

Identyfikacja wybranych genów związanych z typem wzrostu roślin ogórka (*Cucumis sativus* L.) - zadanie 33

Okres realizacji zadania: 2021-2025

Miejsce realizacji zadania

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Kierownik zadania

prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski

Główni wykonawcy

dr inż. Renata Słomnicka, dr inż. Karolina Kaźmińska, dr inż. Magdalena Cieplak, mgr inż. Bartosz Biernacik,
mgr inż. Szymon Mużacz, mgr inż. Dominika Stokowiec, dr inż. Aleksandra Korzeniewska

Warszawa, 4 grudnia 2025 r.

Cele zadania

wykonanie oceny fenotypowej linii ogórka o różnym typie wzrostu roślin i stopniu nasilenia krzaczastości
i identyfikacja wybranych genów odpowiedzialnych za typ wzrostu roślin ogórka
oraz opracowanie markerów molekularnych, potencjalnie przydatnych w hodowli twórczej tego gatunku

Cele szczegółowe projektu

1. wykonanie porównawczej oceny fenotypowej linii o różnym pokroju roślin i pochodzeniu
2. wyprowadzenie i ocena fenotypowa populacji mapujących
3. mapowanie genów odpowiedzialnych za typu wzrostu roślin ogórka
4. identyfikacja i charakterystyka molekularna zidentyfikowanych genów kandydackich
5. analiza zmienności allelicznej i opracowanie markerów molekularnych dla wybranych genów odpowiedzialnych za zmieniony typ wzrostu roślin ogórka

Cele zadania i mierniki zaplanowane na lata 2021-2025 zostały w pełni osiągnięte

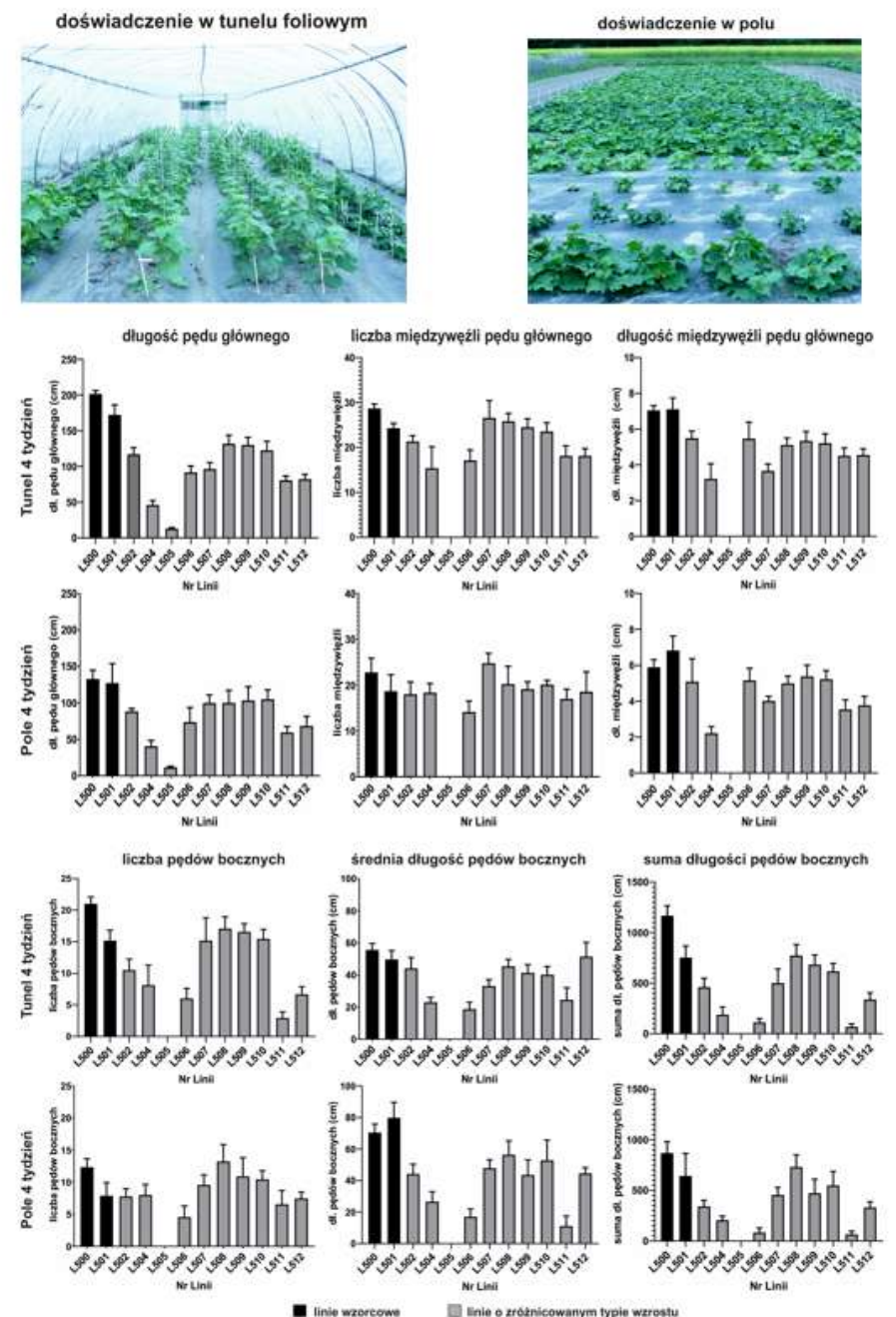
Ocena fenotypowa i analiza porównawcza linii charakteryzujących się zmienionym typem wzrostu roślin

Materiały i metody:

- 10 linii ogórka o różnym typie wzrostu i nasileniu krzaczastości L502-L512
- dwie linie kontrolne o normalnym typie wzrostu L500 oraz L501
- ocena cech związanych z typem wzrostu, długością pędów, morfologią liści, nasileniem żeńskości, barwą kolców na owocach - łącznie 11 cech, ocena w 4 tygodniu po posadzeniu,
- równoległe doświadczenia w tunelu foliowym i w polu, 3 powtórzenia po 6 roślin dla linii
- analiza statystyczna: analiza wariancji z użyciem metody ANOVA i testu Fishera

Wyniki:

- obserwowano wyraźnie dłuższe pędy główne i pędy boczne oraz większą liczbę międzywęźli dla 4-tygodniowych roślin rosnących w tunelu foliowym
- najkrótszymi pędami głównymi, niezależnie od sposobu uprawy, charakteryzowała się linia L505, linia ta nie wytwarzała pędów bocznych
- trzy linie posiadały około trzykrotnie krótsze pędy główne w porównaniu z liniami kontrolnymi i mniejszą liczbę oraz długość międzywęźli, były to linie L504, L511 i L512
- sześć linii odznaczało się niższymi wartościami badanych cech pędów w porównaniu z liniami kontrolnymi
- najmniejszą liczbę i długość pędów bocznych oraz łączną długość pędów obserwowano dla roślin linii L511 oraz L506
- dwie linie L506 i L507 wykazywały samokończący typ wzrostu
- liście linii L511 posiadały najkrótsze ogonki liściowe i zdecydowanie różniły się od pozostałych linii pod względem budowy liści
- Linia L508 charakteryzowała się wysokim nasileniem żeńskości podobnie jak linia kontrolna L501
- cztery linie L505, L506, L507 i L512 posiadały ciemne kolce na owocach, pozostałe linie posiadały białe kolce podobnie jak linia kontrolna L501



Krzyżowania linii ogórka o zmienionym typie wzrostu z liniami kontrolnymi na potrzeby analizy genetycznej i mapowania

Materiały i metody:

- 10 linii ogórka o różnym nasileniu krzaczałości L502-L512 – linie ojcowskie
- 2 linie kontrolne o normalnym typie wzrostu L500 oraz L501 – linie mateczne
- uprawa roślin w szklarni
- krzyżowanie w cyklu wiosennym – $P_1 \times P_2$ i uzyskanie nasion F_1
- krzyżowanie w cyklu jesiennym – $F_1 \otimes$, $F_1 \times P_1$, $F_1 \times P_2$
- uzyskanie nasion F_2 i BC

Wyniki:

- w wyniku ręcznego krzyżowania w cyklu wiosennym uzyskano nasienniki i nasiona F_1 dla wszystkich 20 kombinacji krzyżówkowych
- w zależności od kombinacji uzyskano różną liczbę nasion od 51 nasion dla kombinacji L500 $\times$ L506 do 605 nasion F_1 dla kombinacji L501 $\times$ L507
- wytypowano 12 kombinacji do dalszego krzyżowania w cyklu jesiennym
- dla 12 kombinacji F_1 uzyskano nasion F_2 oraz BC_1 i BC_2
- liczba uzyskanych nasion była zróżnicowana i zawierała się w przedziale od 89 do 2 267 sztuk dla F_2 i od 332 do 2 337 dla pokoleń BC_1 i BC_2
- najmniejszą liczbę nasion uzyskano dla krzyżowań gdzie linią ojcowską była linia L505, której kwiaty produkują mniej pyłku lub jest on mniej żywotny

Zestawienie kombinacji krzyżowań wykonanych dla linii o normalnym typie wzrostu z liniami o zmienionym typie wzrostu

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

Resekwencjonowanie genomów linii o różnym typie wzrostu i identyfikacja polimorfizmów oraz ich weryfikacja

Materiały i metody:

- 10 linii ogórka o różnym nasileniu krzaczastości L502-L512
- Uprawa roślin w szklarni i pobranie tkanek do analizy
- Izolacja DNA z zastosowaniem zestawu dla tkanek trudnych Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Niemcy)
- Resekwencjonowanie metodą Illumina NovaSeq
- Mapowanie odczytów na genomie referencyjnym polskiej linii ogórka B10 v3
- Identyfikacja bioinformatyczna polimorfizmów SNP, INDEL, CNV i SV
- Weryfikacja analizy bioinformatycznej za pomocą PCR i sekwencjonowania amplikonów

Wyniki:

- Dla wszystkich linii wyizolowano DNA o wysokiej jakości, odnotowano niższą efektywność izolacji dla linii L505 i L511 o silnie zredukowanym wzroście
- Dla wszystkich badanych linii uzyskano odczyty sekwencyjne dobrej jakości z pokryciem genomu wynoszącym ponad 30x
- Średnio 99,5% odczytów mapowało się na genomie referencyjnym B10 v3
- Zidentyfikowano od 3 122 do 22 703 polimorfizmów SNP i od 943 do 2 226 InDel dla badanych linii - najmniej dla linii L512, zaś najwięcej dla linii L508
- Zidentyfikowano od 536 do 1 344 SV i od 743 do 1 000 CNV w rejonach kodujących, najwięcej dla linii L508
- Stwierdzono zgodność wyników sekwencjonowania produktów PCR z bioinformatyczną identyfikacją SNP i INDEL podczas gdy dla SV i CV zgodność tę potwierdzono tylko dla pojedynczych amplikonów

Podsumowanie wyników resekwencjonowania genomów linii ogórka o zmienionym typie wzrostu i ich mapowania na genomie referencyjnym B10v3

Linia	Pokrycie genomu	Współczynnik mapowania odczytów (%)
L502	38x	99.6
L504	39x	99.6
L505	40x	99.6
L506	38x	99.6
L507	39x	99.6
L508	40x	99.5
L509	38x	99.6
L510	38x	99.5
L511	39x	99.6
L512	61x	99.6

Ocena typu wzrostu roślin ogórka i analiza genetyczna populacji F₂ i BC oraz ocena fenotypowa rodzin F₃

Materiały i metody:

- Nasiona linii rodzicielskich P₁ i P₂, oraz F₁ i pokoleń wymaganych do analizy genetycznej: F₂, BC₁ (F₁ x P₁) i BC₂ (F₁ x P₂) dla kombinacji krzyżówkowych linii L500 i L501 z liniami L504, L505, L506, L507, L511, L512
- uprawa roślin P₁, P₂, F₁ i F₂ w tunelach foliowych
- ocena typu wzrostu
- wykonanie samozapyleń dla pojedynków F₂ typu dzikiego i uzyskanie nasion F₃
- ocena fenotypowa rodzin F₃ dla pojedynków typu dzikiego wykonana w polu
- analiza statystyczna z wykorzystaniem testu Chi²

Wyniki:

- w oparciu o uzyskane dane fenotypowe dla pokolenia F₂, krzyżowań wstecznych BC₁ i BC₂ oraz P₁, P₂ i F₁ i wykonano analizę genetyczną dla sześciu linii o zmienionym typie wzrostu
- dla 6 badanych linii uzyskano segregację 3:1 w F₂ i 1:1 w BC₂ co oznacza, że za zmieniony typ wzrostu tych linii odpowiadają pojedyncze geny recesywne
- dla populacji F₂ L501 x L511 uzyskano stosunek segregacji inny niż 3:1 co może wynikać z tła genetycznego linii matecznej L501 (linia żeńska Gy14)
- na podstawie analizy genetycznej wytypowano populacje do dalszych badań i zebrano tkanki do izolacji DNA na potrzeby mapowania oraz uzyskano nasiona F₃ dla pojedynków typu dzikiego
- na podstawie oceny fenotypowej rodzin F₃ określono który z pojedynków F₂ typu dzikiego jest homozygotą, a który heterozygotą na potrzeby analiz molekularnych

Doświadczenie w tunelu – populacja F₂



Ocena typu wzrostu rodzin F₃



Podsumowanie wyników analizy genetycznej

Krzyżowanie	Segregacja typu wzrostu F ₂	Wartość Chi ² _{emp}
L500 x L504	3:1	0.06
L500 x L505	3:1	1.47
L500 x L506	3:1	0.75
L500 x L507	3:1	2.19
L500 x L511	3:1	0.60
L500 x L512	3:1	1.77
L501 x L504	3:1	1.54
L501 x L505	3:1	0.45
L501 x L506	3:1	2.20
L501 x L507	3:1	0.20
L501 x L511	inny	6.39*
L501 x L512	3:1	2.66

* odrzucono hipotezę o segregacji 3:1

Genotypowanie przez sekwencjonowanie i analizy bioinformatyczne danych dla trzech populacji mapujących

Materiały i metody:

- Populacje mapujące ogórka $F_{2:3}$ L500 × L504, L500 × L505 i L500 × L511
- izolacja DNA, analiza DArTSeq i sekwencjonowanie prób zbiorczych
- analiza i filtrowanie polimorfizmów SNP i INDEL

Wyniki – genotypowanie DArTseq

- zidentyfikowano 4 518 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 zidentyfikowani 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 $F_{2:3}$

Wyniki - sekwencjonowanie prób zbiorczych

- skonstruowano próby zbiorcze, składające się z DNA homozygot dominujących (Pool WT) i homozygot recesywnych (Pool M), które sekwencjonowano i zidentyfikowano polimorfizmy SNP i INDEL
- najwięcej SNP zidentyfikowano dla prób zbiorczych populacji L500 × L504 ok. 37.5 tys, najmniej dla populacji L500 × L505 - ok. 32.8 tys
- zidentyfikowano zbliżoną liczbę polimorfizmów INDEL dla populacji L500 × L505 i L500 × L511 i nieznacznie więcej dla populacji L500 × L505

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
L500 × L504		
Pool WT	37 365	2 348
Pool M	37 720	2 366
L500 × L505		
Pool WT	32 793	2 173
Pool M	32 864	2 159
L500 × L511		
Pool WT	34 094	2 149
Pool M	33 661	2 074
Średnia	34 750	2 212

Testowanie markerów molekularnych opartych o PCR

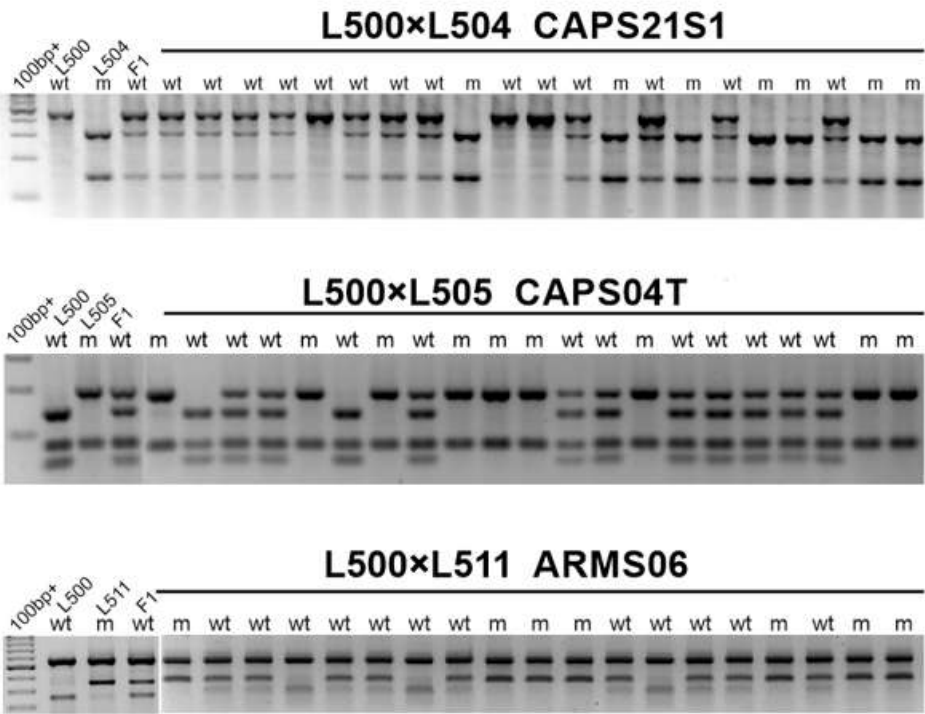
Materiały i metody:

- Populacje mapujące F₂ : L500 × L504, L500 × L505 i L500 × L511
- Izolacja DNA Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Niemcy)
- Projektowanie starterów w oparciu o zidentyfikowane polimorfizmy SNP i INDEL
- Testowanie markerów na pojedynkach F₂, F₁ i liniach rodzicielskich
- Elektroforeza agarozowa i ocena zgodności wyników z fenotypem

Wyniki:

- Zaprojektowano markery oparte o PCR i przetestowano 30 par starterów na liniach rodzicielskich i F₁ w oparciu o wyniki genotypowania przez sekwencjonowanie i resekwencjonowania linii rodzicielskich
- Wytypowano i przetestowano markery na populacjach mapujących F₂
- Najlepsze wyniki uzyskano dla markerów typu CAPS
- Wytypowano markery wykazujące wysoką zgodność wyników fenotypowania z genotypowaniem
- Wyniki genotypowania wykorzystano do konstrukcji map genetycznych

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 F₂ o normalnym typie wzrostu
m – pojedynki F₂ o zmienionym typie wzrostu
100bp+ – marker wielkości DNA

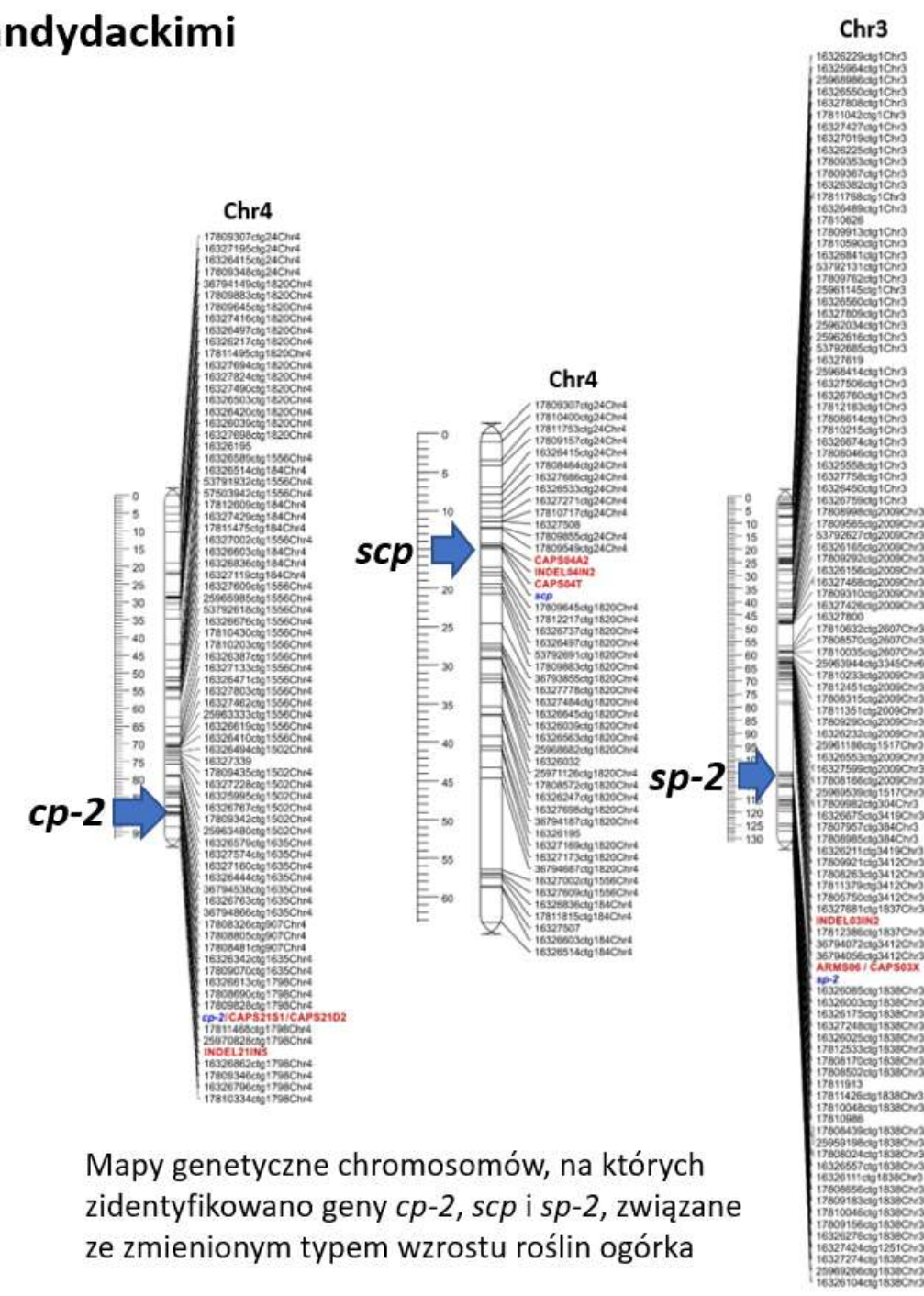
Mapowanie genetyczne i identyfikacja rejonów genomu z genami kandydackimi

Materiały i metody:

- populacje mapujące i powiększone populacje mapujące F₂
- analizy bioinformatyczne danych genotypowania przez sekwencjonowanie
- konstrukcja map z wykorzystaniem programu JoinMap4 (Kayazma, Holandia)
- projektowanie i opracowanie markerów opartych o PCR
- ocena typu wzrostu w powiększonych populacjach F₂
- izolacja DNA i testowanie markerów PCR na pojedynkach o zmienionym typie wzrostu w populacjach mapujących F₂

Wyniki:

- mapowanie populacji L500 × L504 pozwoliło zmapować gen *cp-2* na dolnym ramieniu chromosomu 4 w rejonie genomu o wielkości 2.5 Mb
- mapowanie precyzyjne pozwoliło wskazać gen kandydacki, który jest związany z biosyntezą brassinosteroidów i opracować marker molekularny zakotwiczony w tym genie
- wykorzystując populację L500 × L505 zmapowano gen *scp* na górnym ramieniu chromosomu 4 w rejonie o wielkości 717 kb
- mapowanie precyzyjne z wykorzystaniem powiększonej populacji F₂ L500 × L505 pozwoliło wskazać gen kandydacki *scp*, związany z wczesnym etapem biosyntezy brassinosteroidów
- gen *sp-2* segregujący w populacji L500 × L511 zmapowano na dolnym ramieniu chromosomie 3 w rejonie genomu o wielkości 6.6 Mb



Mapy genetyczne chromosomów, na których zidentyfikowano geny *cp-2*, *scp* i *sp-2*, związane ze zmienionym typem wzrostu roślin ogórka

Zagęszczanie rejonów występowania genów typu wzrostu – mapowanie precyzyjne

Materialy i metody

- Powiększone populacje F_2 : L500 $\times$ L504, L500 $\times$ L505 i L500 $\times$ L511
- Ocena fenotypowa roślin i wskazanie roślin o zmienionym typie wzrostu
- Izolacja DNA
- Testowanie najlepszych markerów dla każdego z genów: po 1 markerze w genach kandydackich oraz po 2 markery flankujące każdy gen kandydacki
- Identyfikacja rekombinantów
- Zawężenie rejonu genomu z genem kandydackim
- Potwierdzenie identyfikacji genów kandydackich

Wyniki

- Uzyskano populacje F_2 liczące od 780 do 910 roślin, które oceniono, a następnie wykorzystano do mapowania precyzyjnego
- Zawężono rejony genomu w których zmapowano geny *cp-2*, *scp* i *sp-2*
- Nie obserwowano zdarzeń rekombinacyjnych w obrębie genów kandydackich, co pokazuje, że wskazano obiecujące geny *scp* i *sp-2*
- Dla genu *cp-2* stwierdzono ograniczoną rekombinację na końcu dolnego ramienia chromosomu 4, w powtórzonej analizie uzyskano podobne wyniki
- Skonstruowano precyzyjne mapy i wskazano geny kandydackie *cp-2*, *scp* i *sp-2*



Powiększona populacja F_2 L500 $\times$ L511 przygotowana do oceny typu wzrostu roślin

Sekwencjonowanie transkryptomów i analiza RNA-seq

Materiały i metody:

- Linie ogórka o zmienionym typie wzrostu: L502, L504, L505. L507, L511, L512
Linia kontrolna: L500
- uprawa roślin w fitotronie i pobranie tkanek do analizy (3 powtórzenia biologiczne)
- Izolacja RNA z zastosowaniem zestawu Plant RNeasy (Qiagen, Niemcy)
- Sekwencjonowanie RNA-Seq metodą Illumina Novaseq (Genomed, Polska)
- Ocena jakości i mapowanie odczytów na genomie referencyjnym 9930 v3
- Identyfikacja genów ulegających zróżnicowanej ekspresji DeSeq2
- Analizy funkcjonalne GO Ontology i KEGG oraz analizy dla indywidualnych genów

Wyniki:

- Uzyskano dobrej jakości RNA wolne od zanieczyszczeń DNA, które wykorzystano do sekwencjonowania transkryptomów metodą RNA-seq
- Uzyskano odczyty sekwencyjne dobrej jakości (Q20>97%), które zmapowano na genomie referencyjnym 9930 v3, średni odsetek zmapowanych odczytów >93,5%
- Potwierdzono statystycznie zgodność wyników RNA-seq dla trzech powtórzeń biologicznych dla każdej z badanych linii i linii kontrolnej
- Zidentyfikowano geny ulegające zmienionej ekspresji w odniesieniu do linii kontrolnej L500. W zależności od linii było to od 483 do 1 293 genów
- Najwięcej genów ulegających zróżnicowanej ekspresji odnotowano dla linii L505, charakteryzującej się silnie krzaczastym wzrostem
- Przypisano kategorie GO Ontology i KEGG genom ulegającym zmienionej ekspresji i wytypowano geny do analizy RT-qPCR

Podsumowanie wyników sekwencjonowania transkryptomów RNA-seq. Odczyty mapowano na genomie referencyjnym 9930v3

Linia	Powtórzenie biologiczne	Wartość Q20	Odsetek unikalnie zmapowanych odczytów
L500	1	97.3	93.80%
	2	97.3	93.80%
	3	97.5	93.90%
L502	1	97.3	93.90%
	2	97.6	93.80%
	3	97.4	93.70%
L504	1	98.2	93.30%
	2	97.8	92.30%
	3	98.2	92.40%
L505	1	97.5	93.70%
	2	97.3	93.70%
	3	97.5	93.70%
L507	1	97.5	94.10%
	2	97.5	94.00%
	3	97.4	93.90%
L511	1	97.5	94.10%
	2	97.4	93.80%
	3	97.4	94.00%
L512	1	97.5	93.90%
	2	97.4	93.70%
	3	97.4	93.80%
Średnia		97.5	93.68%

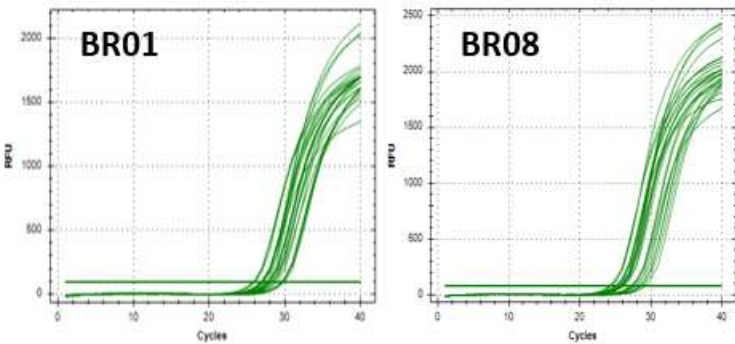
Analiza ekspresji RT-qPCR dla genów kandydackich i innych genów związanych z ich funkcjami biologicznymi

Materiały i metody:

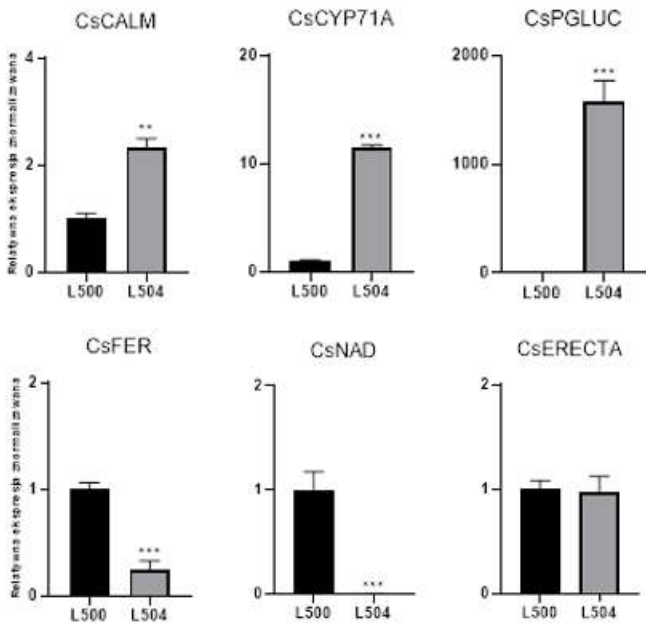
- Linie ogórka L504, L505 i L511 i linia kontrolna L500
- Izolacja RNA za pomocą zestawu Plant RNeasy (Qiagen, Niemcy)
- Synteza cDNA z wykorzystaniem zestawu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Niemcy)
- Projektowanie i synteza starterów (Genomed, Warszawa)
- Analiza ekspresji RT-qPCR, referencje *CsCACS*, *CsTIP41* i *CsUBlep*
- Analiza statystyczna wyników z wykorzystaniem metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Wyniki:

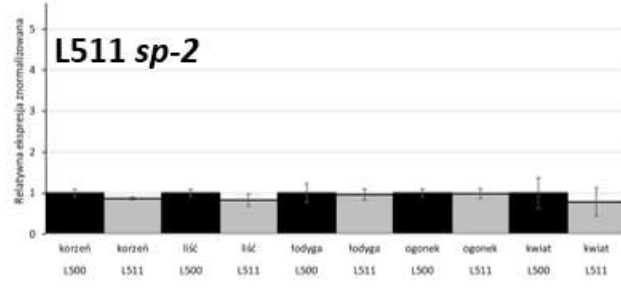
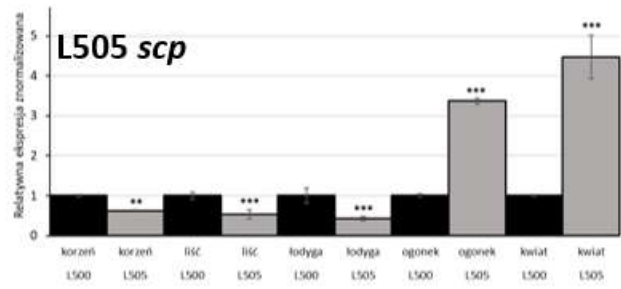
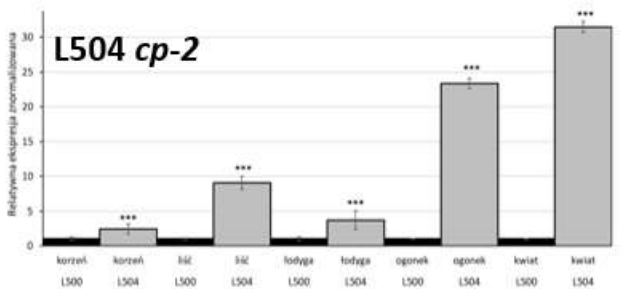
- Opisano profil ekspresji genu kandydackiego odpowiadających za zmieniony typ wzrostu linii L504 z genem *cp-2* i stwierdzono zwiększoną transkrypcję tego genu we wszystkich badanych organach
- U linii L505 z genem *scp* stwierdzono zwiększoną transkrypcję genu kandydackiego w ogonkach liści i kwiatach oraz zmniejszoną w korzeniach, liściach i w łodydze
- Dla linii L511 z genem *sp2* nie stwierdzono różnic w poziomie transkrypcji genu kandydackiego w porównaniu z linią kontrolną
- Analiza ekspresji genów związanych z biosyntezą brassinosteroidów potwierdziła zmienioną ekspresję dwóch genów dla linii L504, dwóch genów dla linii L505 i czterech genów dla L511
- Nie stwierdzono zmienionej ekspresji genu *CsERECTA* w linii L504



Przykładowe krzywe amplifikacji RT-qPCR uzyskane dla dwóch genów BR01 i BR08 związanych z biosyntezą brassinosteroidów uzyskane dla L511



Względny poziom ekspresji wybranych genów ulegających zróżnicowanej ekspresji u linii L504



Poziom transkrypcji genów kandydackich w korzeniach, liściach łodydze, ogonkach liści i kwiatach linii L504, L505 i L511 o zmienionym typie wzrostu (szare słupki) w odniesieniu do linii kontrolnej L500 o normalnym typie wzrostu (czarne słupki)

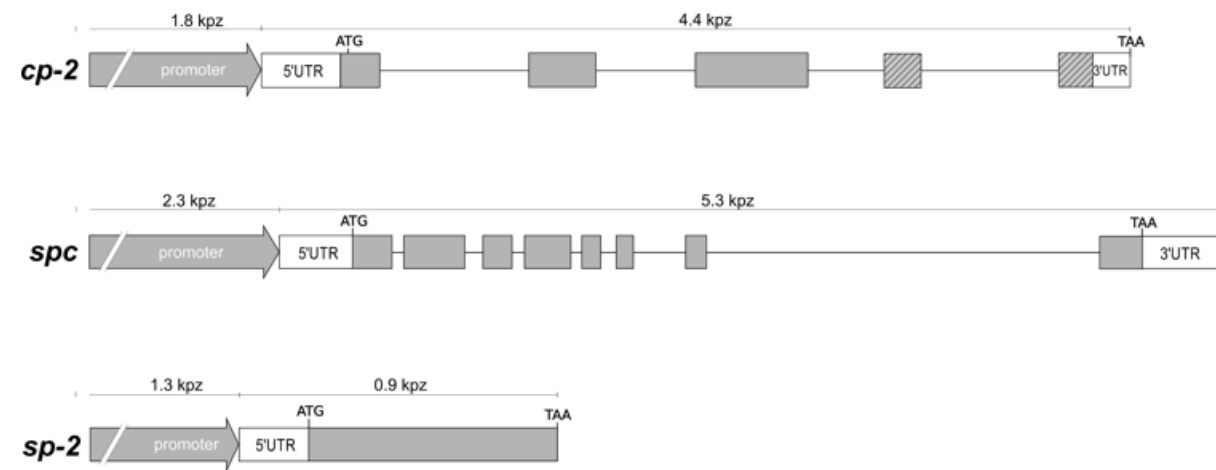
Analiza strukturalna i analiza zmienności allelicznej genów kandydackich

Materiały i metody:

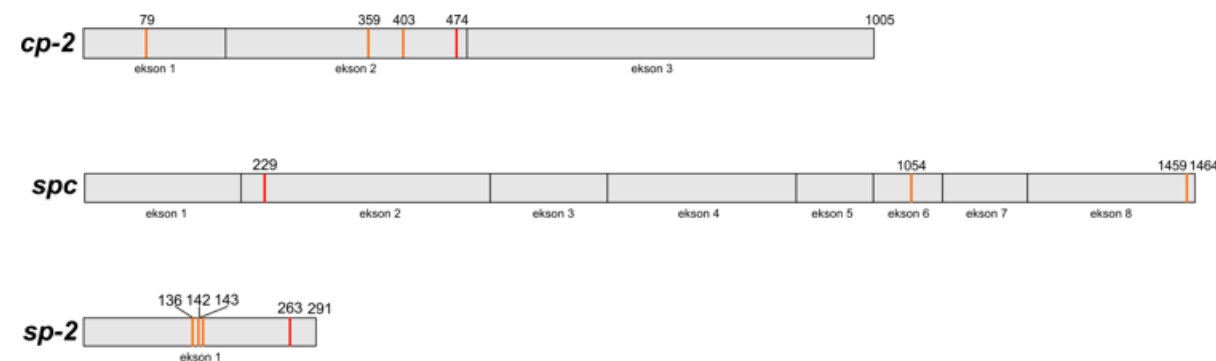
- Przyrównanie sekwencji genomowych i białkowych genów kandydackich do baz danych CuGenDBv2 i CucumberDB za pomocą algorytmu BLAST
- Wykonanie przyrównań CLUSTAL i konstrukcja drzew filogenetycznych
- Amplifikacja PCR genów kandydackich na poziomie genomu i sekwencjonowanie amplikonów metodą Sangera
- Analiza 5'-3'-RACE, klonowanie cDNA i sekwencjonowanie metodą Sangera
- Składanie odczytów sekwencyjnych gene-walking Sequencer 4.5

Wyniki:

- Przyrównania BLAST i CLUSTAL oraz analizy filogenetyczne ujawniły podobieństwo genu *cp-2* do białka z domeną kinazy, *spc* do białka z domeną P450 i *sp-2* do białka z domeną reduktazy steroidowej
- Analiza struktury genu *cp-2* pokazała, że gen ten posiada 5 eksonów, ale potwierdzono, że detektowany transkrypt obejmuje tylko 3 eksony
- Gen *scp* składa się z 8 eksonów, a transkrypt obejmuje wszystkie eksony
- Stwierdzono, że gen kandydacki *sp-2* nie posiada intronów i jest krótki, o długości około 0.9 kb i ulega w całości transkrypcji
- Analiza zmienności allelicznej potwierdziła, że SNP zidentyfikowane w liniach L504, L505 i L511 są unikalne
- Zidentyfikowano od 2 do 3 naturalnie występujących SNP w rejonach kodujących genów kandydackich, głównie u dzikiego ogórka *C.sativus* var. *hardwickii* i akcesji o pochodzeniu indyjskim i chińskim



Schematy przedstawiające struktury genów kandydackich potwierdzone doświadczalnie



Zmienność alleliczna sekwencji kodujących genów kandydackich. Na pomarańczowo zaznaczono naturalnie występujące SNP, zaś na czerwono SNP zidentyfikowane w badanych liniach o zmienionym typie wzrostu L504, L505 i L511

Analiza genetyczna i określenie współdziałania genów *sp-2* i *scp*

Materiały i metody:

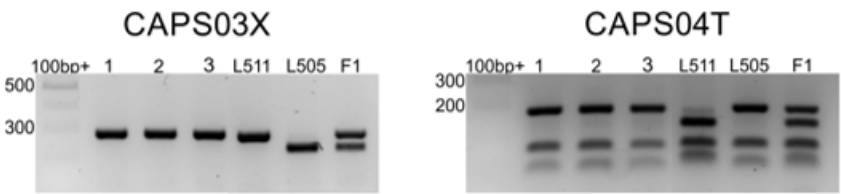
- populacja L511 (*sp-2*) × L505 (*scp*): F₂, B₁C₁, B₁C₂, F₁, P₁ i P₂
- ocena fenotypowa typu wzrostu roślin i przypisanie do klasy fenotypowej WT, *sp2*, *scp* i *sp2/scp*
- analiza PCR – weryfikacja molekularna genów *sp-2* i *scp*
- analiza statystyczna z wykorzystaniem testu Chi²

Wyniki:

- Ocena typu wzrostu roślin pozwoliła na wytypowanie czterech klas fenotypowych reprezentujących różne typy wzrostu
- Zidentyfikowano nowy krzaczasty fenotyp - połączenie cech linii z genami *sp-2* (krzaczasty wzrost i zredukowane ogonki liściowe) i *scp* (rozetowy pokrój)
- Fenotyp *sp-2/scp* zweryfikowano metodą PCR z wykorzystaniem markerów molekularnych
- Segregacja 9:3:3:1 w obrębie populacji F₂ oraz 1:1 w obrębie populacji BC potwierdziła, że geny *sp-2* i *scp* dziedziczą się niezależnie
- Nowy krzaczasty fenotyp świadczy o sumowaniu się efektów genów *sp-2* i *scp* związanych z biosyntezą brassinosteroidów

Podsumowanie wyników analizy genetycznej dla krzyżowania L511× L505

Populacja	Segregacja typu wzrotu	Stosunek segregacji	Chi ² dośw.	Chi ² teor.
F ₂ L511 × L505	WT: <i>sp2</i> : <i>scp</i> : <i>sp2/scp</i> 108 : 35 : 24 : 4	9:3:3:1	7,24	7,81
BC ₁ P ₁ (L511 × L505) × L511	WT: <i>sp2</i> 25 : 33	1:1	1,1	3,84
BC ₁ P ₂ (L511 × L505) × L505	WT: <i>scp</i> 24 : 21	1:1	0,21	3,84



Wyniki analizy PCR dla roślin o fenotypie *sp-2/scp* oraz linii rodzicielskich i F₁ potwierdzające, że rośliny te posiadają dwa geny krzaczastości *sp-2* i *scp*. W analizie wykorzystano markery specyficzne dla genów *sp-2* (CAPS03X) oraz *scp* (CAPS04T)

Testowanie markerów molekularnych dla typu wzrostu roślin ogórka

Materiały i metody:

- Panel 60 odmian i linii ogórka wykorzystywanych w hodowli
Izolacja DNA za pomocą zestawu Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Niemcy)
- Trzy markery CAPS oparte o PCR i trawienie produktu amplifikacji enzymem restrykcyjnym: CAPS21D dla *cp-2*, CAPS04_T dla *scp*) i CAPS03_X dla *sp-2*
- Elektroforeza agarozowa i analiza wyników genotypowania

Wyniki:

- Na podstawie oceny opracowanych markerów molekularnych, wskazano trzy najlepsze markery CAPS zakotwiczone w sekwencjach kodujących genów kandydackich warunkujących zmieniony typ wzrostu roślin
- Dla markerów CAPS04_T i CAPS03_X opracowanych dla *scp* i *sp-2* warunkujących karłowaty wzrost stwierdzono pełną zgodność fenotypu z genotypem
- Dla najlepszego markera molekularnego CAPS21D, opracowanego dla genu *cp-2* stwierdzono zgodność na poziomie 80%
- Opracowane markery mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w hodowli ogórka

Podsumowanie wyników testowania najlepszych markerów molekularnych na panelu 60 odmian i linii ogórka wykorzystywanych w hodowli

Gen	Marker	Liczba linii i odmian ogórka		Zgodność %
		fenotyp zgodny z markerem	fenotyp niezgodny z markerem	
<i>cp-2</i>	CAPS21D	48	12	80
<i>scp</i>	CAPS04_T	60	0	100
<i>sp-2</i>	CAPS03_X	60	0	100

Wnioski i podsumowanie

1. Zmieniony typ wzrostu badanych linii ogórka jest warunkowany przez pojedyncze recesywne geny, co potwierdzono wykonując analizy fenotypowe i genetyczne
2. Wyprowadzono i oceniono populacje mapujące $F_{2:3}$ oraz rozmnożono linie rodzicielskie, zapewniając odpowiedni materiał do badań molekularnych
3. Wypracowano zasady fenotypowania typu wzrostu w populacjach F_2 i rodzinach F_3 , dostosowane do poszczególnych linii o zmienionej architekturze roślin
4. Resekwencjonowanie genomów linii o zmienionym typie wzrostu ujawniło polimorfizmy, linia L508 wykazała największe zróżnicowanie względem genomu referencyjnego B10v3. Dane resekwencjonowania pozwoliły na opracowywanie markerów molekularnych opartych o PCR
5. Genotypowanie przez sekwencjonowanie pozwoliło na zmapowanie genów typu wzrostu *cp-2*, *scp*, *sp-2*. Zagęszczenie map pozwoliło na zawężenie rejonów genomu odpowiedzialnego za zmieniony typ wzrostu linii L504, L505 i L511, a następnie wskazanie genów kandydackich
6. Analizy RNA-seq i RT-qPCR wykazały zróżnicowaną ekspresję genów związanych z typem wzrostu badanych linii, w tym genów kandydackich. U linii L505 i L511 zidentyfikowano zmienioną ekspresję genów związanych z biosyntezą brassinosteroidów
7. Scharakteryzowano geny kandydackie na poziomie molekularnym. Zidentyfikowano ortologi białek, wykonano ich przyrównania i skonstruowano drzewa filogenetyczne. Scharakteryzowano strukturę genów kandydackich i wskazano wersje transkryptów, które ulegają ekspresji
8. Analiza zmienności allelicznej wykazała, że SNP zidentyfikowane w liniach L504, L505 i L511 są unikalne i nie występują naturalnie w innych akcesjach ogórka. Stwierdzono występowanie pojedynczych SNP w akcesjach pochodzenia indyjskiego i chińskiego oraz dzikiej formy ogórka
9. Analiza genetyczna populacji uzyskanej ze skrzyżowania linii L505 z L511 potwierdziła że geny *scp* i *sp2* dziedziczą się niezależnie, a ich efekty fenotypowe sumują się
10. Opracowano i przetestowano szereg markerów molekularnych dla genów *cp-2*, *scp* i *sp-2* przydatnych do mapowania i genotypowania co pozwoliło wskazać trzy najlepsze, zakotwiczone w genach kandydackich, które potencjalnie mogą być wykorzystane w hodowli
11. Zintegrowane analizy fenotypowe, genomowe i transkryptomiczne umożliwiły wskazanie i kompleksową charakterystykę genów kandydackich odpowiedzialnych za zmieniony typ wzrostu linii L504, L505 i L511 oraz opracowanie markerów molekularnych dla tych genów

Cele zadania i mierniki zaplanowane na lata 2021-2025 zostały osiągnięte w całości