

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

Okres realizacji zadania: 2021 r.

Miejsce realizacji zadania:

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin  
Szkoła 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. Karolina Kaźmińska, dr inż. Aleksandra Korzeniewska,  
mgr inż. Marta Romać, 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 2021 roku**

1. Przeprowadzenie oceny fenotypowej linii ogórka charakteryzujących się różnym typem wzrostu roślin
2. Wykonanie krzyżowań na potrzeby analizy genetycznej i mapowania molekularnego
3. Zrekwencjonowanie genomów badanych linii ogórka i wstępna analiza danych sekwencyjnych

**Cele zadania zaplanowane na 2021 rok zostały w pełni osiągnięte**

# Materiały i metody

## Materiał roślinny

- 10 linii ogórka o różnym nasileniu krzaczastości oraz dwie linie kontrolne o normalnym typie wzrostu: L500 (B<sub>10</sub>DH) oraz L501 (linia Gy14)

## Metody

- **Doświadczenie w tunelu foliowym i w polu (2 doświadczenia):** ocena fenotypowa cech związanych z pokrojem i typem wzrostu roślin, budową i barwą liści, nasileniem żeńskości, barwą kolców na owocach - łącznie zostało ocenionych 11 cech, wykonano analizy statystyczne
- **Krzyżowania:** dwie linie ogórka o normalnym typie wzrostu skrzyżowano wiosną w szklarni z 10 liniami o zmienionym typie wzrostu. Spośród uzyskanych 20 kombinacji wytypowano 12 do wykonania krzyżowań w szklarni w cyklu jesiennym celem uzyskania nasion pokolenia F<sub>2</sub> oraz BC<sub>1</sub> i BC<sub>2</sub>
- **Izolacja DNA i resekwencjonowanie genomów:** dla 10 linii o zmienionym typie wzrostu z wykorzystaniem technologii Illumina
- **Analizy bioinformatyczne:** (1) mapowanie odczytów sekwencyjnych na genomie referencyjnym B10v3 ogórka i (2) identyfikacja polimorfizmów SNP i InDel w obrębie genów wskazanych jako odpowiedzialne za typ wzrostu ogórka
- **Walidacja analiz bioinformatycznych:** wytypowanie 20 rejonów genomów ze stwierdzonymi polimorfizmami SNP i InDel, zaprojektowanie starterów do wykonania reakcji PCR, sekwencjonowanie i analiza sekwencji produktów amplifikacji

doświadczenie w tunelu foliowym



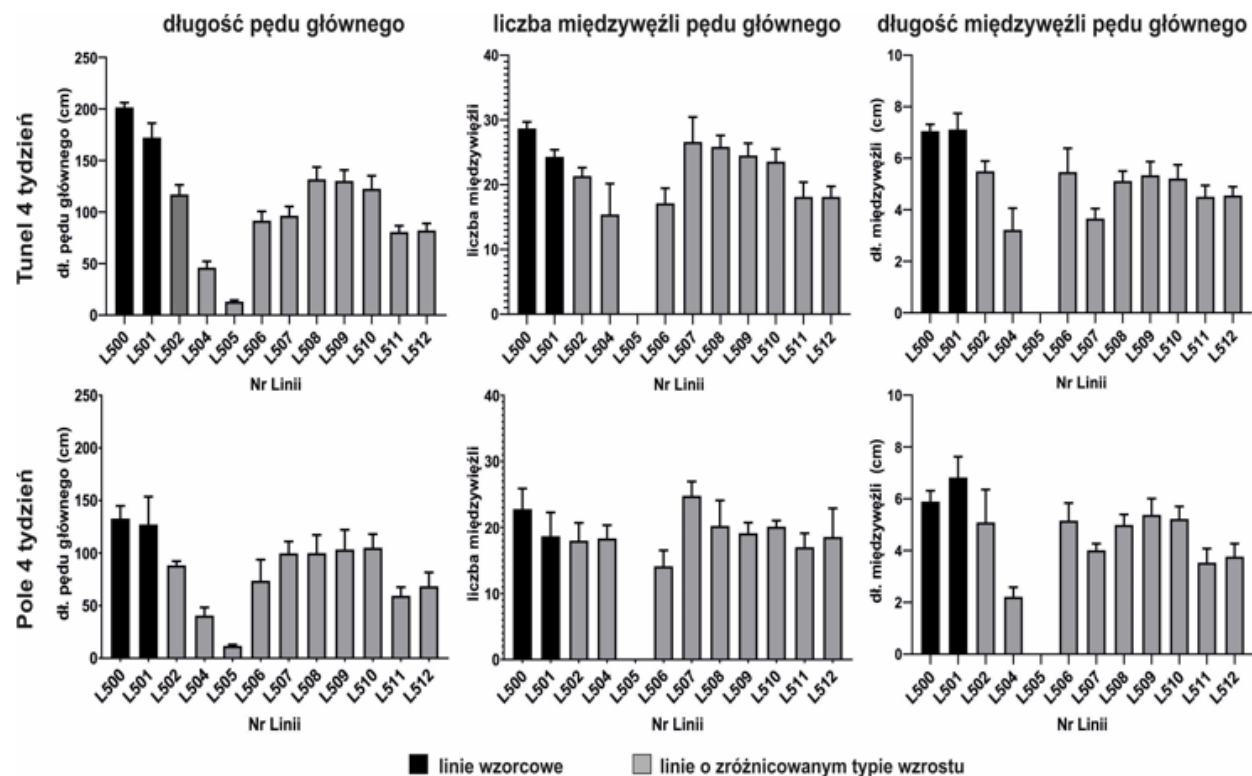
doświadczenie w polu



# Wyniki: Ocena cech związanych z pokrojem roślin – cechy pędu głównego

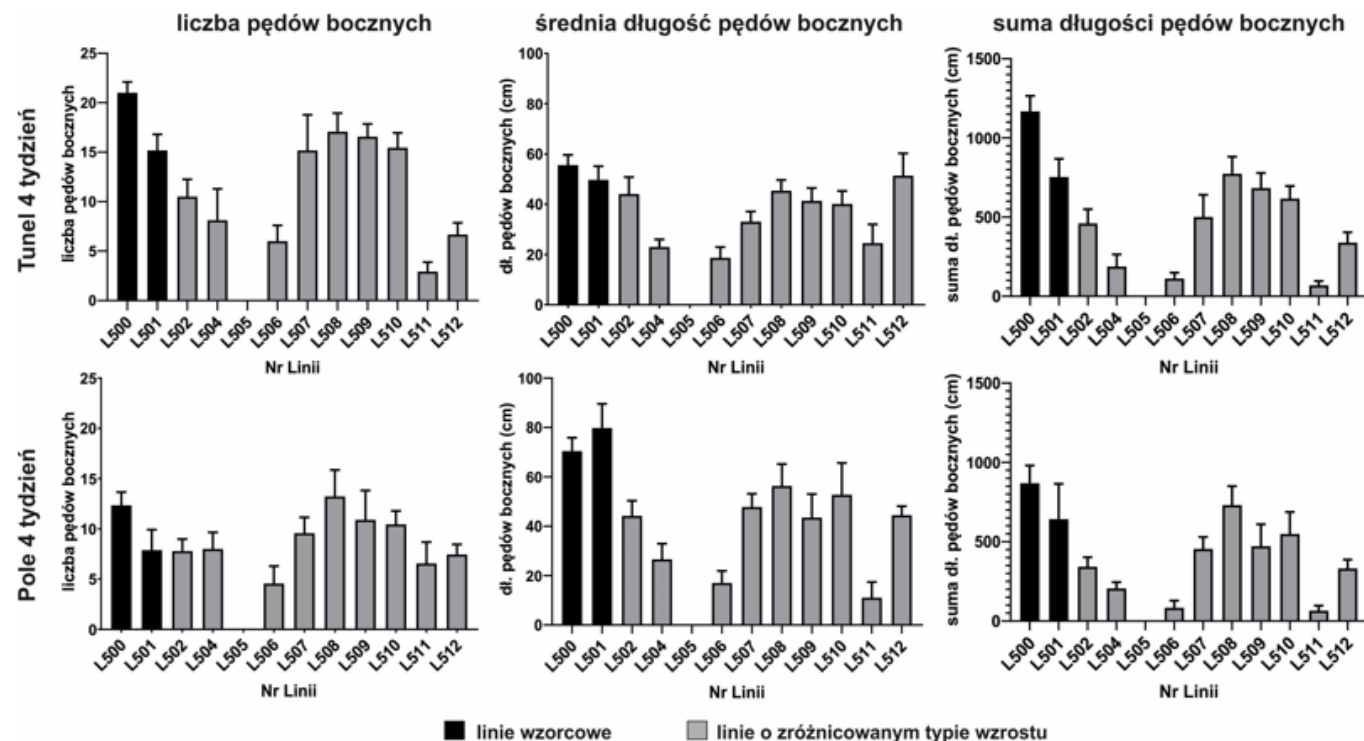
Badane linie charakteryzowały się dużą zmiennością względem analizowanych cech, zarówno w uprawie polowej, jak i w tunelu foliowym

- obserwowano wyraźnie dłuższe pędy główne i większą liczbę międzywęźli na pędach roślin rosnących w tunelu foliowym
- oceniane linie odznaczały się wyraźnie niższymi wartościami badanych cech w porównaniu z liniami kontrolnymi
- najkrótszymi pędami głównymi, niezależnie od sposobu uprawy, charakteryzowała się linia L505 o rozetowym typie pokroju, dla tej linii nie było możliwe określenie liczby i długości międzywęźli
- około 3 razy krótszy pęd główny od linii kontrolnych oraz najmniejszą liczbę i długość międzywęźli posiadały linie: L504, L511 i L512



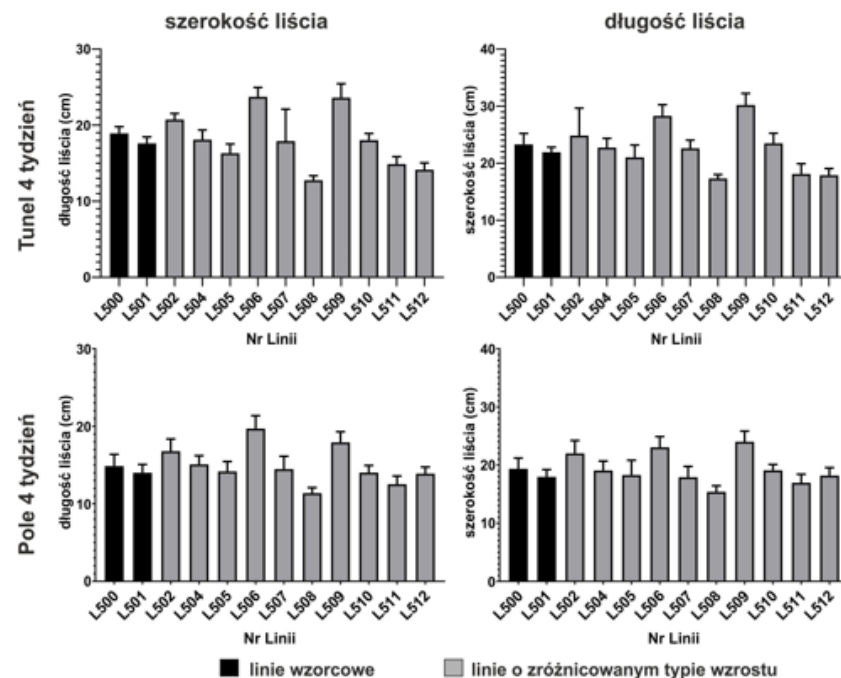
## Wyniki: Ocena cech związanych z pokrojem roślin – pędy boczne

- Obserwowano wyraźnie większą liczbę i długość pędów bocznych oraz sumę długości pędów bocznych na roślinach rosnących w tunelu foliowym
- Linia L505 nie wytwarzała pędów bocznych i została opisana jako jednopędowa
- Pozostałe linie odznaczały się wyraźnie niższymi wartościami badanych cech w porównaniu z liniami kontrolnymi L500 i L501
- Najmniejszą liczbę pędów bocznych, długość pędów bocznych oraz łączną długość pędów bocznych obserwowano dla roślin linii L511 oraz L506



## Wyniki: Ocena budowy liści

- niezależnie od sposobu uprawy liście o największych blaszkach liściowych tworzyły linie L506 i L509, natomiast najmniejsze linia L508
- liście linii L511 zdecydowanie różniły się od pozostałych linii i posiadały najkrótsze ogonki liściowe
- dla roślin rosnących w polu obserwowano wyraźną dodatnią korelację pomiędzy długością ogonków liściowych a długością pędu głównego, długością międzywęzła i długością pędu bocznego



## Wyniki: Ocena płci, barwy liści i kolców

- badane linie były **jednopienne** (6 linii i kontrola L500) lub **żeńskie** (4 linie i kontrola L501)
- obserwowano zróżnicowanie **barwy liści**, od jasnozielonej dla linii L512, przez zieloną (5 linii i kontrola L500) i ciemnozieloną (2 linie i kontrola L501) do bardzo ciemnozielonej dla linii L505 i L511
- Kolce na owocach** badanych linii były barwy białej (6 linii i kontrola L501) lub ciemnej (4 linie i kontrola L501)

łącznie oceniono 11 cech roślin w 2 doświadczeniach

## Wyniki: Krzyżowanie linii ogórka

- W doświadczeniu prowadzonym w **cyklu wiosennym** otrzymano nasiona dla 20 kombinacji krzyżowań gdzie liniami matecznymi były linie L500 (B10DH) i L501 (Gy14), charakteryzujące się normalnym typem wzrostu, zaś liniami ojcowskimi 10 linii o różnym nasileniu krzaczastości
- Poprzez samozapylenie roślin rozmnożono pojedynki linii matecznych i ojcowskich biorących udział w tych krzyżowaniach
- Wytypowano 12 kombinacji  $F_1$  do wysiewu w szklarni w **cyklu jesiennym**. Rośliny pokoleń  $F_1$  zostały samozapylone i otrzymano nasiona pokolenia  $F_2$ . Wykonano krzyżowania wstecznych  $BC_1$  i  $BC_2$  dla każdej z dwunastu kombinacji  $F_1$

Zestawienie kombinacji krzyżowań wykonanych w cyklu wiosennym i jesiennym

Cykl uprawowy	Liczba kombinacji krzyżówkowych	Pokolenia dla których uzyskano nasiona
Wiosna 2021	20	$P_1, P_2, F_1$
Jesień 2021	12	$F_2, BC_1, BC_2$

## Wyniki: Izolacja DNA, resekwencjonowanie genomów i analizy bioinformatyczne

- Zastosowanie metodyki przeznaczonej do tkanek trudnych pozwoliło na uzyskanie lepszej wydajności izolacji DNA
- Udało się zmapować około 99,5% odczytów dla wszystkich linii na genomie referencyjnym, przy pokryciu genomu wynoszącym powyżej 30x
- Zidentyfikowano od 3122 do 22703 polimorfizmów SNP i od 943 do 2226 InDel dla badanych linii - najmniej dla linii L512, zaś najwięcej dla linii L508
- Wskazano 10 genów kandydackich wpływających na typ wzrostu roślin ogórka, a w siedmiu stwierdzono polimorfizmy

Podsumowanie wyników mapowania odczytów sekwencyjnych uzyskanych w wyniku resekwencjonowania genomów 10 linii ogórka o zmienionym typie wzrostu na genomie referencyjnym B10 v.3 (Osipowski et al. 2020 Mol Genet Genom 295: 177–193)

Lp.	Linia	Współczynnik mapowania odczytów (%)	Pokrycie genomu
1	502	99.6	38x
2	504	99.6	39x
3	505	99.6	40x
4	506	99.6	38x
5	507	99.6	39x
6	508	99.5	40x
7	509	99.6	38x
8	510	99.5	38x
9	511	99.6	39x
10	512	99.6	61x

## Wyniki: Weryfikacja analiz bioinformatycznych

- Do weryfikacji analiz bioinformatycznych wytypowano 20 rejonów, w których stwierdzono występowanie polimorfizmów SNP lub InDel
- Wykonano analizę PCR, a następnie sekwencjonowanie produktów amplifikacji
- Stwierdzono pełną zgodność wyników PCR z analizami bioinformatycznymi w przypadku 19 rejonów
- Dla jednej pary starterów nie uzyskano czytelnych odczytów sekwencyjnych produktu PCR, co uniemożliwiło weryfikację polimorfizmu



# Wnioski

## Ocena fenotypowa linii ogórka o zmienionym typie wzrostu

1. Badane linie charakteryzowały się dużą zmiennością roślin, różniły się pokrojem, długością pędów, cechami liści, płcią i barwą kolców na owocach
2. Rośliny rosnące w tunelu foliowym, w porównaniu z uprawianymi w polu, miały dłuższy pęd główny oraz większą liczbę i długość pędów bocznych

## Krzyżowania wykonane na potrzeby analizy genetycznej i mapowania molekularnego

1. W cyklu wiosennym uzyskano nasiona pokolenia  $F_1$  ze skrzyżowań dwóch linii o normalnym typie wzrostu z 10 liniami o zmienionym typie wzrostu.
2. W cyklu jesiennym uzyskano nasiona pokoleń  $F_2$ ,  $BC_1$  i  $BC_2$  z 12 kombinacji  $F_1$ , co pozwala na realizację dalszych etapów badań

## Zrekwencjonowanie genomów linii ogórka o różnym typie wzrostu i wstępna analiza danych sekwencyjnych

1. Uzyskano dane sekwencyjne dobrej jakości dla 10 badanych linii
2. Wykonano dwie analizy bioinformatyczne i zidentyfikowano polimorfizmy dla danej linii w odniesieniu do genomu referencyjnego polskiej linii ogórka B10 v.3 i genów warunkujących typ wzrostu roślin ogórka
3. Dzięki PCR i sekwencjonowaniu amplikonów potwierdzono wybrane polimorfizmy zidentyfikowane metodami bioinformatycznymi