskane dwiema metodami (RT-qPCR i RNA-Seq) były najbardziej zbliżone, gdy do normalizacji używano genu *CACS*, o czym świadczą wysokie wartości korelacji. Najbardziej odbiegające trendy obserwowano w przypadku genu *GAPDH*.
- ❑ Wybór odpowiedniego genu referencyjnego do normalizacji wyników reakcji RT-qPCR, dostosowanego do badanych warunków doświadczalnych, ma istotne znaczenie dla wiarygodnego oznaczenia poziomu ekspresji genów, a w konsekwencji - odpowiedniej interpretacji uzyskanych wyników.



WNIOSKI

- ❑ Wyniki fenotypowania wykazały, że wsobne linie rekombinacyjne populacji mapującej RIL F₈ (PI197088 x PI 175695) charakteryzują się dużym zróżnicowaniem pod względem odporności na *P. cubensis*.
- ❑ Segregacja fenotypów w pokoleniu F₈ obejmowała wszystkie klasy porażenia od 0 do 9, a rozkład linii RIL w poszczególnych klasach zbliżony był do **rozkładu normalnego** z przewagą roślin o średnim stopniu odporności i podatności, co wskazuje że odporność na *P. cubensis* u linii PI 197088 ma **charakter poligeniczny**.
- ❑ Trzy odporne linie: PI 197088, Ames 2353, i Ames 2354 potwierdziły wysoki i stabilny poziom odporności na *P. cubensis* w czterech 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 wolniej w północnej Polsce, co może być związane z mniej sprzyjającymi warunkami pogodowymi do rozwoju patogena panującymi w tej części kraju.

c.d. WNIOSKI

- ❑ W oparciu o wyniki rankingu stabilności badanych genów referencyjnych (HKG) wytypowano trzy geny *CACS*, *UBI-1* i *TIP41* jako potencjalnie najlepsze do normalizacji transkryptów w roślinach ogórka poddawanych stresowi suszy.
- ❑ Wybór odpowiedniego genu referencyjnego do normalizacji wyników reakcji RT-qPCR, dostosowanego do badanych warunków doświadczalnych, ma istotne znaczenie dla wiarygodnego oznaczenia poziomu ekspresji genów, a w konsekwencji - odpowiedniej interpretacji uzyskanych wyników.

PREZENTACJA WYNIKÓW BADAŃ

- ❑ Kłosińska U. 2023. Ocena poziomu odporności na *Pseudoperonospora cubensis* wybranych materiałów ogórka w różnych lokalizacjach Polski. Konferencja naukowa organizowana przez PTNO pt.: *Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka*, Olsztyn, 21-22 czerwca 2023 r. (poster).