

# Identyfikacja wybranych genów związanych z typem wzrostu roślin ogórka (*Cucumis sativus* L.)

Okres realizacji zadania: 2023 rok

Miejsce realizacji zadania:

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Kierownik zadania:

prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski

e-mail: [grzegorz\\_bartoszewski@sggw.edu.pl](mailto:grzegorz_bartoszewski@sggw.edu.pl)

Główni wykonawcy:

dr inż. Renata Słomnicka, dr inż. Aleksandra Korzeniewska, dr inż. Helena Olczak-Woltman

## **Cel zadania**

Identyfikacja wybranych genów odpowiedzialnych za typ wzrostu roślin ogórka oraz opracowanie markerów molekularnych dla zidentyfikowanych genów, potencjalnie przydatnych w hodowli twórczej tego gatunku

### **Cele zadania w 2023 roku**

1. Ocena fenotypowa rodzin F<sub>3</sub> wytypowanych populacji mapujących ogórka i rozmnożenie linii rodzicielskich
2. Genotypowanie przez sekwencjonowanie i z wykorzystaniem markerów PCR populacji mapujących ogórka
3. Mapowanie genów typu wzrostu roślin ogórka i wstępna analiza ekspresji zidentyfikowanych genów

**Cele zadania zaplanowane na 2023 rok zostały w pełni osiągnięte**

# **Materiały i metody**

## **Materiał roślinny**

- Trzy populacje mapujące ogórka  $F_2$  wraz z rodzinami  $F_3$  oraz linie rodzicielskie tych populacji, tj.: L500, L504, L505 i L511

## **Metody badawcze**

- **Ocena fenotypowa** przygotowanie i wysiew nasion do wielodoniczek, uprawa roślin, ocena wizualna typu wzrostu roślin
- **Analiza statystyczna** test  $\chi^2$  dla danych oceny fenotypowej i genotypowej populacji mapujących  $F_{2:3}$
- **Rozmnożenie linii rodzicielskich** uprawa roślin w szklarni, wykonanie samozapyleń, zebranie nasienników i pozyskanie nasion
- **Genotypowanie przez sekwencjonowanie** izolacja i ocena jakości DNA, genotypowanie DArTSeq, konstrukcja prób zbiorczych DNA, sekwencjonowanie Illumina Novaseq, ocena jakości danych sekwencjonowania FastQC
- **Testowanie markerów PCR** projektowanie starterów program Primer3, reakcja łańcuchowa polimerazy PCR, trawienie restrykcyjne ampliconów, elektroforeza agarozowa
- **Analizy bioinformatyczne** identyfikacja polimorfizmów SNP i INDEL, mapowanie polimorfizmów na genomach referencyjnych
- **Konstruowanie map genetycznych** dla każdej z trzech badanych populacji, program JoinMap 4.0, przypisanie grup sprzężeń do genomów referencyjnych, analiza BSA-seq, identyfikowanie genów kandydackich w bazie CucurbitGenomics v2
- **Analiza ekspresji genów** izolacja RNA, synteza cDNA, analiza RT-qPCR, analiza wyników metodą  $\Delta\Delta C_t$

## Wyniki

### Ocena fenotypowa rodzin $F_3$ trzech populacji mapujących $F_2$ ogórka i rozmnożenie linii rodzicielskich

- Ocenę typu wzrostu rodzin  $F_3$  populacji uzyskanych z krzyżowania linii L504, L505 i L511 z linią L500 wykonano w tunelach foliowych. Ocenę wykonano w fazie 2-4 liści właściwych
- Ocena w tunelu foliowym była jednoznaczna dla:
  - 58 rodzin  $F_3$  L500 × L504 – 40 segregowało, 18 nie segregowało
  - 76 rodzin  $F_3$  L500 × L511 – 53 segregowało, 23 nie segregowały
- Dla rodzin  $F_3$  L500 × L505, z powodu niejednoznacznej oceny w tunelu, wykonano dodatkowo weryfikację wyników w szklarni, łącznie oceniono:
  - 66 rodzin  $F_3$  L500 × L505 – 42 segregowało, 24 nie segregowały
- Analiza statystyczna danych dla populacji  $F_{2:3}$  potwierdziła, że zmieniony typ wzrostu roślin we wszystkich populacjach jest warunkowany przez pojedyncze geny recesywne
- Rozmnożono linie L505 i L511 uzyskując >750 nasion dla każdej z linii

**Wykonano ocenę typu wzrostu roślin dla 194 rodzin  $F_3$  i rozmnożono linie L505 i L511 (uprawiano po 10 roślin)**



Ocena typu wzrostu roślin w tunelu foliowym

## Wyniki

### Genotypowanie przez sekwencjonowanie dla trzech wybranych populacji mapujących ogórka

**Analiza DArTseq:** zidentyfikowano 4518 SNP i insilico SNP dla trzech badanych populacji  $F_{2:3}$  i wskazano markery przydatne do mapowania

- najwięcej SNP zidentyfikowano dla populacji L500 × L504 860 SNP (32,3%)  
- 697 segregowało 1:2:1 w  $F_{2:3}$
- dla populacji L500 × L511 zidentyfikowano 516 SNP (19,4%)  
- 435 SNP segregowało 1:2:1 w  $F_{2:3}$
- najmniej SNP zidentyfikowano dla populacji L500 × L505 345 SNP (13%)  
- 286 SNP segregowało 1:2:1 w  $F_{2:3}$

**Sekwencjonowanie prób zbiorczych:** skonstruowano próby zbiorcze, składające się z DNA homozygot dominujących (Pool WT) i homozygot recesywnych (Pool M), które sekwencjonowano i identyfikowano polimorfizm

- najwięcej SNP zidentyfikowano dla prób L500 × L504 - ok. 37.5 tys  
najmniej dla populacji L500 × L505 - ok. 32.8 tys
- 52% SNP miało charakter zmian synonimicznych
- zidentyfikowano zbliżoną liczbę polimorfizmów INDEL dla populacji L500 × L505 i L500 × L511 i nieznacznie więcej dla L500 × L505
- 53% polimorfizmów INDEL zmieniało ramkę odczytów

### Podsumowanie wyników genotypowania DArTSeq

Populacja $F_{2:3}$	SNP różnicujące rodziców	SNP segregujące 1:2:1
L500 × L504	860	697
L500 × L505	345	286
L500 × L511	516	435

### Podsumowanie wyników sekwencjonowania prób zbiorczych DNA

Populacja $F_{2:3}$ próba zbiorcza	Liczba SNP	Liczba polimorfizmów INDEL
<b>L500 × L504</b>		
Pool WT	37365	2348
Pool M	37720	2366
<b>L500 × L505</b>		
Pool WT	32793	2173
Pool M	32864	2159
<b>L500 × L511</b>		
Pool WT	34094	2149
Pool M	33661	2074
<b>Średnia</b>	<b>34750</b>	<b>2212</b>

Genotypowanie przez sekwencjonowanie pozwoliło na zidentyfikowanie markerów SNP i INDEL

## Wyniki

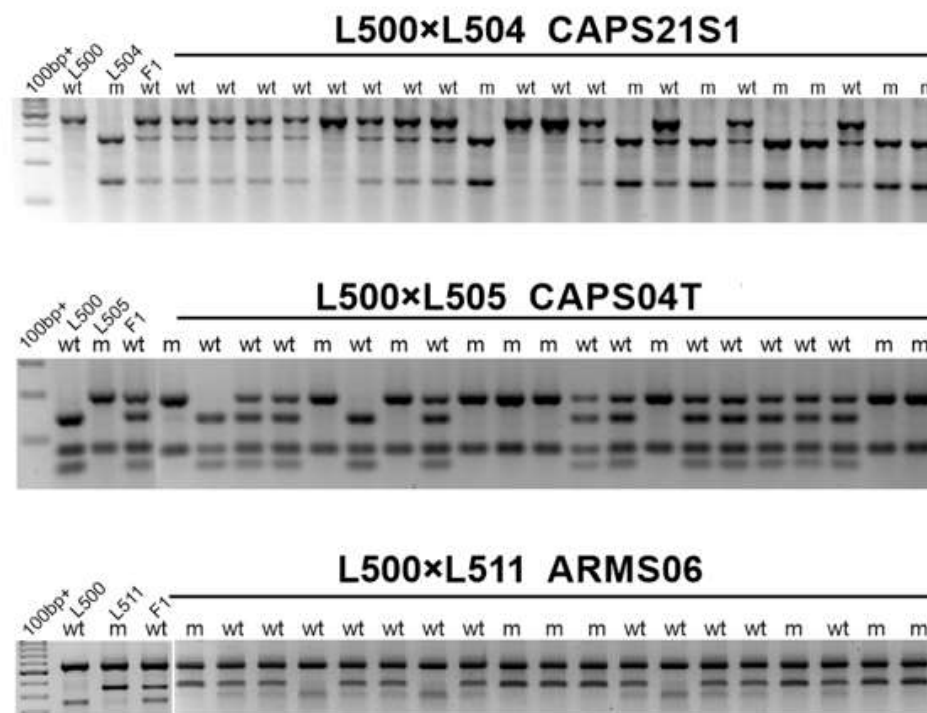
### Testowanie markerów PCR na wybranych populacjach mapujących F<sub>2</sub>

Testowano po trzy dobrze działające markery PCR na każdej z trzech populacji, pozwalające na weryfikację polimorfizmów typu SNP lub INDEL, znajdujące się w obrębie potencjalnych genów kandydackich:

- zgodność fenotypu z genotypem markerów w populacji L500 × L504 wynosiła 99% dla CAPS 21S1 i CAPS 21D2 oraz 98% dla INDEL 21IN5
- zgodność fenotypu z genotypem markerów w populacji L500 × L505 wynosiła 97% wszystkich trzech testowanych markerów CAPS 04T, CAPS 04A2 i INDEL 02IN2
- zgodność fenotypu z genotypem markerów w populacji L500 × L511 98,9% dla ARMS06 i CAPS03X oraz 87% dla INDEL03IN2

Testowanie markerów PCR w populacjach mapujących składających się ze 180 pojedynków F<sub>2</sub> pokazało, że wskazano obiecujące geny kandydackie dla genów odpowiedzialnych za zmieniony typ wzrostu roślin ogórka

Przykładowe profile amplifikacyjne otrzymane w wyniku genotypowania populacji mapujących z wykorzystaniem trzech markerów PCR w trzech populacjach



L500, L504, L505, L511 – linie rodzicielskie  
wt – pojedynki F<sub>2</sub> o normalnym typie wzrostu  
m – pojedynki F<sub>2</sub> o zmienionym typie wzrostu  
100bp+ – marker wielkości DNA

# Wyniki

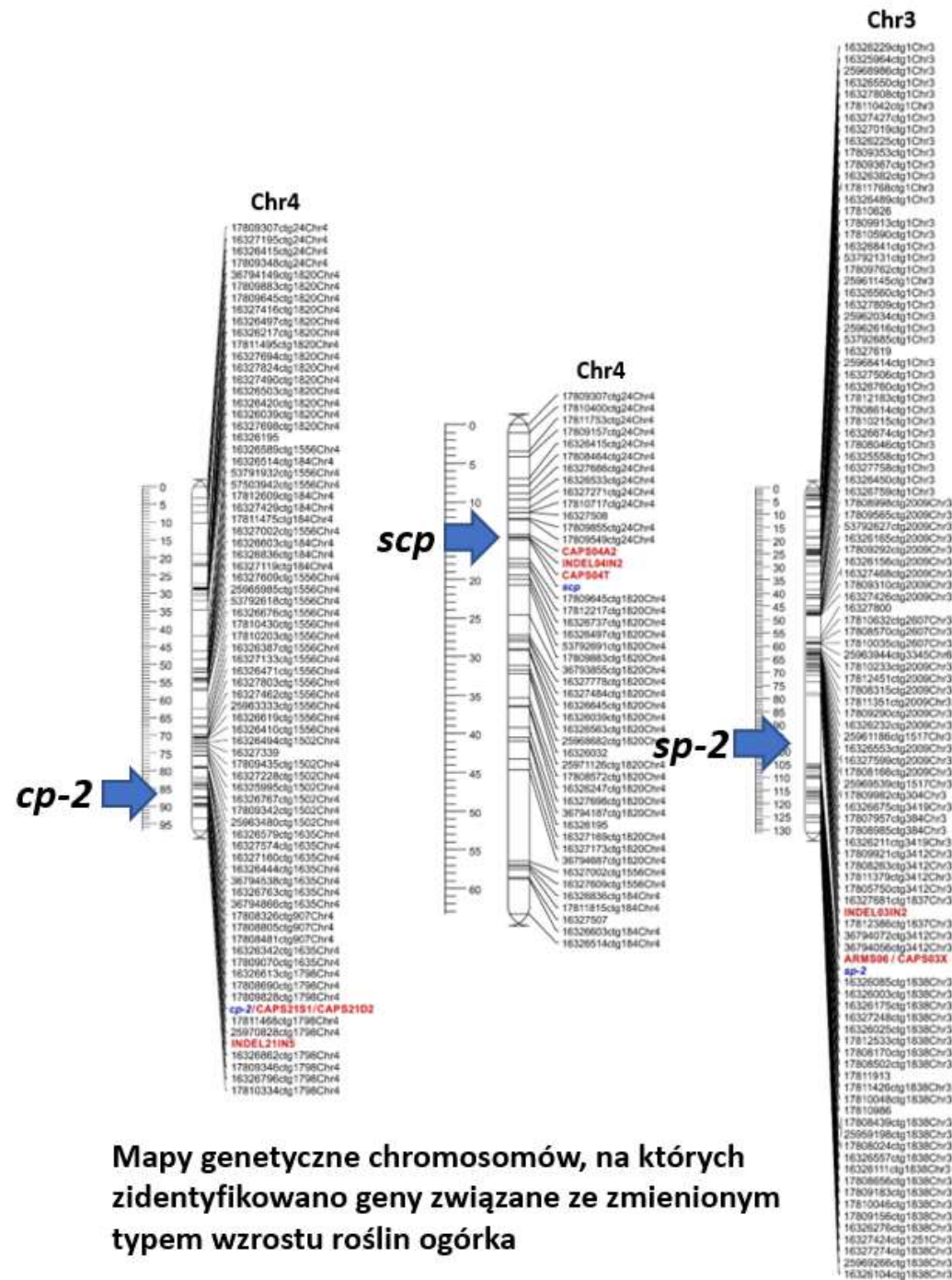
## Mapowanie genów typu wzrostu roślin ogórka

Sekwencjonowanie prób zbiorczych pozwoliło wskazać polimorfizmy SNP i INDEL, różnicujące próby zbiorcze i wykonać analizę BSA-Seq

Markery SNP i oparte o PCR wykorzystano do skonstruowania map genetycznych i mapowania genów odpowiedzialnych za zmieniony wzrost roślin ogórka

- W populacji L500 × L504 na dolnym ramieniu chromosomu 4 zmapowano gen *cp-2*, w rejonie genomu o wielkości 253 kb
- W populacji L500 × L505 na górnym ramieniu chromosomie 4 zmapowano gen *scp* w rejonie o wielkości 717 kb
- Gen *sp-2* segregujący w populacji L500 × L511 zmapowano na dolnym ramieniu chromosomie 3 w dość dużym rejonie genomu o wielkości 6.6 Mb

Wyniki analizy BSA-seq oraz mapowania markerów SNP i PCR były zgodne i pozwoliły na zmapowanie genów odpowiedzialnych za zmieniony typ wzrostu roślin ogórka



Mapy genetyczne chromosomów, na których zidentyfikowano geny związane ze zmienionym typem wzrostu roślin ogórka

## Wyniki

### Analiza ekspresji wybranych genów metodą RT-qPCR

Do analizy wytypowano 10 genów na podstawie wyników analizy transkryptomów i mapowania genetycznego – były to geny związane z biosyntezą brassinosteroidów (BR)

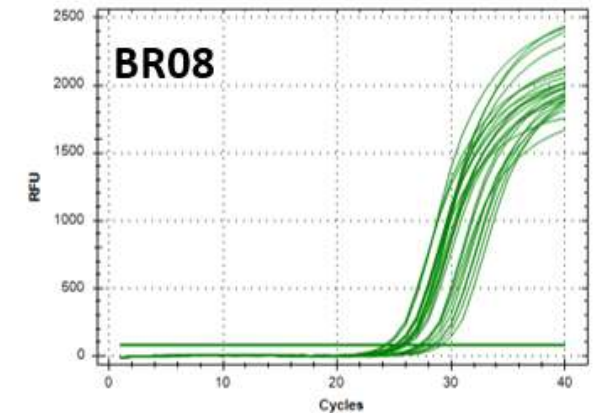
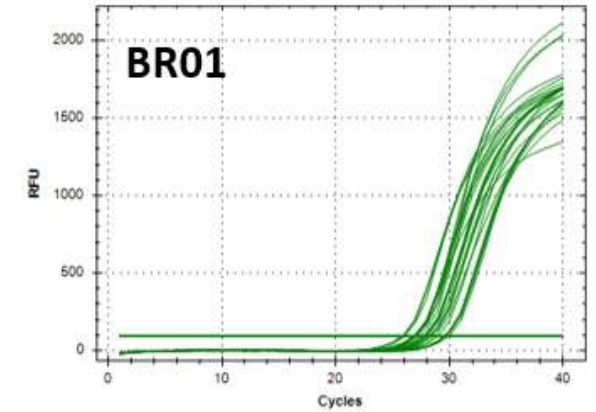
Badano linie L505 i L511 w odniesieniu do linii kontrolnej L500

Ekspresję badano w pędach roślin, w fazie 1-2 liści, uprawianych w warunkach fitotronowych

#### Stwierdzono, że:

- linia L505 wykazuje istotnie niższą ekspresję genu BR04 i wyższą genu BR08
- linia L511 wykazuje niższą ekspresję genów BR07 i BR10 i wyższą BR01 i BR08

**Potwierdzono zmienioną ekspresję genów związanych z biosyntezą brassinosteroidów: dwóch genów u linii L505 i czterech genów u linii L511**



**Przykładowe krzywe amplifikacji RT-qPCR uzyskane dla dwóch genów BR01 i BR08 związanych z biosyntezą brassinosteroidów**



## Wnioski

### Ocena fenotypowa rodzin F<sub>3</sub> trzech populacji mapujących F<sub>2</sub> ogórka i rozmnożenie linii rodzicielskich

- Dzięki rodzinom F<sub>3</sub> wskazano homozygoty dominujące pokolenia F<sub>2</sub> w loci warunkujących zmieniony typ wzrostu
- Potwierdzono, że zmieniony typ wzrostu linii L504, L505 i L511 jest warunkowany pojedynczymi genami recesywnymi

### Genotypowanie przez sekwencjonowanie i z wykorzystaniem markerów PCR populacji mapujących ogórka

- Genotypowanie DArTSeq, sekwencjonowania prób zbiorczych i genotypowanie PCR umożliwiły zidentyfikowanie markerów molekularnych przydatnych do mapowania genów odpowiedzialnych za zmieniony typ wzrostu roślin ogórka

### Mapowanie genów typu wzrostu roślin ogórka i wstępna analiza ekspresji zidentyfikowanych genów

- Skonstruowano mapy genetyczne i zmapowano trzy geny odpowiedzialne za zmieniony typ wzrostu roślin ogórka
- Wskazano geny kandydackie dla genów zmienionego typu wzrostu *cp-2*, *scp* i *sp-2*
- Wskazano geny związane z biosyntezą brassinosteroidów ulegające zmienionej ekspresji u linii L505 i L511

## Prezentacja wyników badań

### Postery

Każmińska K, Słomnicka R, Mużacz S, Zembruski K, Grad M, Stokowiec D, Korzeniewska A, Bartoszewski G (2023). Analiza genetyczna linii ogórka charakteryzujących się zmienionym typem wzrostu roślin. VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Olsztyn 21-22 czerwca 2023, Książka streszczeń, str. 30

Słomnicka R, Każmińska K, Bartoszewski G (2023). Transcriptome profiling of cucumber lines characterized by dwarf plant architecture. 11th Conference Polish Society of Experimental Plant Biology, Poznań 19-22 września 2023, Książka streszczeń, str. 182