

RENATA SŁOMNICKA
ADRIANNA PIETLUCH
JUSTYNA ŁĘCZYCKA
ANNA DORACZYŃSKA
ALEKSANDRA KORZENIEWSKA
HELENA OLCZAK-WOLTMAN
KATARZYNA NIEMIROWICZ-SZCZYTT
GRZEGORZ BARTOSZEWSKI

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

Identyfikacja markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej i mapowania genów odporności na kanciastą plamistość liści ogórka (*Cucumis sativus* L.)*

Identification of SSR markers useful for construction of genetic map and mapping of angular leaf spot resistance genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

W pracy podjęto próbę identyfikacji markerów SSR użytecznych do konstrukcji mapy genetycznej ogórka dla populacji mapującej 110 rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL). Populację uzyskano z krzyżowania amerykańskiej linii Gy14 wykazującej tolerancję na bakteryjną kanciastą plamistość z polską linią B10 wrażliwą na tę chorobę. Analiza bioinformatyczna zróżnicowania sekwencji *loci* mikrosatelitarnych pozwoliła wskazać markery SSR potencjalnie przydatne do mapowania w tej populacji. Wytypowano 222 markery SSR, spośród których 160 przetestowano na liniach rodzicielskich i wybranych RIL. Potwierdzono polimorfizm dla 103 markerów SSR (64,4%), zaś dla 52 z nich wykazano przydatność do konstrukcji mapy genetycznej populacji Gy14 × B10 i mapowania genów odporności na kanciastą plamistość liści ogórka. Wstępnie wskazano, że marker SSR00398 zlokalizowany na chromosomie 5 może być sprzężony z genem odporności na tę chorobę.

Słowa kluczowe: *Cucumis sativus*, kanciasta plamistość ogórka, markery SSR, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

The aim of this study was identification of SSR markers useful for construction of genetic map of cucumber population that consists of 110 recombinant inbred lines (RILs). RILs population

* Praca była dofinansowana przez MRiRW

segregating for angular leaf spot (ALS) resistance was developed by crossing two inbred lines, an American line Gy14 showing tolerance for angular leaf spot and a Polish line B10, susceptible to this disease. A set of SSR markers was preliminary examined for polymorphism using bioinformatic analysis. There were 222 selected SSR markers and 160 of them were further tested on parental lines and chosen RILs. The polymorphism was confirmed for 103 (64.4%) SSR markers. Fifty two SSR markers were found to be useful for construction of genetic map of cucumber population Gy14 × B10 and further mapping of angular leaf spot resistance genes. Preliminary results suggest that SSR00398 located on chromosome 5 may be linked to angular leaf spot resistance gene.

Key words: *Cucumis sativus*, angular leaf spot (ALS), SSR markers, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

WSTĘP

Ogórek (*Cucumis sativus* L.) jest obok melona najlepiej poznanym gatunkiem należącym do rodziny *Cucurbitaceae*, wykorzystywanym jako roślina modelowa w badaniach determinacji płci (Malepszy, Niemirowicz-Szczytt, 1991; Tanurdzic, Banks, 2004), biologii naczyniowej (Lough, Lucas, 2006) oraz reakcji na stresy biotyczne i abiotyczne (Hammerschmidt 1999a,b). Ogórek jest jednocześnie ważnym gospodarczo i ekonomicznie warzywem, uprawianym w ponad 80 krajach na świecie (Adhikari i in., 2012), a jego roczną produkcję szacuje się na ponad 66 milionów ton, w tym około 500 tysięcy ton produkuje się w Polsce (<http://faostats.fao.org>). Duże znaczenie ogórka w Polsce powoduje, że prowadzone są krajowe programy hodowlane, dla których istotne jest poszukiwanie nowych źródeł odporności na choroby i stresy abiotyczne, a także identyfikacja markerów molekularnych przydatnych do selekcji (Olczak-Woltman i in., 2007). W ostatnich latach poznana została sekwencja genomu ogórka (Huang i in., 2009 — linia 9930, Wóycicki i in., 2011 — linia B10, Phytozome v8.0 — linia Gy14), opublikowano kilka zageszczonych map genetycznych (Ren i in., 2009; Miao i in., 2011; Yang i in., 2012), jak również scharakteryzowano geny odporności R, kodujące białka NBS-LRR (Wan i in., 2013; Yang i in., 2013). Pomimo zsekwencjonowania genomu ogórka i licznych prac genomicznych wiedza na temat tego gatunku w kontekście reakcji odpornościowej na bakterię *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* będącą sprawcą kanciastej plamistości liści ogórka jest niepełna. Jak dotychczas opracowano około 30 map genetycznych ogórka, głównie dla populacji mapujących wyprowadzonych z linii amerykańskich, indyjskich czy też chińskich (Ren i in., 2009; Miao i in., 2011; Yang i in., 2012). Nie skonstruowano jednak zaawansowanej mapy genetycznej dla polskich linii lub odmian, przystosowanych do uprawy w klimacie śródkiuropejskim. Opracowane mapy posłużyły do zmapowania genów warunkujących ważne cechy użytkowe (Miao i in., 2011), jednak nie zidentyfikowano jak dotychczas genów warunkujących odporność na kanciastą plamistość liści ogórka. Próby zidentyfikowania markerów molekularnych sprzężonych z tymi genami umożliwiły wskazanie markera RAPD OP-AO07, jednakże marker ten był w odległości 13cM od *locus* związanego z genem odporności (Olczak-Woltman i in., 2009). Celem pracy była identyfikacja markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej ogórka oraz mapowania genów odporności na tę chorobę z wykorzystaniem populacji RIL Gy14 × B10. Konstrukcja takiej mapy przyczyni się do

identyfikacji markerów molekularnych genów odporności na kanciastą plamistość liści ogórka, które pozwoliłyby na prowadzenie selekcji pożądanych roślin już we wczesnych etapach hodowli.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano populację mapującą RIL-F₅, w skład której wchodziło 110 rekombinowanych linii wsobnych. Nasiona linii Gy14 i F₁ z krzyżowania Gy14 × B10 uzyskano od Prof. M. J. Havey (University of Wisconsin, Madison, WI, USA). Wypróbowanie linii z pojedynków F₂ wykonano w tunelach na Polu Doświadczalnym Katedry Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin 'Wolica'. Linie rodzicielskie charakteryzowały się zróżnicowaną reakcją odpornościową na bakteryjną kanciastą plamistość — linia Gy14 wykazywała tolerancję na kanciastą plamistość, zaś linia B10 była wrażliwa na tę chorobę (Olczak-Woltman i in., 2008). Testy patogeniczności przeprowadzono na dwutygodniowych roślinach ogórka w fazie dwóch liści, zgodnie z metodyką opracowaną przez Olczak-Woltman i in. (2008). W obrębie każdej linii rekombinacyjnej testowano 16 roślin (4 powtórzenia i 4 rośliny w każdym powtórzeniu). Do przygotowania inokulumu użyto wirulentny izolat *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 814/98 (OD₆₀₀ = 0,05; 1 × 10⁷ CFU/ml). Inokulum наносzono od dolnej strony liści za pomocą ręcznego opryskiwacza. Podczas trwania testu zachowywano 16 h fotoperiod. Temperatura w ciągu dnia wynosiła 25°C, a w nocy 22°C. W celu zwiększenia względnej wilgotności powietrza do 95–100% rośliny nakrywano tunelikami foliowymi oraz wyłączało światło na 24 h bezpośrednio po inokulacji roślin. Ocenę stopnia porażenia roślin, w oparciu o dwa porażone liście, dokonano po 7 dniach od inokulacji używając 9-stopniowej skali bonitacyjnej wzorowanej na skali Jenkins i Wehner (1983), gdzie 1 oznacza pełną podatność zaś 9 pełną odporność na patogena (Olczak-Woltman i in., 2008). Ocena fenotypowa populacji mapującej obejmowała również ocenę typu reakcji na infekcję. Na podstawie oceny stopnia porażenia roślin oraz charakterystyki chloroz wyróżniano dwie klasy fenotypowe (Olczak-Woltman i in., 2009). Pierwszą stanowiły linie z wyraźnie odciętym, jasnym, chlorotycznym halo wokół drobnych lub średniej wielkości nekroz zajmujących od 8 do 15% powierzchni liści (typ reakcji typowy dla tolerancyjnej linii Gy14). W skład drugiej grupy wchodziły linie o rozmytych, rozległych intensywnie żółtych chlorozach oraz dużych nekrozach obejmujących powierzchnię liści do 87% (typ reakcji typowy dla linii B10). Segregację tej cechy 1:1 w odniesieniu do typu reakcji odpornościowej zweryfikowano testem statystycznym χ^2 ($v = 1$, $\alpha = 0,05$).

Ocenę przydatności markerów SSR do mapowania w populacji mapującej Gy14 × B10 opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz Yang i in. (2012) przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszym etapie wykonano analizę bioinformatyczną z użyciem algorytmu BLAST oraz programów Sequencher 4.5 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA) i CLC Genomics Workbench 7.5 (CLCBio, Aarhus, Denmark) wykorzystując sekwencje genomów linii Gy14 (<http://phytozome.net/>) i B10 (<http://csgenome.sggw.pl/>) i wskazując polimorficzne markery SSR *in silico*. W drugim etapie przetestowano doświadczalnie wytypowane markery SSR na liniach rodzicielskich i ośmiu losowo wybranych RIL

populacji mapującej, a następnie markery polimorficzne testowano na całej populacji mapującej. Segregację 1:1 potwierdzającą przydatność markerów do konstrukcji mapy genetycznej oceniono testem statystycznym χ^2 ($v = 1$, $\alpha = 0,05$). Test χ^2 użyto również do wstępnej identyfikacji markerów SSR sprzężonych z genem odporności na kanciastą plamistość ogórka. Dla każdego markera SSR wytypowano zestaw RIL, które podczas oceny fenotypowej wykazywały tolerancję na kanciastą plamistość, podobnie jak linia Gy14. W grupie tak wyselekcjonowanych RIL obserwowano przewagę linii z allelem markera SSR charakterystycznym dla linii Gy14.

Genomowe DNA izolowano z młodych liści ogórka z użyciem zestawu Gene Elute™ Plant Genomic MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej PCR przy całkowitej objętości reakcji 20 μ l był następujący: DreamTaq Buffer, dNTPs Mix 2mM, starter F — 1 μ M, starter R — 1 μ M, DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) — 0,6 U, DNA 40 ng. Amplifikację wykonano w termocyklerze PTC-200 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) wykorzystując program opracowany przez Pillen i in. (2000): 94°C 1 min, 64°C 30 sek, 72°C 1 min — 10 cykli, następnie 30 cykli — 94°C 1 min, 55°C 30 sek, 72°C 1 min i 1 cykl — 72°C przez 5 min. Elektroforeza produktów amplifikacji prowadzona była w 6% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Produkty rozdziału wizualizowano metodą srebrną według Benbouza i in. (2006).

WYNIKI I DISKUSJA

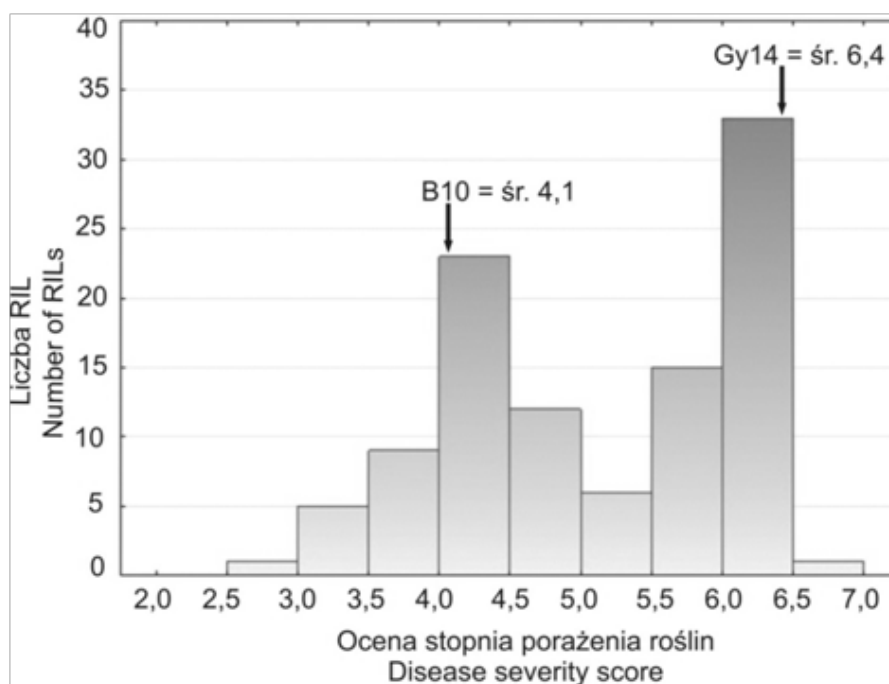
Charakterystyka reakcji odpornościowej RIL populacji mapującej ogórka

Testom patogeniczności poddano 110 RIL populacji mapującej Gy14 \times B10. Podczas oceny fenotypowej rozpatrywano odporność na bakteryjną kanciastą plamistość jako dwie oddzielne cechy. Pierwszą był stopień nasilenia objawów chorobowych z wykorzystaniem 9-stopniowej skali porażenia. Lina B10 wykazywała podatność na kanciastą plamistość. Na porażonych liściach pojawiały się duże początkowo silnie uwodnione plamy, przechodzące w nekrozy z pojawiającymi się wyciekami bakteryjnymi. Stopień nasilenia objawów sięgał od 50% do 75%, a często nawet do 87% powierzchni liści. Średnia ocena stopnia porażenia liści wyniosła 4,1. Z kolei linia Gy14 charakteryzowała się tolerancją na kanciastą plamistość. Na porażonych liściach obserwowano drobne lub średniej wielkości plamy nekrotyczne, a udział porażonej powierzchni liści wahał się od 8 do 25%, zaś średnia ocena stopnia porażenia liści wynosiła 6,4. Wyniki oceny fenotypowej linii rodzicielskich są zgodne z wcześniejszymi badaniami, których celem było wskazanie standardów podatności i tolerancji użytecznych podczas testowania materiałów hodowlanych na kanciastą plamistość liści ogórka (Olczak-Woltman i in., 2008). Zakres ocen stopnia porażenia RIL scharakteryzowanych jako typ linii B10 wynosił od 2,8 do 4,9; zaś dla RIL ocenionych jako typ linii Gy14 od 5,3 do 6,6 (tab. 1, rys. 1).

Tabela 1

Zakres ocen oraz średnia ocena stopnia porażenia roślin w odniesieniu do typu reakcji odpornościowej
The evaluation of range and average disease severity scores in relation to the angular leaf spot (ALS) resistance type

| Typ reakcji odpornościowej ALS resistance type | Liczba linii Number of lines | Zakres ocen Score range | | Średnia ocen Mean | Odchylenie standardowe Standard deviation |
|---------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|----------------------------------------------|
| | | minimum minimum | maksimum maximum | | |
| Linia Gy14 Gy14 line | linia mateczna materna line | 6,0 | 7,0 | 6,4 | 0,48 |
| Linia B10 B10 line | linia ojcowska paternal line | 3,0 | 5,0 | 4,1 | 0,63 |
| Typ linii Gy14 Gy14 resistance type | 55 | 5,3 | 6,6 | 6,0 | 0,33 |
| Typ linii B10 B10 resistance type | 51 | 2,8 | 4,9 | 4,2 | 0,48 |



Rys. 1. Rozkład oceny stopnia porażenia roślin w populacji mapującej Gy14 × B10
Fig. 1. Distribution of disease severity scores in mapping population Gy14 × B10

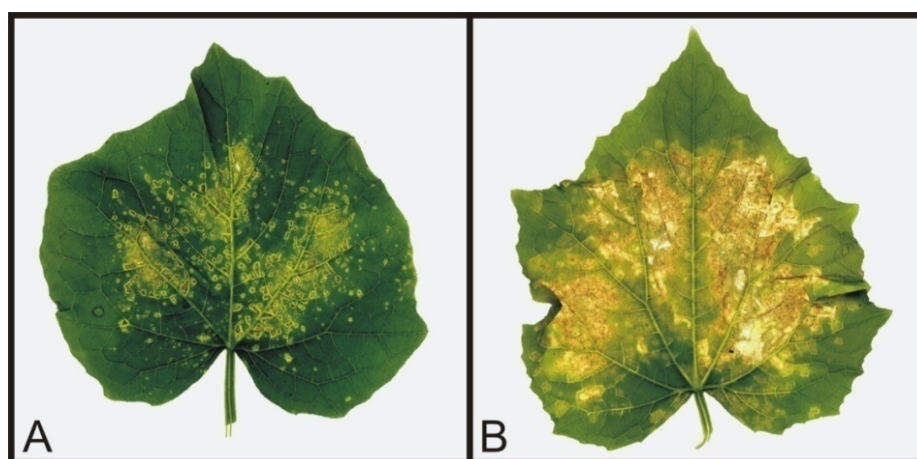
Drugą ocenianą podczas testu cechą była obecność chlorotycznego halo. Na tej podstawie wyróżniono dwie klasy fenotypowe. Pierwszą stanowiły linie z wyraźnie odciętym, jasnym chlorotycznym halo wokół nekroz, podobnie jak u linii Gy14 wykazujące tolerancję na bakteryjną kanciastą plamistość liści. W skład drugiej klasy

fenotypowej wchodziły linie o rozmytych, rozległych i intensywnych chlorozach bez halo, podobnie jak u linii B10 i podatne na tę chorobę (tab. 2, rys. 2).

Tabela 2

Wyniki analizy genetycznej w odniesieniu do typu reakcji odpornościowej
Results of genetic analysis in relation to the angular leaf spot resistance type

| Liczba testowanych linii Number of tested lines | | 110 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Liczba obserwowanych linii (typ reakcji odpornościowej) Number of observed lines (angular leaf spot resistance type) | Typ Gy14: odcięte, chlorotyczne halo, drobne nekrozy Gy14 type: limited chlorotic halo, small necroses | 55 |
| | Typ B10: rozległe chlorozy i nekrozy widespread chloroses and necroses | 51 |
| Testowane rozszczepienie Tested segregation ratio | | 1:1 |
| Wartość empiryczna χ^2 χ^2 empirical value | | 0,29 |
| Wartość krytyczna χ^2 ($v = 1, \alpha = 0,05$) χ^2 critical value ($v = 1, \alpha = 0.05$) | | 3,84 |



Rys. 2. Objawy bakteryjnej kanciastej plamistości ogórka wywołane przez *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. (A) linia Gy14 tolerancyjna na kanciastą plamistość liści, (B) linia B10 podatna na kanciastą plamistość liści

Fig. 2. Angular leaf spot symptoms on cucumber accessions caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. (A) Gy14 line tolerant to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, (B) B10 line susceptible to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

Spośród badanych linii 55 charakteryzowało się wyraźnym odciętym halo wokół nekroz i tolerancją, a 51 linii wykazywało rozmyte, rozległe chlorozy i podatność na kanciastą plamistość liści. Dla 4 linii trudno było określić jednoznacznie typ reakcji odpornościowej. Rozszczepienie fenotypowe 1:1, zweryfikowane testem χ^2 potwierdziło, że cecha obecności/braku chlorotycznego halo i typu chloroz jest determinowana monogenicznie. Wcześniej wykonane badania na roślinach pokolenia F₂, BC₁ i BC₂ uzyskanych z krzyżowania linii B10 × H603 również wskazały na jednogenowe dziedziczenie tej cechy. Stwierdzono

ponadto, że brak halo i rozległe chlorozy są cechą dominującą związaną z podatnością na kanciastą plamistość (Olczak-Woltman i in., 2009). Wyniki klasycznej analizy genetycznej potwierdziły też, że populacja mapująca Gy14 × B10 osiągnęła w pokoleniu F₅ wysoki poziom homozygotyczności, a linie wchodzące w jej skład są wyrównane genetycznie, co czyni tę populację przydatną do mapowania genów odporności na kanciastą plamistość liści ogórka (tab. 2).

Identyfikacja markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej ogórka

Dostępność sekwencji genomów ogórka linii Gy14 i B10 pozwoliła na zastosowanie analizy bioinformatycznej do zidentyfikowania *loci* mikrosatelitarnych potencjalnie różnicujących te linie. Wytypowano w ten sposób 89 markerów SSR spośród 995 markerów opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz 133 markery spośród 735 opracowanych przez Yang i in. (2012), co stanowiło odpowiednio 8,9% i 18,1%. Wskazano również potencjalny typ polimorfizmu, oznaczony jako „expGy14” lub „expB10”, gdzie polimorfizm „expGy14” oznaczał większą liczbę powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnej dla linii Gy14, a polimorfizm „expB10” dla B10. W przypadku markerów opracowanych przez Ren i in. (2009) 46 markerów wykazywało polimorfizm typu „expGy14”, zaś 43 typu „expB10”. Wśród markerów opracowanych przez Yang i in. (2012) 75 markerów charakteryzowało się polimorfizmem typu „expGy14”, zaś 58 typu „expB10”, co sugeruje częstszą ekspansję *loci* mikrosatelitarnych u linii Gy14 (tab. 3).

Tabela 3

Zestawienie *loci* mikrosatelitarnych wykazujących polimorfizm na podstawie analizy bioinformatycznej Bioinformatic analysis of results in relation to identified microsatellite loci showing polymorphism

| | <i>Loci</i> mikrosatelitarne opracowane przez: Microsatellite loci developed by: | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| | Ren i in. (2009) | | Yang i in. (2012) | |
| | liczba number of <i>loci</i> | % wszystkich <i>loci</i> ^b % of all <i>loci</i> ^b | liczba number of <i>loci</i> | % wszystkich <i>loci</i> ^b % of all <i>loci</i> ^b |
| <i>Loci</i> mikrosatelitarne ^a : Microsatellite loci ^a : | 995 | 100 | 735 | 100 |
| - zidentyfikowane bioinformatycznie w genomie linii Gy14 - bioinformatically identified in Gy14 genome | 562 | 56,5 | 695 | 94,6 |
| - zidentyfikowane bioinformatycznie w genomie linii B10 - bioinformatically identified in B10 genome | 484 | 48,6 | 469 | 63,8 |
| Polimorficzne <i>loci</i> mikrosatelitarne: Polymorphic microsatellite loci: | 89 | 8,9 | 133 | 18,1 |
| - polimorfizm typu „expGy14” ^c - „expGy14” polymorphism type ^c | 46 | 4,6 | 75 | 10,2 |
| - polimorfizm typu „expB10” ^d - „expB10” polymorphism type ^d | 43 | 4,3 | 58 | 7,9 |

^a suma *loci* mikrosatelitarnych opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz Yang i in. (2012); sum of the microsatellite *loci* published by Ren et al. (2009) and Yang et al. (2012)

^b % *loci* mikrosatelitarnych w odniesieniu do sumy opracowanych *loci*; % of microsatellite loci with regard to the sum of published loci

^c liczba powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnej większa dla linii Gy14; number of the microsatellite sequence repeats greater for the line Gy14

^d liczba powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnej większa dla linii B10; number of the microsatellite sequence repeats greater for the line B10

Wytypowany *in silico* zestaw 89 markerów opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz 71 markerów opracowanych przez Yang i in. (2012), łącznie 160 markerów SSR, przetestowano doświadczalnie na liniach rodzicielskich i ośmiu wybranych RIL. Potwierdzono polimorfizm dla 68,5% *loci* mikrosatelitarnych opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz dla 59% *loci* opracowanych przez Yang i in. (2012), łącznie dla 64,4% markerów SSR. Zastosowanie analizy bioinformatycznej do typowania markerów SSR potencjalnie różnicujących linie rodzicielskie Gy14 i B10 okazało się efektywne, a uzyskany stopień polimorfizmu w obrębie linii rodzicielskich i ośmiu wybranych RIL można uznać za satysfakcjonujący. Dla porównania Yang i in. (2012) stosując tę samą metodę z zestawu 1266 markerów SSR opracowanych przez Ren i in. (2009) wskazali 731 markerów SSR (57,7%) potencjalnie różnicujących linie Gy14 i 9930, jednakże eksperymentalnie polimorfizm potwierdzono jedynie dla 312 markerów SSR (25%). Wykorzystanie analizy bioinformatycznej pozwoliło w znacznym stopniu ograniczyć liczbę markerów SSR wytypowanych do dalszego testowania spośród markerów opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz Yang i in. (2012). Potwierdza to zasadność jej wykonania, jednakże metoda ta nie była w pełni skuteczna. Dla 35,4% markerów SSR wytypowanych bioinformatycznie jako różnicujące linie rodzicielskie uzyskano produkty amplifikacji, które jednak nie różnicowały linii rodzicielskich. Przyczynami braku polimorfizmu mogły być niedokładności analizy bioinformatycznej spowodowane nieścisłościami w sekwencjach genomów linii Gy14 i B10 wynikającymi z błędów podczas sekwencjonowania i/lub składania odczytów sekwencyjnych, jak również fakt, że do sekwencjonowania genomów wykorzystywano DNA pochodzące z innych roślin niż to, które wykorzystywano do oceny polimorfizmu.

Zakres wielkości uzyskanych ampikonów dla testowanych markerów SSR wynosił od 107 do 460 par zasad (pz). Natomiast różnice w wielkości ampikonów między liniami rodzicielskimi wahały się od 2 do 60 pz, przy czym dla większości markerów był to zakres od 2 do 10 pz. Liczba zidentyfikowanych na podstawie analizy bioinformatycznej polimorficznych *loci* mikrosatelitarnych na poszczególnych chromosomach była nierównomierna. Najwięcej polimorficznych *loci* (51) zidentyfikowano dla chromosomu 3, najmniej (15) — dla chromosomu 2. Z prac dotyczących identyfikacji genów odporności, kodujących białka NBS-LRR wynika, że geny te u ogórka występują na chromosomach 2, 3, 4 i 5 podczas gdy nie zidentyfikowano ich na chromosomach 1, 6 i 7 (Huang i in., 2009; Wang i in., 2013; Yang i in., 2013). Testując markery opracowane przez Ren i in. (2009) na całej populacji mapującej wykazano przydatność 52 markerów do konstrukcji mapy genetycznej ogórka, co potwierdzono testem statystycznym χ^2 . Najwięcej polimorficznych markerów SSR zidentyfikowano na chromosomie 3, w przeciwieństwie do chromosomu 1, 2 i 4, na których zidentyfikowano ich stosunkowo mało (tab. 4). Wstępne analizy pokazały, że marker SSR00398 zlokalizowany na chromosomie 5 może być sprzężony z genem odporności na kanciastą plamistość liści ogórka. Z punktu widzenia konstrukcji mapy genetycznej i mapowania genów związanych z kanciastą plamistością liści ogórka konieczne są dalsze prace nad identyfikacją markerów SSR zlokalizowanych na chromosomach 2, 3, 4 i 5.

Lokalizacja chromosomowa *loci* mikrosatelitarnych ogórka
Chromosome location of cucumber microsatellite loci

| Chromosom Chromosome | Loci mikrosatelitarne — Microsatellite loci | | | | | | przydatne do konstrukcji mapy genetycznej ^b useful to genetic map construction ^b |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | polimorfizm w analizie bioinformatycznej polymorphism based on bioinformatics analysis | | | polimorfizm na podstawie wstępnej analizy ^a polymorphism based on preliminary analysis ^a | | | |
| | oprac. przez Ren i in. (2009) developed by Ren et al. (2009) | oprac. przez Yang i in. (2012) developed by Yang et al. (2012) | razem total | oprac. przez Ren i in. (2009) developed by Ren et al. (2009) | oprac. przez Yang i in. (2012) developed by Yang et al. (2012) | razem total | |
| Chr1 | 8 | 30 | 38 | 7 | 4 | 11 | 4 |
| Chr2 | 5 | 10 | 15 | 4 | 3 | 7 | 3 |
| Chr3 | 24 | 27 | 51 | 21 | 8 | 28 | 20 |
| Chr4 | 8 | 19 | 27 | 5 | 8 | 13 | 3 |
| Chr5 | 16 | 21 | 37 | 7 | 7 | 14 | 6 |
| Chr6 | 17 | 13 | 30 | 9 | 6 | 15 | 9 |
| Chr7 | 11 | 13 | 24 | 8 | 6 | 14 | 7 |
| Razem Total | 89 | 133 | 222 | 61 | 42 | 103 | 52 |

^awykazujące polimorfizm na podstawie wstępnej analizy na liniach rodzicielskich i ośmiu losowo wybranych liniach RIL; showing polymorphism in preliminary analysis of parental lines and a sample of eight random RILs

^bprzetestowane na całej populacji mapującej, przydatne do konstrukcji mapy genetycznej; tested in the whole mapping population, useful for genetic map construction

WNIOSKI

1. Ocena populacji mapującej Gy14 × B10 pod względem cechy odporności na bakteryjną kanciastą plamistość liści wskazuje, że populacja osiągnęła w pokoleniu F₅ wysoki poziom homozygotyczności, a linie wsobne wchodzące w jej skład są wyrównane genetycznie. Umożliwia to wykorzystanie tej populacji do mapowania genów odporności związanych z kanciastą plamistością liści ogórka.
2. Wysoki udział polimorficznych markerów SSR w porównaniu z poziomem polimorfizmu opisywanym w innych pracach dotyczących konstrukcji map genetycznych ogórka potwierdza przydatność wstępnej analizy bioinformatycznej *loci* mikrosatelitarnych w celu typowania markerów SSR przydatnych do mapowania.
3. Liczba markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej Gy14 × B10 zidentyfikowanych na poszczególnych chromosomach jest nierównomierna. Dla chromosomu 3, w przeciwieństwie do chromosomu 1, 2 i 4, potwierdzono przydatność największej liczby markerów SSR. W oparciu o dostępną wiedzę na temat lokalizacji chromosomowej genów odporności u ogórka konieczne jest dalsze poszukiwanie markerów SSR, a szczególnie dla chromosomów 2, 3, 4 i 5.
4. Spośród 52 markerów SSR przetestowanych w populacji mapującej Gy14 × B10 wstępnie wskazano marker SSR00398 zlokalizowany na chromosomie 5 jako sprzężony z genem odporności na bakteryjną kanciastą plamistość liści ogórka.

LITERATURA

- Adhikari B. N., Savory E. A., Vaillancourt B., Childs K. L., Hamilton J. P., Day B., Buell C. R. 2012. Expression profiling of *Cucumis sativus* in response to infection by *Pseudoperonospora cubensis*. PLoS ONE 7: e34954.
- Benbouza H., Jacquemin J., Baudoin J., Mergeai G. 2006. Optimization of reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10: 77 — 81.
- Hammerschmidt R. 1999 a. PHYTOALEXINS: What have we learned after 60 years? Ann. Rev. Phytopathol. 37: 285 — 306.
- Hammerschmidt R. 1999 b. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? Physiol. Mol. Plant Pathol. 55: 77 — 84.
- Huang S., Li R., Zhang Z., Li L., Gu X., Fan W., Lucas W. J., Wang X., Xie B., Ni P., Ren Y., Zhu H., Li J., Lin K., Jin W., Fei Z., Li G., Staub J., Kilian A., van der Vossen E. A., Wu Y., Guo J., He J., Jia Z., Ren Y., Tian G., Lu Y., Ruan J., Qian W., Wang M., Huang Q., Li B., Xuan Z., Cao J., Asan Wu Z., Zhang J., Cai Q., Bai Y., Zhao B., Han Y., Li Y., Li X., Wang S., Shi Q., Liu S., Cho W. K., Kim J. Y., Xu Y., Heller-Uszynska K., Miao H., Cheng Z., Zhang S., Wu J., Yang Y., Kang H., Li M., Liang H., Ren X., Shi Z., Wen M., Jian M., Yang H., Zhang G., Yang Z., Chen R., Liu S., Li J., Ma L., Liu H., Zhou Y., Zhao J., Fang X., Li G., Fang L., Li Y., Liu D., Zheng H., Zhang Y., Qin N., Li Z., Yang G., Yang S., Bolund L., Kristiansen K., Zheng H., Li S., Zhang X., Yang H., Wang J., Sun R., Zhang B., Jiang S., Wang J., Du Y., Li S. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nat. Genet. 41: 1275 — 1281.
- Jenkins S. F., Wehner T. C. 1983. A system for the measurement of foliar diseases of cucumber. Cucurbit Genet. Coop. Rep. 6: 10 — 12.
- Lough T. J., Lucas W. J. 2006. Integrative plant biology: role of phloem long distance macromolecular trafficking. Ann. Rev. Plant Biol. 57: 203 — 232.
- Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K. 1991. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a model system for molecular biology. Plant Sci. 80: 39 — 47.
- Miao H., Zhang S., Wang X., Zhang Z., Li M., Mu S., Cheng Z., Zhang R., Huang S., Xie B., Fang Z., Zhang Z., Weng Y., Gu X. 2011. A linkage map of cultivated cucumber (*Cucumis sativus* L.) with 248 microsatellite marker loci and seven genes for horticulturally important traits. Euphytica 182: 167 — 176.
- Olczak-Woltman H., Gałęcka T., Korzeniewska A., Niemirowicz-Szczytt K. 2007. Odporność linii DH ogórka na bakteryjną kanciastą plamistość. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 517: 527 — 532.
- Olczak-Woltman H., Schollenberger M., Mądry W., Niemirowicz-Szczytt K. 2008. Evaluation of cucumber (*Cucumis sativus*) cultivars grown in Eastern Europe and progress in breeding for resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). Eur J. Plant Pathol. 122: 385 — 393.
- Olczak-Woltman H., Bartoszewski G., Mądry W., Niemirowicz-Szczytt K. 2009. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) in cucumber and identification of molecular markers linked to resistance. Plant Pathol. 58: 145 — 151.
- Pillen K., Binder A., Kreuzkam B., Ramsay L., Waugh R., Förster J., Léon J. 2000. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. Theor. Appl. Genet. 101: 652 — 660.
- Ren Y., Zhang Z., Liu J., Staub J. E., Han Y., Cheng Z., Li X., Lu J., Miao H., Kang H., Xie B., Gu X., Wang X., Du Y., Jin W., Huang S. 2009. An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. PLoS ONE 4: e5795.
- Tanurdzic M., Banks J. A. 2004. Sex-determining mechanisms in land plants. Plant Cell 16 Suppl.: S61 — 71.
- Wan H., Yuan W., Bo K., Shen J., Pang X., Chen J. 2013. Genome-wide analysis of NBS-encoding disease resistance genes in *Cucumis sativus* and phylogenetic study of NBS-encoding genes in *Cucurbitaceae* crops. BMC Genomics 14: 109.
- Wóycicki R., Witkiewicz J., Gawroński P., Dąbrowska J., Lomsadze A., Pawełkiewicz M., Siedlecka E., Kohei Yagi, Piłder W., Seroczyńska A., Śmiech M., Gutman W., Niemirowicz-Szczytt K., Bartoszewski G., Norikazu Tagashira, Yoshikazu Hoshi, Borodovsky M., Karpiński S., Malepszy S., Przybecki Z. 2011.

- The genome sequence of the North-European cucumber (*Cucumis sativus* L.) unravels evolutionary adaptation mechanisms in plants. PLoS ONE 6: e22728.
- Yang L., Koo D.H., Li Y., Zhang X., Luan F., Havey M. J., Jiang J., Weng Y. 2012. Chromosome rearrangements during domestication of cucumber as revealed by high-density genetic mapping and draft genome assembly. Plant J 71: 895 — 906.
- Yang L., Dawei L., Yuhong L., Xingfang G., Sanwen H., Garcia-Mas J., Weng Y. 2013. A 1,681-locus consensus genetic map of cultivated cucumber including 67 NB-LRR resistance gene homolog and ten gene loci. BMC Plant Biol. 13: 53.