

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 Gołębiowska¹, 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 2025	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	Konstrukcja wysoko zagęszczonej mapy genetycznej dla populacji mapującej RIL F ₈ (PI 197088 x PI 175695).	tak
III	Identyfikacja i charakterystyka loci cech ilościowych (QTL) związanych z odpornością ogórka na <i>P. cubensis</i> w linii PI 197088.	tak
IV	Ocena trwałości poziomu odporności na mączniaka rzekomego w nowo zidentyfikowanych odpornych genotypach ogórka.	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)
- 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)
- konstrukcja mapy genetycznej (JoinMap) w oparciu o:
 - dane fenotypowe 92 linii wsobnych populacji mapującej RIL F₈ (PI 197088 x PI 175695)
 - wysokoprzepustowe genotypowanie DArTseq metodą sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS)



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)



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

Tabela 1. Zróżnicowanie fenotypowe 110 linii populacji mapującej RIL F₈ (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	1,80	8,90	6,80	1,8	0,66	-1,15	26,48
Raciborowice	1,70	9,00	7,20	1,8	0,94	-1, 20	24,72

- Na podstawie przeprowadzonego fenotypowania stwierdzono, że wsobne linie rekombinacyjne populacji mapującej RIL F₈ (PI197088 x PI 175695) charakteryzują się średnim do małego zróżnicowaniem pod względem odporności na *P. cubensis*, patogena wywołującego mączniaka rzekomego (CV = 24,7 - 26,5%).
- W przypadku doświadczenia w Skierniewicach rozkład fenotypów w pokoleniu F₈ zbliżony jest do rozkładu normalnego na co wskazuje wartość kurtozy (K = 0,7), a ujemna wartość skośności (S = - 1,2) wskazuje na jego niewielkie przesunięcie w prawą stronę, co z kolei oznacza że większość linii populacji F₈ ma wartości powyżej średniej. Natomiast w przypadku doświadczenia zlokalizowanego w Raciborowicach, stwierdzono że rozkład fenotypów oddalony jest od normalnego i przesunięty w prawą stronę.

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

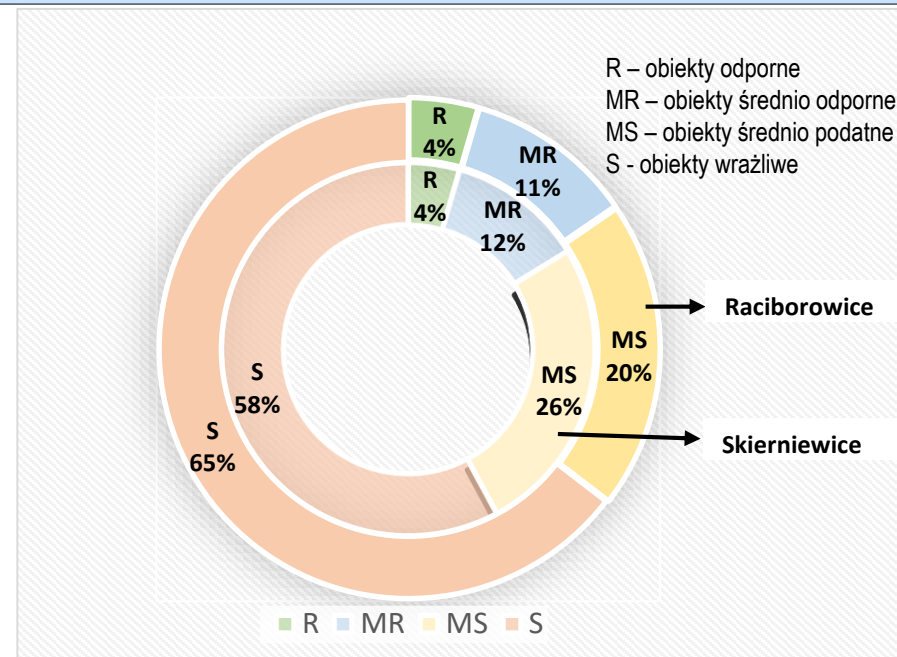
- Niezależnie od lokalizacji, najmniej liczną była grupa linii odpornych, których udział w badanej populacji F_8 w obu lokalizacjach wynosił 4%. Nieco więcej linii zaklasyfikowano do grupy średnio odpornych 11 i 12%, odpowiednio dla Raciborowic i Skierniewic. Najliczniej reprezentowane były linie średnio podatne (MS), które stanowiły 20 i 26% populacji mapującej oraz linie podatne (S), których udział wynosił 58 i 65% odpowiednio w Skierniewicach i Raciborowicach.



Skierniewice, druga połowa września 2025 r.



Odporna linia RIL F_8 nr 41



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



Raciborowice, druga połowa IX 2025 r.;



Odporna linia RIL F_8 nr 104

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



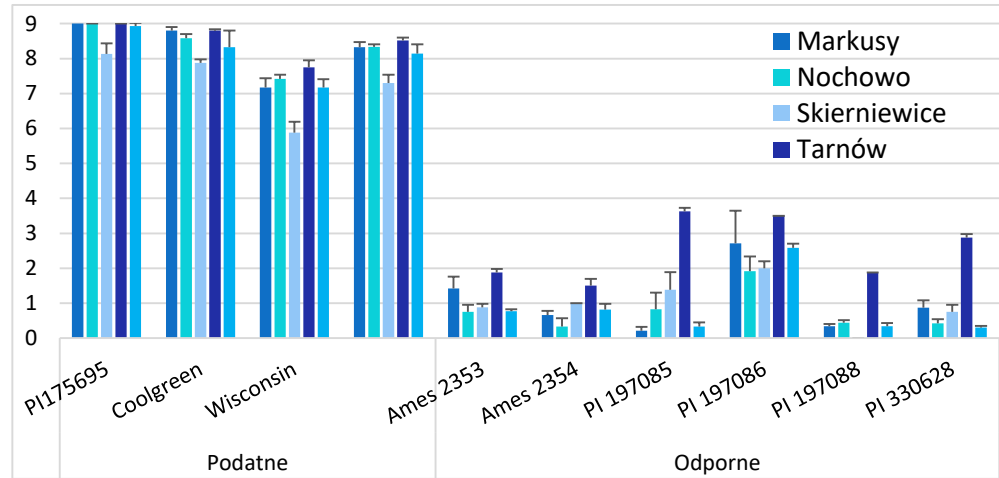
Charakterystyka mapy genetycznej ogórka

Chr	Długość mapy (cM)	Liczba markerów	Średnia gęstość (mark./cM)	Średnia odległość między markerami (cM)	Maksymalna odległość między markerami (cM)	Markery SNP (n)	Markery SilicoDARt (n)
1	118.0	262	2.2	0.45	8.31	131	131
2	167.0	236	1.4	0.71	4.16	136	100
3	197.9	403	2.0	0.49	4.46	238	165
4	264.7	216	0.8	1.23	15.04	123	93
5	134.7	280	2.1	0.48	4.0	164	116
6	133.2	273	2.0	0.49	5.56	157	116
7	216.1	220	1.0	0.99	6.35	116	104
Suma/średnia	1231.6	1890	1.7	0.7	-	1065	825

- Całkowita długość mapy wyniosła 1231,6 cM, a długości poszczególnych chromosomów mieściły się w przedziale od 118,0 (LG1) do 264,7 cM (LG4).
- Liczba markerów przypadających na pojedynczy chromosom wahała się od 216 (LG4) do 403 (LG3). Średnia gęstość markerów dla całego genomu wyniosła 1,7 markera/cM, natomiast średnia odległość pomiędzy markerami - 0,7 cM, co potwierdza wysoką rozdzielczość mapy.
- Minimalne odległości między markerami wyniosły 0 cM, co wskazuje na obecność licznych markerów współsegregujących, typowych dla map wysokiej gęstości.

Mapa genetyczna ogórka oparta na 92 liniach RIL F_8 (PI 197088 – odporna $\times$ PI 175695 – podatna), obejmująca siedem grup sprzężeń odpowiadających chromosomom genomu ogórka (Gy14).

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.

Linia/odmiana	Markusy	Nochowo	Skierniewice	Tarnów	Raciborowice
Podatna					
PI175695	9,0 a	9,0 a	8,1 a	9,0 a	8,9 a
Coolgreen	8,8 a	8,6 a	7,9 a	8,9 a	8,4 a
Wisconsin	7,2 b	7,4 b	5,9 b	7,8 ab	7,2 b
Średnia	8,3	8,3	7,3	8,6	8,2
Odporna					
Ames 2353	1,4 d	0,6 d	0,9 cd	1,9 de	0,8 d
Ames 2354	0,7 de	0,3 d	1,0 cd	1,5 e	0,8 d
PI 197085	0,2 e	0,8 cd	1,4 cd	3,6 c	0,3 de
PI 197086	2,7 c	1,9 c	2,0 c	3,5 c	2,6 c
PI 197088	0,3 e	0,4 d	0,0 de	1,9 de	0,3 de
PI 330628	0,9 de	0,4 d	0,8 d	2,9 cd	0,3 de
Średnia	1,0	0,7	1,0	2,6	0,9

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.

- 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 = 0,6**.

WNIOSKI

- Wyniki fenotypowania wykazały, że wsobne linie rekombinacyjne populacji mapującej RIL F₈ (PI197088 x PI 175695) charakteryzują się średnim do małym zróżnicowaniem pod względem odporności na *P. cubensis* w warunkach naturalnej infekcji w Skierniewicach (woj. łódzkie) i w Raciborowicach (woj. małopolskie).
- Segregacja fenotypów w pokoleniu F₈ 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 przesunięty w prawą stronę o czym świadczą wysokie wartości bezwzględne kurtozy i skośności.
- Wysokorozdzielcza mapa genetyczna skonstruowana w oparciu o dane fenotypowe oraz genotypowanie DArTseq stwarza możliwość identyfikacji loci ilościowych QTL związanych z odpornością ogórka na *P. cubensis*
- Pięć odpornych linii: PI 197088, PI 197085, PI330628 Ames 2353 i Ames 2354 potwierdziło 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.

Podsumowanie i najważniejsze osiągnięcia projektu

- Wyniki fenotypowania wykazały, że wsobne linie rekombinacyjne **populacji mapującej RIL F₈ (PI197088 x PI 175695)** charakteryzują się średnim zróżnicowaniem pod względem odporności na *P. cubensis* w warunkach naturalnej infekcji w Skierniewicach (woj. łódzkie) i w Raciborowicach (woj. małopolskie).
- Wysokorozdzielcza mapa genetyczna uzyskana dla populacji mapującej składającej się z 92 linii RIL (F8) pochodzących ze skrzyżowania PI 197088 × PI 175695 stanowi wiarygodne narzędzie do identyfikacji loci związanych z odpornością ogórka na *P. cubensis*.
- Połączenie danych genotypowych z istniejącymi, wielośrodowiskowymi obserwacjami fenotypowymi stwarza możliwość przeprowadzenia wiarygodnej analizy QTL oraz wskazania regionów genomu istotnych dla odporności ogórka, które mogą zostać poddane dalszej walidacji i wykorzystane w selekcji hodowlanej.
- Wszystkie linie odporne, za wyjątkiem PI 197086 potwierdziły na przestrzeni wielolecia swój bardzo wysoki i stabilny poziom odporności na *P. cubensis* niezależnie od lokalizacji doświadczania, 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 otrzymanych wyników przypuszcza się, że gen **CsGy2025730** kodujący **enzym z rodziny cytochromu P450 (CYP82D47-like)** odgrywa istotną rolę w odporności ogórka na stres suszy u linii tolerancyjnej **SU2**, co może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad mechanizmami adaptacyjnymi roślin ogórka wobec tego rodzaju stresu środowiskowego.

PREZENTACJA WYNIKÓW BADAŃ

Publikacje

- Szczechura, W., Kłosińska, U., Nowakowska, M., Nowak, K., Nowicki, M., Kozik, E. U., & Tyrka, M. 2025. Novel Resistance Determinants from Cucumber PI 197085 Against *Pseudoperonospora cubensis*. *Agronomy*, 15(11), 2633. <https://doi.org/10.3390/agronomy15112633>
- Szczechura, W., Kłosińska, U., Nowakowska, M., Nowak, K., Nowicki, M. 2025. Reliable Gene Expression Normalization in Cucumber Leaves: Identifying Stable Reference Genes Under Drought Stress. *Agronomy* (po recenzjach)

Konferencje

- Kłosińska U., Nowakowska M., Szczechura W., Nowak K., Nowicki M. 2021. Insights into *Cucumis sativus* drought stress tolerance using RNA sequencing. XIIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Almeria, Spain, May 24 - 28, 2021 r. (referat)
- Kłosińska U. 2023. Ocena poziomu odporności na *Pseudoperonospora cubensis* wybranych materiałów ogórka w różnych lokalizacjach Polski. Konferencja naukowa organizowana przez PTNO „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka”, Olsztyn, 21-22 czerwca 2023 r. (poster)
- Szczechura W., Kłosińska U., Nowakowska M., Nowak K., Nowicki M. 2024. Porównawcze analizy transkryptomów metodą RNA-Seq w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem tolerancji na stres suszy. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Innowacyjne ogrodnictwo źródłem produktów wysokiej jakości”, Lublin, 04-06 czerwca 2024 r. (poster)