

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

Okres realizacji zadania: 2024 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

Główni wykonawcy:

dr inż. Renata Słomnicka, dr inż. Magdalena Cieplak, dr inż. Karolina Kaźmińska, dr inż. Aleksandra Korzeniewska

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 2024 roku

1. Ocena fenotypowa powiększonych populacji mapujących ogórka i krzyżowanie linii
2. Zagęszczenie mapy genetycznej w rejonach zmapowanych genów typu wzrostu roślin
3. Charakterystyka rejonów genomu z genami kandydackimi typu wzrostu roślin ogórka i transkryptomu linii L504

Cele zadania zaplanowane na 2024 rok zostały w pełni osiągnięte

Materiały i metody

Materiał roślinny

- **Trzy linie ogórka** o zmienionym typie wzrostu L504, L505 i L511 i linia kontrolna o normalnym typie wzrostu L500 (B10DH)

Metody

- **Doświadczenie w szklarni:** ocena fenotypowa typu wzrostu roślin (1 cecha) dla poszerzonych segregujących populacji F_2 (3 populacje, >480 pojedynków F_2), krzyżowanie linii L505 i L511 (2 linie, 1 kombinacja), uzyskanie nasion F_1
- **Izolacja DNA z roślin ogórka:** zestaw NucleoSpin Plant II lub metoda CTAB, ocena jakości z wykorzystaniem elektroforezy (3 populacje, 540 pojedynków)
- **Genotypowanie i identyfikacja rekombinantów:** pojedynki F_2 o zmienionym typie wzrostu (540 pojedynków) z wykorzystaniem markerów molekularnych, (9 markerów), opracowanie ulepszonych map rejonów występowania genów *cp-2*, *scp* i *sp-2* (3 mapy)
- **Analizy bioinformatyczne:** poszukiwanie sekwencji aminokwasowych (BLAST), przyrównanie sekwencji (CLUSTAL), konstrukcja drzew podobieństwa genetycznego (MEGA) (3 analizy)
- **Izolacja RNA z roślin ogórka:** zestaw Plant RNeasy, ocena jakości preparatów z wykorzystaniem elektroforezy i spektrofotometru (4 linie w 3 powtórzeniach biologicznych)
- **Organospecyficzna analiza RT-qPCR:** dla genów kandydackich w korzeniach, liściach, łodygach, ogonkach i kwiatach dla trzech linii w odniesieniu do kontroli (4 linie w 3 powtórzeniach biologicznych)
- **RNAseq dla L504 w odniesieniu do linii kontrolnej L500:** trzy powtórzenia biologiczne, technologia Illumina (6 transkryptomów)

Mierniki zadania podano w nawiasach

Wyniki: ocena fenotypowa segregujących populacji ogórka

- Ocenę typu wzrostu roślin dla powiększonych populacji uzyskanych w wyniku krzyżowania linii L504, L505 i L511 o zmienionym typie wzrostu z linią L500 o niezmienionym typie wzrostu wykonano **w szklarni**
- Ocena typu wzrostu została wykonana dla roślin w fazie 2-5 liści
- Dla powiększonych populacji F_2 oceniono **od 780 do 910 roślin** w zależności od dostępności i kiełkowania nasion
- Dla wszystkich badanych linii potwierdzono segregację 3:1 w F_2 , co potwierdza, że za zmieniony typ wzrostu tych linii odpowiadają **pojedyncze geny recesywne**

Wyniki: krzyżowanie linii L505 i L511 oraz uzyskanie nasion

- Wykonano krzyżowanie linii L511 i L505, posiadających geny *sp-2* i *scp*
- Uzyskano nasiona do dalszych badań - **26 nasienników / 3 800 nasion**



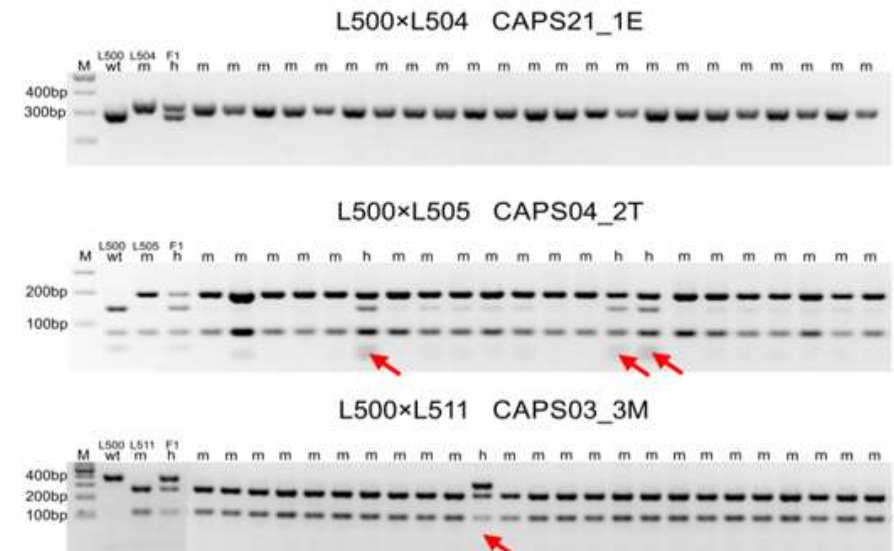
Doświadczenie w szklarni – powiększone populacje F_2 L500 × L511

Wyniki: genotypowanie za pomocą markerów molekularnych

- Pobrano młode liście ze 180 roślin F₂ o zmienionym typie wzrostu dla każdej z trzech powiększonych populacji L500×L504, L500×L505 i L500×L511 i **wyizolowano DNA** (540 izolacji)
- Testowano **po trzy markery** dla każdej populacji:
 - po 1 markerze w genach kandydackich dla *cp-2*, *scp* i *sp-2*
 - po 2 markery flankujące każdy gen kandydacki
- Nie obserwowano zdarzeń rekombinacyjnych w obrębie genów kandydackich, co potwierdza, że **wskazano obiecujące geny kandydackie**
- Dla populacji L500×L504 nie udało się zdetektować zdarzeń rekombinacyjnych w rejonach flankujących gen kandydacki (52 kpz przed i 53 kpz za genem)
- Dla populacji L500×L505 i L500×L511 zidentyfikowano rekombinanty w rejonach flankujących geny kandydackie:
 - L500×L505 – 90 kpz przed i 39 kpz za genem
 - L500×L511 – 174 kpz przed i 458 kpz za genem

Podsumowanie wyników genotypowania pojedynków F₂ o zmienionym typie wzrostu dla trzech populacji

Populacja	Marker	Liczba <u>rekombinantów</u>
L500 × L504	INDEL 21IN7	0
	CAPS21_2D	0
	CAPS21_1E	0
L500 × L505	CAPS04_2T	13
	CAPS04_T	0
	CAPS04_3N	6
L500 × L511	CAPS03_4M	5
	ARMS06	0
	CAPS03_3M	9

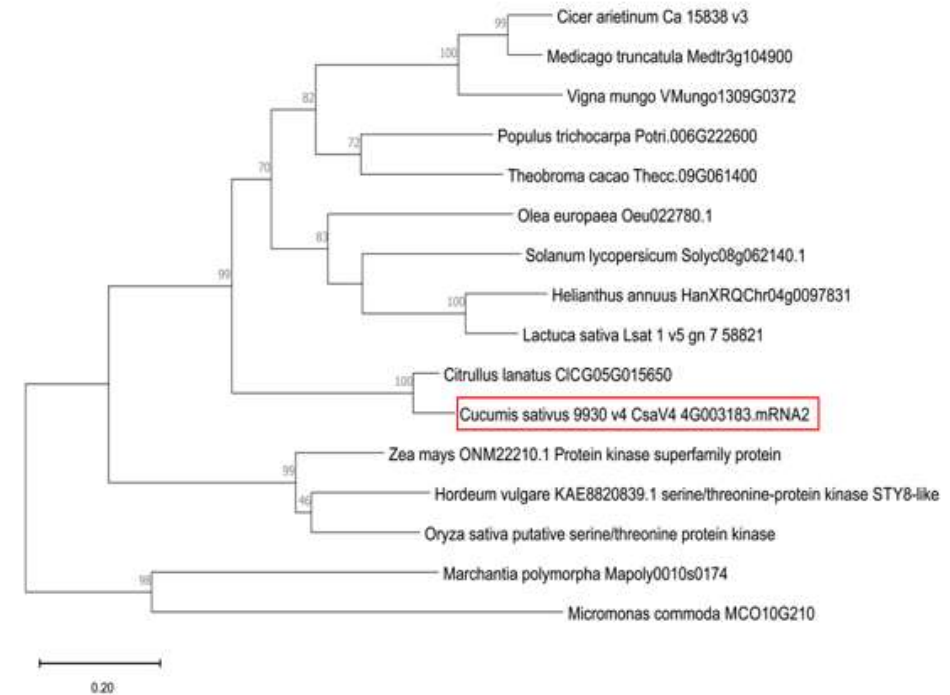


Przykładowe profile amplifikacji/trawienia otrzymane w wyniku genotypowania roślin o zmienionym typie wzrostu reprezentujących populacje L500×L504, L500×L505 i L500×L511

Wyniki: analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowych

- Na podstawie przyrównań skonstruowano drzewa podobieństwa sekwencji aminokwasowych w programie MEGA11 (maximum likelihood, bootstrap n=1000)
- Analiza sekwencji aminokwasowej **genu kandydackiego dla *cp-2*** i jego ortologów ujawniła podobieństwo białka ogórkowego do białek z **domeną kinazy serynowo-treoninowej**, domenę kinazy zidentyfikowano w końcu C białka
- Analiza sekwencji aminokwasowej **genu kandydackiego dla *scp*** i jego ortologów pokazała, że kodowane przez ten gen białko posiada **domenę cytochromu P450** i wykazuje podobieństwo do **białek DWF** związanych z **biosyntezą brassinosteroidów**
- Analiza sekwencji aminokwasowej **genu kandydackiego *sp-2*** i jego ortologów pokazała, że białko to wykazuje podobieństwo do **dehydrogenaz steroidowych** związanych z **biosyntezą brassinosteroidów**

Drzewo podobieństwa genetycznego wygenerowane dla sekwencji aminokwasowej genu kandydackiego *cp-2* i jego ortologów



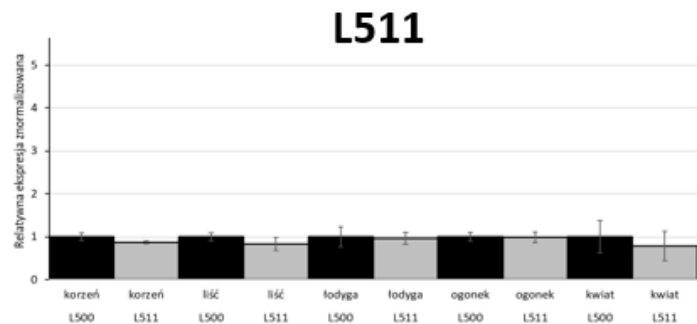
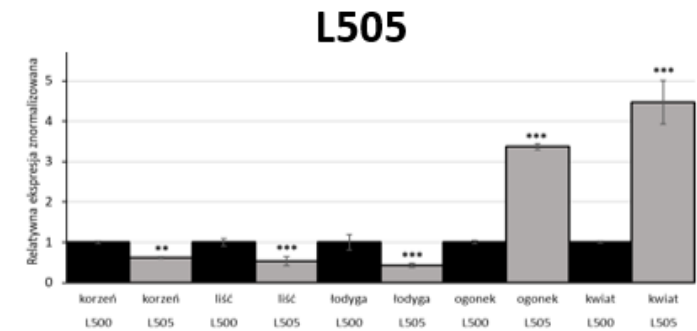
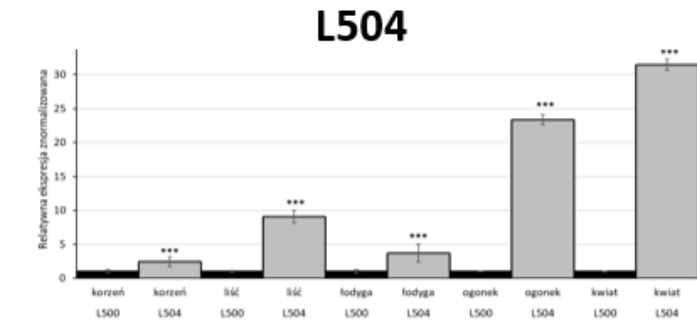
Wyniki: izolacja RNA

- Analizę wykonano dla 5 tkanek – **korzenie, liście, łodygi, ogonki liściowe i kwiaty** pobrane z roślin 3 linii o zmienionym typie wzrostu L504, L505 i L511 oraz linii kontrolnej L500 (B10DH) w 3 powtórzeniach biologicznych (6 roślin w powtórzeniu)
- Uzyskano dobrej jakości RNA wolne od zanieczyszczeń DNA, które wykorzystano do syntezy cDNA i analizy RT-qPCR

Wyniki: analiza RT-qPCR

- Opisano profil ekspresji genów kandydackich odpowiadających za zmieniony typ wzrostu linii L504, L505 i L511 w odniesieniu do linii kontrolnej L500
- Linia L504: zwiększona transkrypcja genu kandydackiego we wszystkich badanych organach w porównaniu z kontrolą
- Linia L505: zwiększona transkrypcja genu kandydackiego w ogonkach liści i kwiatach oraz zmniejszona w korzeniach, liściach i łodydze
- Linia L511: brak różnic w poziomie transkrypcji genu kandydackiego w porównaniu z linią kontrolną o niezmienionym typie wzrostu

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



Wyniki: izolacja RNA i analiza RNA-seq

- Badania wykonano dla linii L504 o zmienionym typie wzrostu i linii kontrolnej L500 w trzech powtórzeniach biologicznych
- Uzyskano dobrej jakości RNA wolne od zanieczyszczeń DNA, które wykorzystano do sekwencjonowania transkryptomów RNA-seq
- Uzyskano odczyty sekwencyjne dobrej jakości (Q20>97%), które zmapowano na genomie referencyjnym 9930 v3
- Średni odsetek zmapowanych odczytów wyniósł 95,4% co świadczy o wysokiej jakości odczytów sekwencyjnych

Wyniki: wstępna analiza bioinformatyczna danych RNA-seq

- Potwierdzono zgodność wyników RNA-seq dla trzech powtórzeń biologicznych dla każdej z badanych linii
- Wstępnie zidentyfikowano 641 genów ulegających zmienionej ekspresji u linii L504 w odniesieniu do linii kontrolnej L500, w tym:
 - 267 genów ulegających podwyższonej ekspresji
 - 374 genów ulegających zmniejszonej ekspresji

Podsumowanie wyników sekwencjonowania transkryptomów RNA-seq dla linii o zmienionym typie wzrostu L504 i linii kontrolnej L500
Odczyty mapowano na genomie referencyjnym 9930 v3 (Li et al. 2019)

Nazwa próby	Całkowita długość czystych odczytów (Gpz)	Q20	Odsetek zmapowanych odczytów	Odsetek unikalnie zmapowanych odczytów
L500.1	6,42	98,4	95,5%	92,8%
L500.2	6,46	98,1	95,3%	92,8%
L500.3	5,87	98,0	95,9%	93,4%
L504.1	6,08	98,2	95,7%	93,3%
L504.2	5,99	97,8	95,3%	92,3%
L504.3	6,14	98,2	94,9%	92,4%
Średnia	6,16	98,1	95,4%	92,8%

Wnioski

Ocena fenotypowa powiększonych populacji mapujących ogórka i krzyżowanie linii

1. Ocena typu wzrostu wykonana dla powiększonych populacji mapujących F_2 potwierdziła, że zmieniony typ wzrostu roślin linii L504, L505 i L511 jest warunkowany przez pojedyncze geny recesywne
2. Wykonano udane krzyżowanie linii L511 z linią L505, posiadających geny *sp-2* i *scp*, i uzyskano nasiona F_1 do dalszych badań

Zagęszczenie mapy genetycznej w rejonach zmapowanych genów typu wzrostu roślin

1. Genotypowanie pojedynków F_2 o zmienionym typie wzrostu dla trzech populacji nie ujawniło zdarzeń rekombinacyjnych w obrębie genów kandydackich, co pokazuje, że wskazano obiecujące geny kandydackie
2. Skonstruowano ulepszone mapy i zawężono rejony genomu, w których znajdują się geny *scp* i *sp-2* odpowiedzialne za zmieniony typ wzrostu linii L505 i L511
3. W przypadku linii L504 ze względu na brak zdarzeń rekombinacyjnych, nie udało się zawęzić rejonu na chromosomie 4, w którym znajduje się gen *cp-2*, odpowiedzialny za zmieniony typ wzrostu tej linii

Charakterystyka rejonów genomu z genami kandydackimi typu wzrostu roślin ogórka i transkryptomu linii L504

1. Analizy bioinformatyczne sekwencji aminokwasowych pozwoliły wstępnie wskazać funkcje białek kodowanych przez geny kandydackie zidentyfikowane dla linii L504, L505 i L511
2. Analiza RT-qPCR pozwoliła scharakteryzować profile transkrypcji genów kandydackich dla linii o zmienionym typie wzrostu L504, L505 i L511 w odniesieniu do linii kontrolnej L500
3. Dzięki uzyskaniu dobrej jakości danych RNA-seq możliwe było wstępne zidentyfikowanie genów ulegających zróżnicowanej ekspresji u linii L504 o zmienionym typie wzrostu w odniesieniu do linii kontrolnej L500

Cele zadania i zaplanowane mierniki zostały osiągnięte w całości

Prezentacja wyników badań

Postery konferencyjne

Słomnicka R, Kaźmińska K, Mużacz S, Grad M, [Zembrzucki K](#), Stokowiec D, Bartoszewski G (2024)
BSA-seq approach identifies genomic regions associated with altered plant growth in cucumber (*Cucumis sativus* L.).
EUROBIOTECH 9th Central European Congress of Life Sciences, Kraków 27-28 [czerwca](#), 2024
Book of abstracts, str 38-39

Słomnicka R, Kaźmińska K, Cieplak M, Stokowiec D, Korzeniewska A, Bartoszewski G (2024)
Genetic mapping reveals candidate genes controlling plant architecture in cucumber.
K [XIIIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae](#), [Vico Equense \(NA\)](#) [Włochy](#), 3-6 [listopada](#), 2024
Abstract book, P.2.1

Publikacja

Biernacik B, Słomnicka R, Kaźmińska K, Mużacz S, Bartoszewski G (2024) A single nucleotide substitution introducing premature stop codon within CsTFL1 explains the *determinate-2* phenotype in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Sci Rep* 14:25368