

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
dr hab. Stanisław Pluta, prof. IO
e-mail: Stanislaw.Pluta@inhort.pl

Wykonawcy: Prof. dr hab. Joanna Puławska, dr hab. Mirosława Cieślińska, prof. IO, dr. hab. Agnieszka Masny, prof. IO, dr Agata Broniarek-Niemiec, dr. Łukasz Seliga, dr Mariusz Lewandowski, dr. Marek Szymajda, mgr Monika Michalecka, mgr Anna Poniadowska, mgr Jolanta Kubik, inż. Alicja Klepaczka, Dorota Starzec, Patrycja Rakowska, Małgorzata Bartkowicz, Leszek Skorupiński, Stanisław Bodek,

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



CELE PROJEKTU

- Opracowanie sposobu pobierania prób *C. ribicola*, izolacji DNA oraz wybór techniki i starterów dla fingerprinting DNA – cel osiągnięty.
- Testowanie odmian porzeczki czarnej w kolekcji *Ribes* pod kątem podatności na rdzę wejmutkowo-porzeczkową – cel osiągnięty.
- Testowanie wybranych genotypów porzeczki czarnej na obecność wirusa rewersji porzeczki czarnej (*Blackcurrant reversion virus*, BRV) metodą RT-PCR – cel osiągnięty.

I. Materiał badawczy:

1. Liście z widocznymi objawami rdzy wejmutkowo-porzeczkowej (*C. ribicola*) na dolnej stronie blaszki liściowej, rdzawych skupień urediniospor – **Fot. 1.**
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 zgromadzonych w hodowlanej kolekcji ZHRO – **Fot. 3.**



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



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



Fot. 3. Rośliny porzeczki czarnej rosnące w hodowlanej kolekcji odmian z rodzaju *Ribes*.

II. Metody badawcze:

1. Izolacja DNA grzyba *Cronartium ribicola*, sprawcy rdzy wejmutkowo-porzeczkowej, trzema metodami: i) opartą o odczynnik CTAB (Doyle i Doyle, 1990), ii) zestaw komercyjny GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit firmy EURx, iii) zestaw Genomic Mini, firmy A&A Biotechnology.
2. Zastosowanie techniki 'odcisku palca' – wybór starterów do reakcji ISSR PCR i optymalizacja warunków reakcji.
3. Zastosowanie techniki 'odcisku palca' – wybór starterów do reakcji RAPD i optymalizacja warunków reakcji.
4. Zastosowanie techniki 'odcisku palca' – wybór enzymów restrykcyjnych przygotowujących DNA do reakcji PCR MP i optymalizacja warunków reakcji.
5. Ocena podatności badanych genotypów na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, w 2 terminach, przy użyciu skali bonitacyjnej (0-5).
6. Ocena przydatności czterech par starterów (P1/P2, P5/P6, P9/P10, P16/BCP9) specyficznych dla wirusa rewersji (BRV).
7. Badania genotypów porzeczki czarnej metodą RT-PCR na obecność BRV, z wykorzystaniem dwóch par starterów (P5/P6 i P9/P10) oraz BCICaV i RAVA.



Fot. 1. Objawy na liściu rdzy wejmutkowo-porzeczkowej (*C. ribicola*).



Fot. 2. Objawy rewersji BRV na pąkach (A) i liściach (B).

Tabela 1. Stężenie oraz parametry czystości DNA izolowanego z urediniospor oraz teliospor patogena *C. ribicola* z zastosowaniem trzech procedur izolacji DNA.

Nazwa próbki	Stężenie w ng/μl	Widmo w dł fali 260/280	Widmo w dł fali 260/230	Metoda izolacji	
Uredinia1	27,80	2,20	0,5	GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx)	
Uredinia2	94,47	2,13	1,29		
Uredinia3	21,25	1,81	0,46		
Telia1	8,78	2,29	0,32		
Telia2	11,73	1,81	0,34		
Telia3	15,30	2,32	0,47		
Uredinia1	482,01	1,91	1,29		CTAB
Uredinia2	306,14	2,02	1,17		
Uredinia3	324,23	2,09	1,63		
Telia1	140,24	1,72	1,66		
Telia2	263,90	2,00	1,35		
Telia3	205,50	2,80	1,27		
Uredinia1	19,49	1,21	0,18	Genomic Mini (A&A Biotechnology)	
Uredinia2	21,56	1,48	0,2		
Uredinia3	22,92	1,65	0,28		
Telia1	5,31	1,13	0,1		
Telia2	4,91	2,80	0,3		
Telia3	4,22	3,03	0,29		

Najbardziej wydajnym sposobem izolacji DNA, pozwalającym na uzyskanie dużej ilości DNA o wysokiej jakości i czystości z takiej samej ilości materiału wyjściowego, była metoda oparta o odczynnik CTAB (tab. 1).

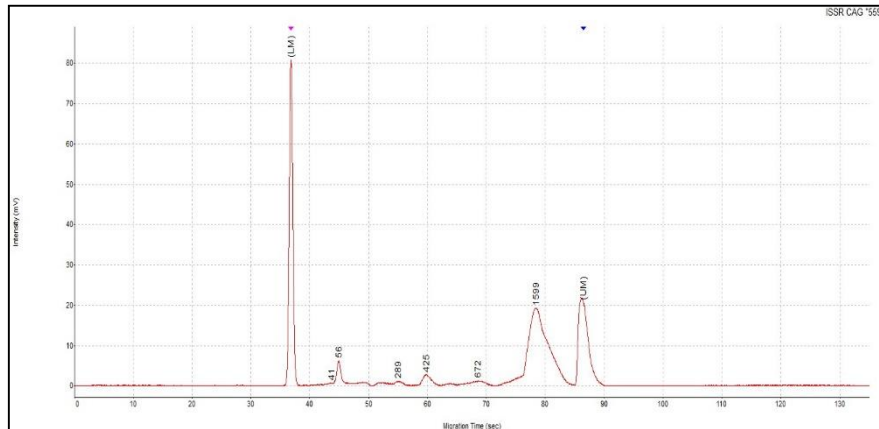
Wybór starterów do reakcji ISSR PCR oraz RAPD PCR i optymalizacja warunków reakcji

- Zależnie od zastosowanych warunków i starterów, uzyskiwano brak produktów reakcji, pojedyncze produkty na próbę lub nadmiar produktów (produkty obecne, lecz nie do odczytu) lub od 4 do 7 wyraźnych produktów. Ze względu na ilość i wielkość otrzymanych produktów, ostatecznie wybrano pięć starterów ISSR - $(GTC)_6$, $(GGAT)_4$, $(CAG)_5$, $(GACA)_4$ i $(GACAC)_3$ oraz trzy startery RAPD: OPT-07, OPC-05 i OPE-14.

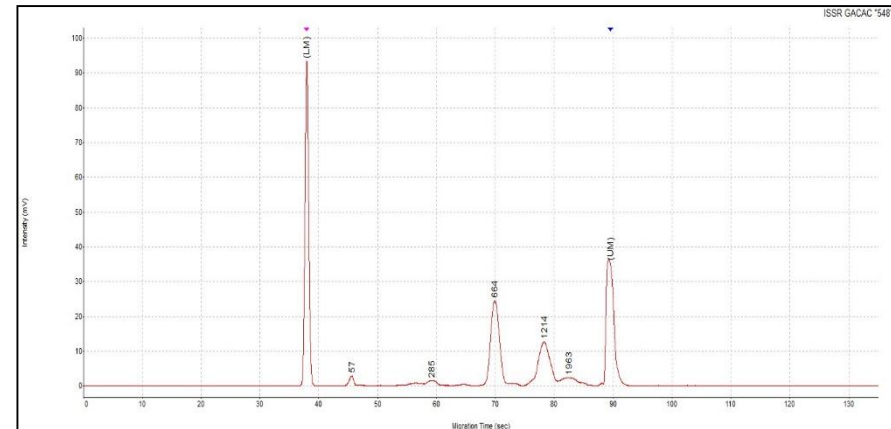
Wybór enzymów restrykcyjnych do reakcji PCR MP i optymalizacja warunków reakcji

- Na podstawie uzyskanych wyników jako optymalne, tj. pozwalające na uzyskanie wielu produktów o odczytywalnej wielkości dla badanego DNA, wybrano enzymy *Bam*HI, *Hind*III i *Bgl*I. Zastosowanie zoptymalizowanych warunków z wykorzystaniem wymienionych enzymów i starterów do nich w reakcji PCR MP pozwoliło na uzyskanie: 3 dla układu *Hind*III-PCR MP, 6 dla układu *Bgl*I-PCR MP oraz 9 dla układu *Bam*HI-PCR MP wyraźnych produktów. Pozostałe badane układy dawały nieczytelne wyniki, dlatego też zostały odrzucone.

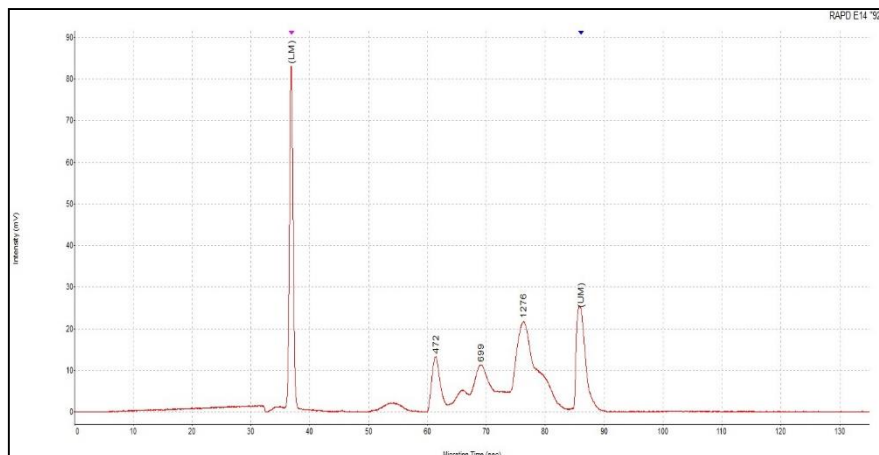
Przykładowe elektroforegramy, pokazujące rozdział produktów po reakcji ISSR PCR, RAPD PCR oraz PCR MP, z użyciem systemu MultiNA (rys. 1-4).



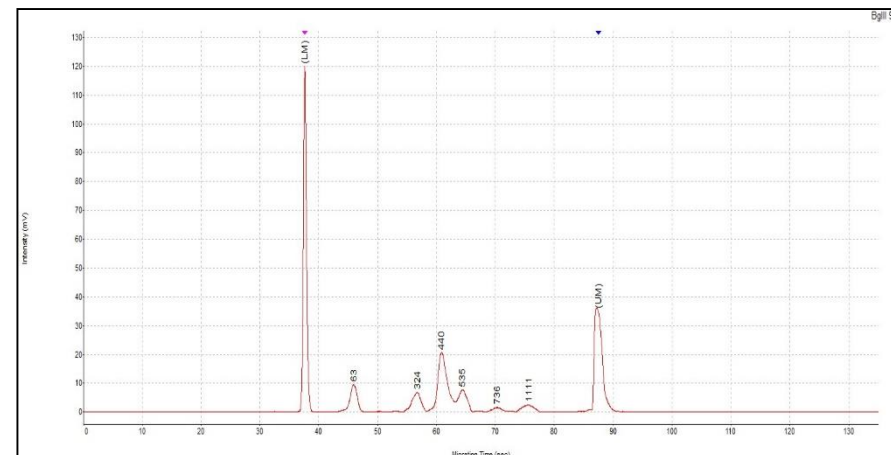
Rys. 1. Produkty uzyskane w reakcji ISSR PCR ze starterem (CAG)₅.



Rys. 2. Produkty uzyskane w reakcji ISSR PCR ze starterem (GACAC)₃.



Rys. 3. Produkty uzyskane w reakcji RAPD PCR ze starterem OPE-14



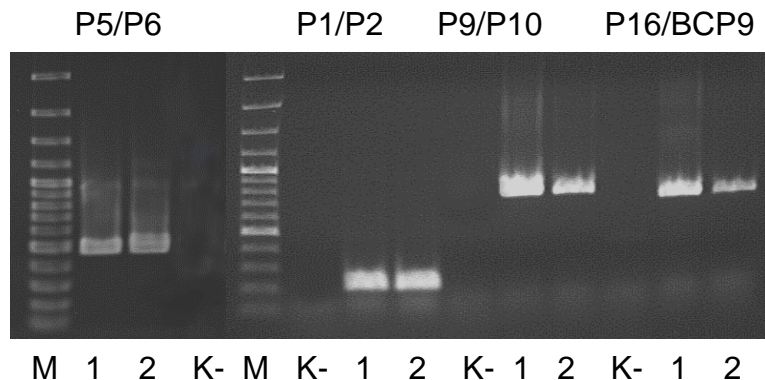
Rys. 4. Produkty uzyskane w reakcji PCR MP po cięciu DNA enzymem BglII

Tabela 1. Podatność wybranych genotypów porzeczki czarnej na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, w hodowlanej kolekcji odmian, Skierniewice, 2021 r.

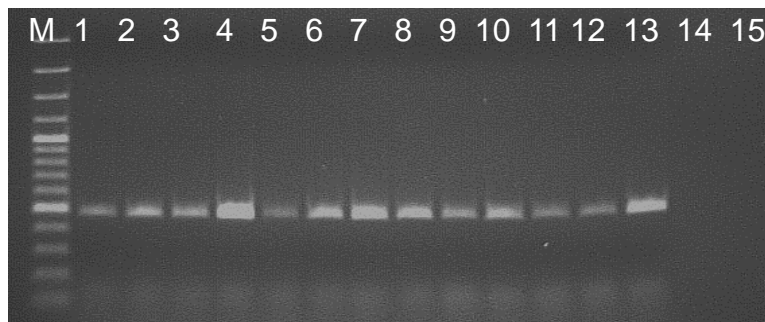
Lp.	Genotyp	Kraj pochodzenia	Stopień porażenia przez <i>C. ribicola</i> wg skali bonitacyjnej (0-5)*	
			1. termin oceny 06.08.2021	2. termin oceny 07.09.2021
1	Andega	Francja	0,00 a	1,00 b**
2	Ben Tirran	Szkocja	0,00 a	0,00 a
3	Ben Tron	Szkocja	0,00 a	0,00 a
4	Gofert	Polska	0,00 a	0,00 a
5	Imandra	Rosja	0,00 a	0,00 a
6	Sunderbyn II	Szwecja	0,00 a	0,00 a
7	Tihope	Polska	0,00 a	0,00 a
8	Tsema	Holandia	0,00 a	0,00 a
9	Ruben	Polska	0,00 a	0,00 a
10	Tiben	Polska	0,00 a	0,60 ab
11	Bona	Polska	0,00 a	0,00 a
12	Elo	Estonia	0,00 a	0,33 ab
13	Ores	Polska	0,00 a	0,00 a
14	Polares	Polska	0,00 a	0,00 a
15	Polben	Polska	0,00 a	0,00 a
16	Polonus	Polska	0,00 a	0,00 a
17	Tiben	Polska	0,00 a	0,00 a
18	Tisel	Polska	0,00 a	0,40 ab
19	Ruben	Polska	0,00 a	0,00 a
20	9A/9	Polska	0,00 a	0,00 a
21	12D/4	Polska	0,00 a	0,70 ab
22	12D/40	Polska	0,00 a	0,00 a
23	PC-797	Polska	0,00 a	0,00 a
24	PC-811	Polska	0,00 a	0,13 ab
25	PC-825	Polska	0,00 a	0,00 a
26	PC-778	Polska	0,00 a	0,00 a
27	PC-13B/11	Polska	0,00 a	0,00 a
28	26/1/1	Szkocja	0,00 a	0,00 a
29	Titania	Szwecja	0,00 a	0,00 a
30	Sanjuta	Ukraina	0,00 a	0,00 a

- W pierwszym terminie oceny, (pocz. sierpnia 2021 r.), na liściach testowanych genotypów nie stwierdzono objawów tej choroby.
- W drugim terminie oceny (pocz. września 2021 r.), słabe objawy choroby (stopień porażenia od 0,13 do 1,0) stwierdzono na roślinach 4 odmian ('Andega', 'Tiben', 'Elo', 'Tisel') oraz 2 klonów hodowlanych (12D/4 i PC-811).

* 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.



Rys. 1. Elektroforegramy produktów RT-PCR dla wybranych genotypów porzeczek czarnej z 4 parami starterów specyficznych dla BRV. M-marker wielkości, 1- 'Ben Tron' I/6, 2 - 'Bona' 24, K- zdrowa roślina.



Rys. 2. Przykład elektroforegramów produktów RT-PCR dla genotypów porzeczek czarnej ze starterami P5/P6. M-marker wielkości, 1- Ben Tron I/6, 2 - Bona 24, 3 - Ben Kliberk 53, 4 - Ben Lomond 31, 5 - Moka 74, 6 - Ben Alder 81, 7 - Ben Tirran 82; 8 - Ben Connan 87, 9 - Tiben 3/6, 10 - Docka 92, 11 - Ojebyn 62, 12 - Rjasnaja 54, 13 - Intercontinental 94, 14 - zdrowa roślina, 15 - woda

- ❖ Badania wykazały przydatność wszystkich czterech par starterów: P1/P2, P5/P6, P9/P10 i P16/BCP9, do wykrywania wirusa rewersji porzeczek czarnej metodą RT-PCR (**Rys.1**).
- ❖ Łącznie wykonano 300 testów na obecność wirusa rewersji porzeczek czarnej w 30 genotypach porzeczek czarnej (po pięć roślin każdego genotypu).
- ❖ Dla 28 prób uzyskano pozytywny wynik testów RT-PCR ze starterami P1/P2 i P5/P6 (**Rys. 2**).
- ❖ W żadnej z 20 losowo wybranych roślin nie wykryto *Blackcurrant leaf chlorosis virus* (BCICaV) i *Blackcurrant virus A* (RAVA).

1. Na podstawie parametrów czystości i jakości DNA uzyskanego w ramach optymalizacji metody izolacji DNA grzyba *C. ribicola* stwierdzono, że najbardziej wydajną i skuteczną metodą izolacji DNA jest metoda bazująca na odczynniku CTAB.
2. W ramach optymalizacji metod 'odcisku palca', wśród przetestowanych starterów RAPD najlepsze efekty uzyskano dla starterów: OPT-07, OPC-05 i OPE-14.
3. W ramach optymalizacji metod 'odcisku palca', wśród przetestowanych starterów ISSR najlepsze efekty uzyskano dla starterów: (GTC)₆, (GGAT)₄, (CAG)₅, (GACA)₄ i (GACAC)₃.
4. W ramach optymalizacji metod 'odcisku palca', wśród przetestowanych enzymów restrykcyjnych w metodzie PCR MP, najlepsze efekty uzyskano dla enzymów *Bam*HI, *Hind*III i *Bg*II.
5. Spośród trzech testowanych metod 'odcisku palca' największy potencjał do badania polimorfizmu u szczepów grzyba *C. ribicola* wykazała metoda PCR MP z wykorzystaniem enzymu *Bam*HI.
6. W sezonie 2021 nasilenie rdzy wejmutkowo-porzeczkowej na roślinach testowanych genotypów porzeczki czarnej było stosunkowo niskie.
7. Pierwsze objawy tej choroby na liściach ocenianych odmian i klonów hodowlanych pojawiły się dopiero na początku września 2021 r.
8. Słabe objawy choroby stwierdzono na 6 spośród 30 ocenianych genotypów.
9. Wykrycie BRV w 28 spośród 150 badanych roślin porzeczki czarnej, wskazuje na obecność potencjalnego źródła wirusa w kolekcji odmian i prawdopodobieństwo jego rozprzestrzeniania za pośrednictwem wielkopąkowca porzeczkowego.
10. Próby z losowo wybranych 20 roślin porzeczki czarnej były wolne od BCIV i BCVA, co jednak nie wyklucza porażenia przez te wirusy pozostałych krzewów rosnących w hodowlanej kolekcji odmian ZHRO.