

ZADANIE 44

Opracowanie markerów molekularnych dla odporności roślin porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) na ważne patogeny i szkodnika



POSTĘP BIOLOGICZNY
Okres realizacji – 2021-2025

KIEROWNIK ZADANIA 44
Prof. dr hab. Stanisław Pluta
e-mail: Stanislaw.Pluta@inhort.pl

Wykonawcy: prof. dr hab. Joanna Puławska, prof. dr hab. Mirosława Cieślińska, dr. hab. Agnieszka Masny, prof. IO, dr Agata Broniarek-Niemiec, dr Łukasz Seliga, dr Monika Michalecka, dr Aleksandra Trzewik, dr Wojciech Piotrowski, dr Marek Szymajda, dr Mariusz Lewandowski, mgr Jolanta Kubik, inż. Alicja Klepaczka, inż. Julia Trzcińska, Aleksandra Supeł, Dorota Starzec, Barbara Sobieszek, Patrycja Rakowska, Agnieszka Budzałek, Leszek Skorupiński, Stanisław Bodek.

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice



CELE PROJEKTU

- Charakterystyka genetyczna populacji grzyba *Cronartium ribicola* sprawcy rdzy wejmutkowo-porzeczkowej i identyfikacja jego ras – cel osiągnięty.
- Opracowanie markerów molekularnych genów odporności porzeczki czarnej na różne rasy patogena (*C. ribicola*) – cel osiągnięty.
- Optymalizacja metody sztucznej inokulacji roślin porzeczki czarnej grzybem *C. ribicola* w warunkach szklarni lub laboratorium – cel osiągnięty.
- Diagnostyka chorób wywoływanych przez mało znane wirusy *Blackcurrant leaf chlorosis virus* (BCIV) i *Blackcurrant virus A* (BCVA) – cel osiągnięty.
- Ocena zasiedlenia genotypów porzeczki czarnej przez wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*) w warunkach naturalnej presji szpeciela – cel osiągnięty.

MATERIAŁY I METODY (1)

I. Materiał badawczy:

1. Liście z widocznymi objawami rdzy wejmutkowo-porzeczkowej (*C. ribicola*) na dolnej stronie blaszki liściowej, rdzawych skupień urediniospor (**Fot. 1**), zebrane z 20 plantacji produkcyjnych lub niewielkich nasadzeń porzeczki czarnej, różnych odmian, zlokalizowanych w województwach: kujawsko-pomorskim, lubelskim, łódzkim i wielkopolskim
2. Krzewy wybranych genotypów porzeczki czarnej rosnące w hodowlanej kolekcji *Ribes* Zakładu Hodowli Roślin Ogrodniczych (ZHRO) – **Fot. 2**.
3. Rośliny 30 genotypów (odmiany i klony hodowlane) porzeczki czarnej rosnące w doświadczeniu polowym.



Fot. 1. Skupienia zarodników rdzawnikowych urediniospor (*C. ribicola*) na dolnej stronie liścia.



Fot. 2. Kolekcja odmian porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L) Zakładu Hodowli Roślin Ogrodniczych (ZHRO).

MATERIAŁY I METODY (2)

II. Metody badawcze:

1. Izolacja DNA grzyba *Cronartium ribicola*, sprawcy rdzy wejmutkowo-porzeczkowej (Fot. 3) oparta o odczynnik CTAB (Doyle i Doyle, 1990).
2. Amplifikacja DNA *Cronartium ribicola* w reakcjach ISSR PCR, RAPD PCR i PCR MP.
3. Odczytanie wielkości produktów reakcji i przygotowanie danych do analiz bioinformatycznych w celu oszacowania zróżnicowania genetycznego populacji grzyba *C. ribicola*.
4. Opracowanie markerów molekularnych (RAPD i SSR) genów odporności wybranych genotypów porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (*C. ribicola*)
5. Testowanie roślin wybranych genotypów porzeczki czarnej na obecność *Blackcurrant leaf chlorosis virus* (BCICaV) związanego z chlorozą porzeczki czarnej i *Ribes americanum virus A* (RAVA) powodujący deformację liści.
6. Ocena polowej podatności genotypów porzeczki czarnej na zasiedlenia przez wielkopąkowca porzeczkowego w warunkach naturalnej presji szpeciela (Fot. 4)



Fot. 3. Rdza wejmutkowo-porzeczkowa (*C. ribicola*) na liściu porzeczki czarnej.



Fot. 4. Objawy porażonych pąków porzeczki czarnej przez wielkopąkowca porzeczkowego.

WYNIKI – Temat badawczy 1

- Październik 2024 r. pobranie prób liści porzeczki czarnej z objawami rdzy wejmutkowo porzeczkowej – z lokalizacji i odmian **wg Tabeli 1**
- Listopad: izolacja DNA z łącznie uzyskano 200 izolatów/prób oraz przeprowadzenie PCRów typu fingerprint („odcisk palca”) – łącznie 11 (5 x ISSR, 3 x RAPD, 3 x MP PCR).
- **Listopad/grudzień: Wszystkie reakcje PCR zostały już przeprowadzone, trwają odczyty wielkości produktów tych reakcji. W kolejnym kroku wszystkie produkty uzyskane dla każdego izolatu/próby zostaną zakodowane w systemie binarnym (0-1), tak, aby mogły zostać wprowadzone do programów bioinformatycznych i wykorzystane do konstrukcji drzew filogenetycznych. Na koniec planowana jest interpretacja wyników – oddzielnie dla grupy markerów, tzn. porównanie profili uzyskanych dla RAPD, ISSR oraz MP PCR i wnioskowanie o źródle różnorodności genetycznej.**

Izolacja genomowego DNA z liści wg metody Doyle'a i Doyle (1987) zmodyfikowanej przez Trzewik i in. (2016) nie pozwoliła na uzyskanie DNA o czystości wystarczającej do przeprowadzenia zaplanowanych analiz PCR (Tabela). Stężenie uzyskanych preparatów DNA wahało się od 32 do 67 ng/μl, natomiast średnia wartości współczynników charakteryzujących czystość DNA, 260/280 nm i 260/230 nm wyniosła odpowiednio 1,02 oraz 0,99. Doczyszczanie otrzymanych preparatów DNA przy wykorzystaniu komercyjnego zestawu nie wpłynęło znacząco na poprawę czystości DNA. Dopiero ponowna izolacja genomowego DNA z liści przechowywanych w zamrażarce -80°C wg zmodyfikowanej metody Doyle'a i Doyle (1987) z dodatkowym doczyszczaniem mieszaniną fenol-chloroform-alkohol izoamyłowy pozwoliła na uzyskanie DNA o stężeniu od 55 do 115 ng/μl, a średnia wartości współczynników 260/280 nm i 260/230 nm wyniosła odpowiednio 1,90 i 1,93 (Tabela) i była wystarczająca do analiz PCR.

Tabela 1. Stężenie DNA oraz wartości współczynników 260/280 nm, 260/230 nm preparatów wyizolowanych z liści 20 odmian porzeczki czarnej

Odmiana porzeczki czarnej	Zmodyfikowana metoda Doyle'a i Doyle (I izolacja)			Zmodyfikowana metoda Doyle'a i Doyle (II izolacja)		
	Stężenie DNA (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm	Stężenie DNA (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm
Ben Tirran	32	0,92	1,23	85	20,1	1,80
Ben Tron	35	0,43	1,09	84	1,80	1,94
Elo	42	0,98	1,29	72	1,99	2,00
Tihope	66	0,98	1,32	91	1,95	1,69
Tisel	48	0,88	0,94	105	1,79	1,74
Polaris	39	1,02	0,76	104	1,86	1,99
Polonus	37	1,12	0,79	55	1,87	1,98
Titania	36	1,02	1,42	95	1,94	2,00
Sanderbyn II	46	0,99	0,90	84	1,82	2,10
Sanjuta	42	1,23	0,82	112	1,86	2,00
Andega	51	1,12	1,03	59	1,87	1,98
Bona	62	0,95	0,91	91	1,97	1,97
Gofert	67	1,03	0,84	115	1,98	1,86
Imandra	40	1,22	0,83	81	1,99	1,90
Narve Viking	33	1,05	0,83	69	1,90	2,10
Ores	47	0,96	0,91	101	1,88	1,98
Polben	52	0,79	1,08	109	1,79	1,70
Ruben	51	0,89	1,02	98	1,98	1,89
Tiben	47	1,23	0,95	87	2,00	1,90
Tsema	53	1,52	1,02	103	1,81	2,01
średnia		1,02	0,99		1,90	1,93

WYNIKI – Temat badawczy 3

Tabela 2. Podatność wybranych genotypów porzeczki czarnej na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, Skierniewice, 2023 r. (średnie wyniki z 5 roślin/powtórzeń)

Lp.	Genotyp	Kraj pochodzenia	Stopień porażenia liści przez <i>C. ribicola</i> wg skali bonitacyjnej (0-5) ^A
1	Andega	Francja	2,5 cde *
2	Ben Tirran	Szkocja	1,8 bc
3	Ben Tron	Szkocja	5,0 j
4	Bona	Polska	3,3 efg
5	Elo	Estonia	3,8 gh
6	Gofert	Polska	2,8 def
7	Imandra	Rosja	2,5 cde
8	Narve Viking	Norwegia	4,0 ghi
9	Ores	Polska	3,5 fg
10	Polares	Polska	1,5 b
11	Polben	Polska	4,8 ij
12	Polonus	Polska	2,3 bcd
13	Ruben	Polska	4,8 ij
14	Sanjuta	Ukraina	0,0 a
15	Sunderbyn II	Szwecja	3,8 gh
16	Tiben	Polska	5,0 j
17	Tihope	Polska	4,8 ij
18	Tisel	Polska	4,8 ij
19	Titania	Szwecja	3,5 fg
20	Tsema	Holandia	4,5 hij
Średnia ogólna			3,5

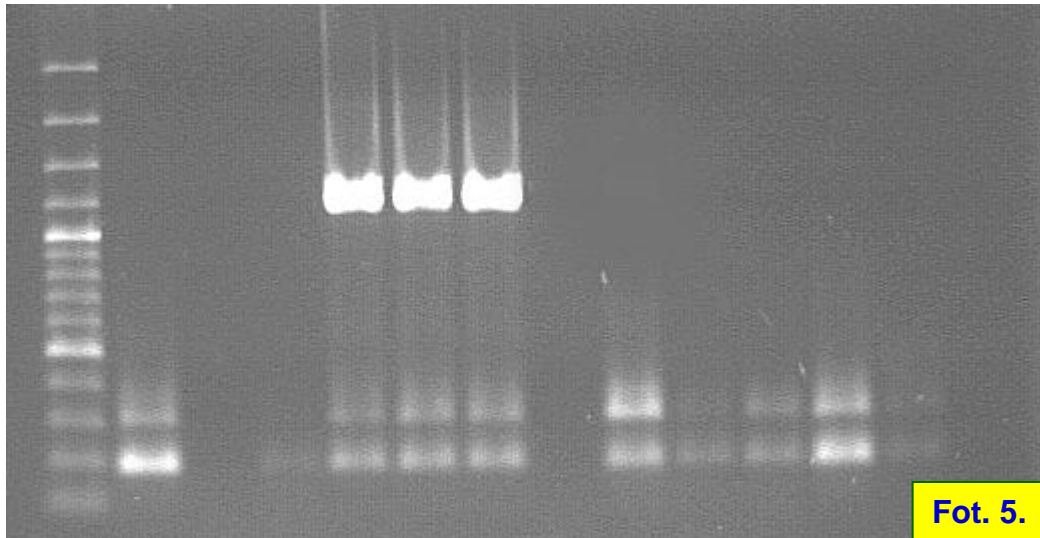
1. W warunkach sztucznej inokulacji zarodnikami grzyba *C. ribicola* średnie porażenie ocenianych genotypów porzeczki czarnej wynosiło 3,5 i zawierało się w przedziale od 0,0 do 5,0 wg 6-cio stopniowej skali bonitacyjnej (Tabela 2).
2. Dziewięć testowanych genotypów porażonych było w średnim stopniu (od 2,3 do 3,8, w skali bonitacyjnej 0-5).
3. Największe nasilenie (od 4,0 do 5,0, wg skali bonitacyjnej 0-5) symptomów rdzy wejmutkowo-porzeczkowej stwierdzono na roślinach ośmiu genotypów ('Ben Tron', 'Narve Viking' 'Polben', 'Ruben', 'Tiben', 'Tihope', 'Tisel' i 'Tsema').

A - skala bonitacyjna 0-5, w której 0 - liście zdrowe, 1 = 1-3% powierzchni liści porażonej przez grzyb, 2 = 3-10%, 3 = 10-30%, 4 = 30-50%, 5 - powyżej 50% powierzchni porażonej przez grzyb *C. ribis*.

* - średnie oznaczone tą samą literą w kolumnach nie różnią się istotnie przy $p = 0,05$.

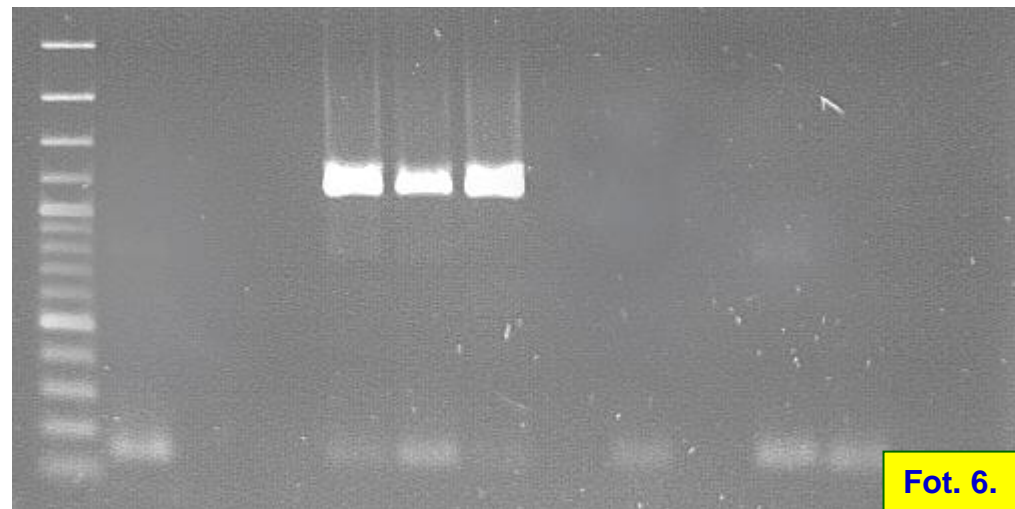
WYNIKI – Temat badawczy 4

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Fot. 5. Elektroforogram produktów reakcji RT-PCR uzyskanych dla prób porzeczki czarnej z kolekcji odmian w Dąbrowicach ze starterami BCLCaV1184MP-F/BCLCaV1184MP-R specyficznymi dla genu białka transportowego *Blackcurrant leaf chlorosis associated virus*. M - marker wielkości, 1 - Aranka; 2 - Ben Hope; 3 - Ben Tron; 4 - Big Ben; 5 - Ceres; 6 - Czereszniawa; 7 - Gofert; 8 - Janczewski; 9 - Kupoliniaj; 10 - Anegda; 11 - Tihope; 12 - Imandra; 13 - kontrola negatywna (zdrowa roślina).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Fot. 6. Elektroforogram produktów reakcji RT-PCR uzyskanych dla prób porzeczki czarnej z kolekcji odmian w Dąbrowicach ze starterami BCLCaV1184MP-F/BCLCaV1184MP-R specyficznymi dla genu białka transportowego *Blackcurrant leaf chlorosis associated virus*. M - marker wielkości, 1 - Aranka; 2 - Ben Hope; 3 - Ben Tron; 4 - Big Ben; 5 - Ceres; 6 - Czereszniawa; 7 - Gofert; 8 - Janczewski; 9 - Kupoliniaj; 10 - Anegda; 11 - Tihope; 12 - Imandra; 12 - kontrola negatywna (zdrowa roślina).

WYNIKI – Temat badawczy 5

Lp.	Genotyp	Kraj pochodzenia	Stopień zasiedlenia pąków przez wielkopąkowca porzeczkowego		
			Wiosna	Jesień	Średnia
			04.04.2024	23.10.2024	roczna
1	Andega	Francja	0,3	0,0	0,2
2	Ben Tirran	Szkocja	0,0	0,0	0,0
3	Ben Tron	Szkocja	0,9	0,9	0,9
4	Gofert	Polska	1,0	0,9	1,0
5	Imandra	Szwecja	0,4	0,3	0,4
6	Sunderbyn II	Szwecja	0,0	0,0	0,0
7	Tihope	Polska	0,1	0,6	0,4
87	Tsema	Holandia	0,0	0,0	0,0
9	Ruben	Polska	1,2	1,3	1,3
10	Tiben	Polska	0,2	0,0	0,1
11	Bona	Polska	1,6	9,3	5,5
12	Elo	Estonia	0,0	0,0	0,0
13	Ores	Polska	0,0	0,0	0,0
14	Polares	Polska	0,0	0,0	0,0
15	Polben	Polska	3,5	2,5	3,0
16	Polonus	Polska	0,1	0,1	0,1
17	Tiben II	Polska	0,5	3,0	1,8
18	Tisel	Polska	0,1	0,5	0,3
19	Ruben II	Polska	0,5	1,4	1,0
20	9A/9	Polska	1,0	0,1	0,6
21	12D/4	Polska	1,1	0,6	0,9
22	12D/40	Polska	1,3	1,0	1,2
23	PC-797	Polska	1,0	2,0	1,5
24	PC-811	Polska	15,5	2,9	9,2
25	PC 825	Polska	2,4	3,3	2,9
26	PC-778	Polska	0,9	2,3	1,6
27	PC-13B/11	Polska	0,3	1,7	1,0
27	26/1/1	Szkocja	0,3	0,7	0,5
29	Titania	Szwecja	0,1	0,6	0,4
30	Sanjuta	Ukraina	0,0	0,0	0,0

Wielkopąkowiec porzeczkowy

- Uszkadza pąki i jest wektorem rewersji porzeczeki czarnej.
- Małeńki szpeciel - 0.15 -0.25 mm, żeruje i zimuje w pąkach porzeczeki (Fot. 7.)
- Migracja od końca marca do końca maja, głównie tuż przed i podczas kwitnienia
- Rozwija kilka pokoleń w sezonie
- Przenoszony z sadzonkami, przez wiatr, człowieka, owady, roztocze



Fot. 7. Widok szpecieli wielkopąkowca porzeczkowego w pąku porzeczeki czarnej pod mikroskopem.

WNIOSKI

1. Metoda izolacji genomowego DNA z liści porzeczek czarnej wg Doyle i Doyle (1987) zmodyfikowana przez Trzewik i in. (2016) pozwoliła na otrzymanie preparatów DNA o stężeniu i czystości odpowiedniej do analiz PCR dopiero po dodatkowym doczyszczaniu mieszaniną fenol-chloroform-alkohol izoamylowy.
2. Metoda sztucznej inokulacji mieszaniną urediniosporów *C. ribicola* w warunkach szklarniowych okazała się skuteczna w fenotypowej ocenie porażenia roślin testowanych genotypów porzeczek czarnej.
3. Testowane odmiany różnią się istotnie pod względem stopnia porażenia liści przez grzyb *C. ribicola*.
4. Na roślinach tylko jednej odmiany ('Sanjuta') nie zaobserwowano żadnych objawów rdzy wejmutkowo-porzeczkowej. Większość testowanych genotypów było w średnim stopniu porażone przez tego patogena.
5. Polskie odmiany, które w warunkach polowych wykazywały małą podatność na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, w wyniku sztucznej inokulacji, były w średnim lub silnym stopniu porażone przez *C. ribicola*.
6. Po raz pierwszy w Polsce wykryto *Blackcurrant leaf chlorosis virus* (BCLCaV).
7. Wykrycie BCLCaV w roślinach porzeczek czarnej rosnących w kolekcji odmian w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach może wskazywać na obecność pierwotnego źródła (lub źródeł) wirusa, z którego w kolejnych latach uprawy BCLCaV rozprzestrzenił się na sąsiednie krzewy innych odmian porzeczek.
8. W 2024 roku na krzewach ocenianych genotypów porzeczek czarnej rosnących w doświadczeniu polowym zagrożenie ze strony wielkopąkowca porzeczkowego kształtowało się na średnim poziomie.
9. Na genotypach porzeczek czarnej takich jak 'Ben Tirran', 'Sunderbyn II', 'Tsema', 'Elo', 'Ores', 'Polares' i 'Sanjuta' nie notowano pąków uszkodzonych przez wielkopąkowca porzeczkowego.
10. Większość testowanych genotypów porzeczek czarnej należy do grupy odpornych na tego szkodnika.
11. Najwięcej zasiedlonych przez szpeciele pąków stwierdzono na krzewach dwóch genotypów: 'Bona' i PC 811.
12. Pod mikroskopem w uszkodzonych przez szpeciele pąkach znaleziono liczne osobniki wielkopąkowca porzeczkowego.