

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 Monika Michalecka, dr. Aleksandra Trzewik, dr Wojciech Piotrowski, dr Łukasz Seliga, dr Mariusz Lewandowski, dr. Marek Szymajda, mgr Jolanta Kubik, inż. Alicja Klepaczka, Dorota Starzec, Barbara Sobieszek, Patrycja Rakowska, Agnieszka Budzałek, Dominik Budynek, 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.

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 rosnące w doświadczeniu polowym – Fot. 3.



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).



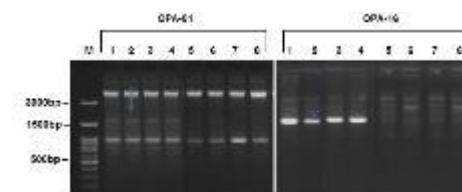
Fot. 3. Rośliny porzeczki czarnej rosnące w doświadczeniu polowym

II. Metody badawcze:

1. Izolacja DNA grzyba *Cronartium ribicola*, sprawcy rdzy wejmutkowo-porzeczkowej (Fot. 4) 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*) (Fot. 5)
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. 6)



Fot. 4. Rdza wejmutkowo-porzeczkowa (*C. ribicola*) na liściu porzeczki czarnej.

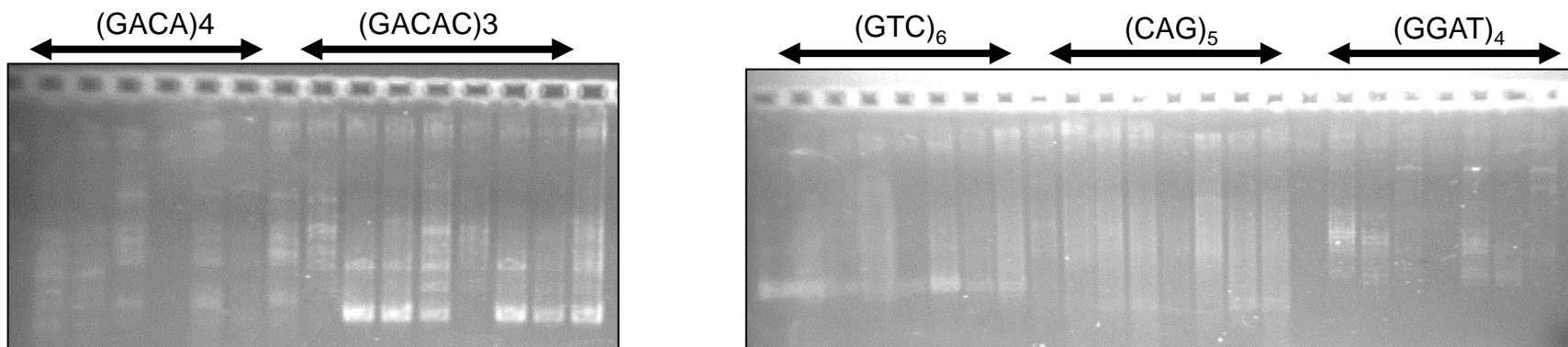


Fot. 5. Profile prążkowe otrzymane przy użyciu starterów OPA-01, OPA-16 dla odpornych i wrażliwych genotypów .

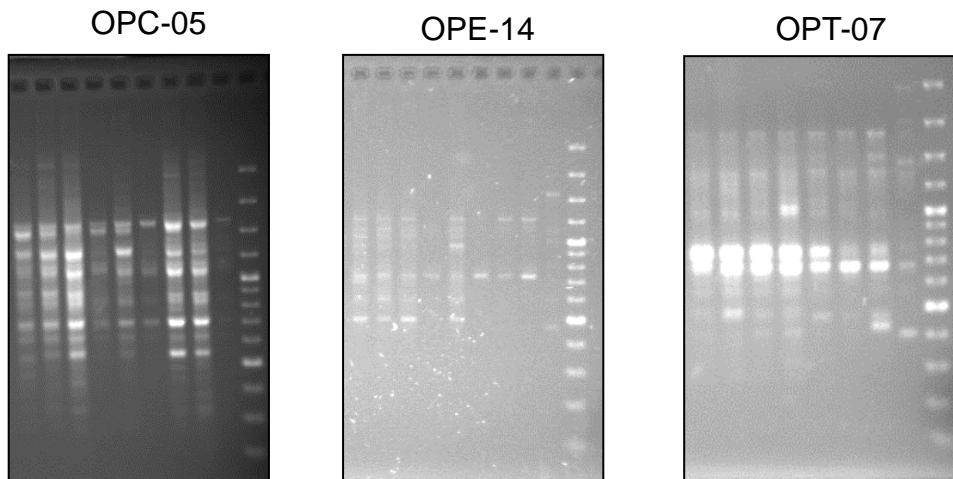


Fot. 6. Objawy porażonych pąków porzeczki czarnej przez wielkopąkowca porzeczkowego.

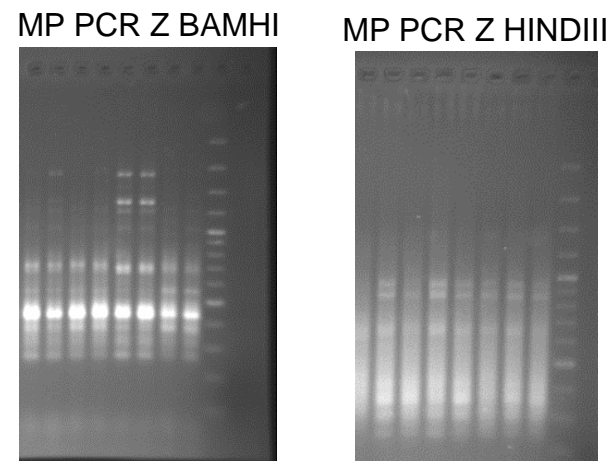
Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów po reakcji ISSR (5):



po reakcji RAPD (3):

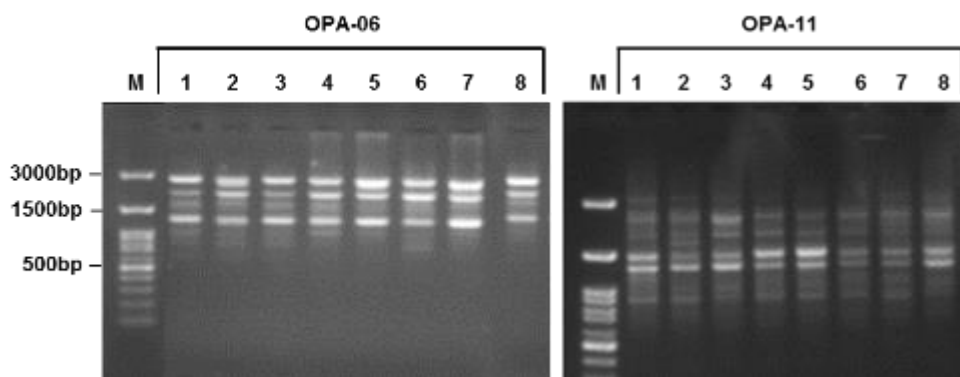


po reakcji MP PCR (2):

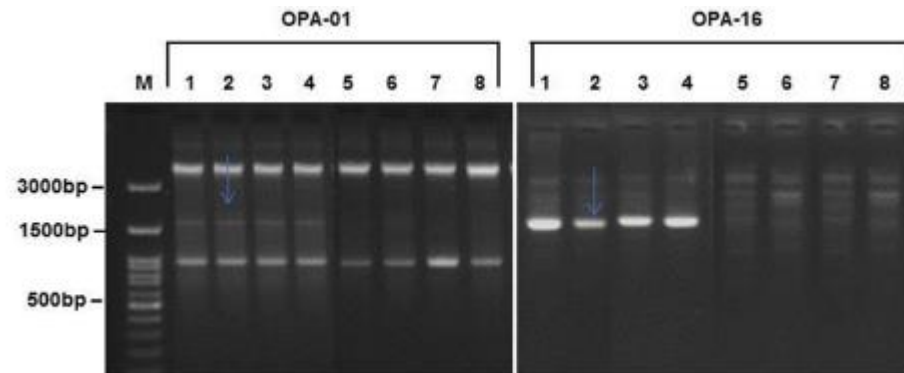


WYNIKI – Temat badawczy 2

Nie otrzymano specyficznych produktów amplifikacji z żadnym z 21 par testowanych starterów SSR. Produkty amplifikacji uzyskano na preparatach DNA badanych genotypów porzeczki czarnej w reakcjach 25 spośród 32 testowanych starterów RAPD. Nie uzyskano produktów amplifikacji przy zastosowaniu 7 starterów. W reakcjach z 23 starterami otrzymano produkty, które występowały zarówno u genotypów wrażliwych, jak i odpornych na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (**Fot. 1**). Dwa spośród testowanych starterów RAPD (OPA-1, OPA-16) generowało prążki różnicujące genotypy wrażliwe i odporne na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (**Fot. 2**). Różnicujące prążki otrzymane przy wykorzystaniu starterów OPA-1, OPA-16 dla roślin porzeczki czarnej odpornych na rdzę wejmutkowo-porzeczkową w kolejnych etapach badań poddane będą analizie w kierunku ich przydatności jako markera odporności na tę chorobę.



Fot. 1. Profile prążkowe otrzymane przy użyciu starterów OPA-06, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-13, OPA-15, OPA-18, OPA-19 dla roślin porzeczki czarnej odpornej: 1 – PC 36, 2 – PC-778, 3 – 12D/40, 4 – Polonus, wrażliwej: 5 – Narve Viking, 6 – Tiben, 7 – Polben, 8 – PC46/2022, M – wzorzec wielkości fragmentów DNA 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Nippon Genetics).



Fot. 2. Profile prążkowe otrzymane przy użyciu starterów OPA-01, OPA-16, dla roślin porzeczki czarnej odpornej: 1 – PC 36, 2 – PC-778, 3 – 12D/40, 4 – Polonus, wrażliwej: 5 – Narve Viking, 6 – Tiben, 7 – Polben, 8 – PC46/2022, M – wzorzec wielkości fragmentów DNA 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Nippon Genetics). Niebieska strzałka – prążki różnicujące.

WYNIKI – Temat badawczy 3

Tabela 1. Tabela 1. Podatność wybranych genotypów porzeczki czarnej na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, Skierniewice, 2023 r. (średnie wyniki z 5 roślin/powtórzeń)

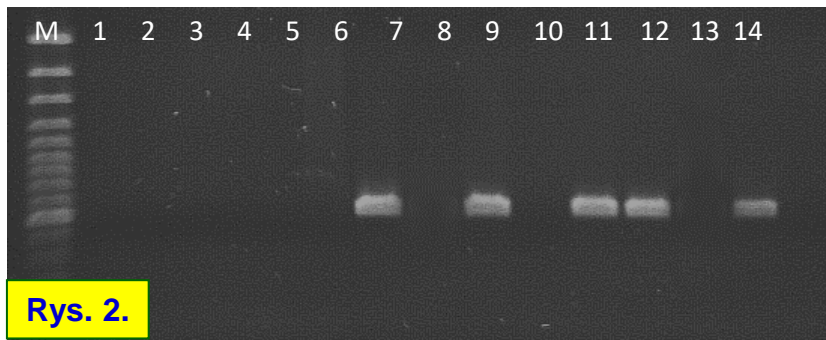
Lp.	Genotyp	Kraj pochodzenia	Stopień porażenia przez <i>C. ribicola</i> wg. skala bon. (0-5)A
1	Andega	Francja	2,8 de*
2	Ben Tirran	Szkocja	1,2 bc
3	Ben Tron	Szkocja	2,8 de
4	Bona	Polska	2,4 d
5	Elo	Estonia	1,2 bc
6	Gofert	Polska	2,0 cd
7	Imandra	Rosja	3,2 def
8	Narve Viking	Norwegia	3,8 ef
9	Ores	Polska	3,2 def
10	Polares	Polska	2,0 cd
11	Polben	Polska	2,0 cd
12	Polonus	Polska	0,6 ab
13	Ruben	Polska	2,4 d
14	Sanjuta	Ukraina	0,0 a
15	Sunderbyn II	Szwecja	3,8 ef
16	Tiben	Polska	2,6 d
17	Tihope	Polska	2,5 d
18	Tisel	Polska	2,0 cd
19	Titania	Szwecja	0,8 ab
20	Tsema	Holandia	4,0 f
Średnia ogólna			2,3

1. Testowane odmiany różnią się istotnie pod względem stopnia porażenia liści przez grzyb *C. ribicola*.
2. Na roślinach tylko jednej odmiany ('Sanjuta') nie zaobserwowano żadnych objawów rdzy wejmutkowo-porzeczkowej. Rośliny czterech odmian: 'Ben Tirran', 'Elo', 'Polonus' i 'Titania' były w niewielkim stopniu porażone przez tego patogena.
3. Polskie odmiany, które w warunkach polowych wykazywały małą podatność na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, w wyniku sztucznej inokulacji, były w średnim stopniu, porażone przez *C.ribicola*.

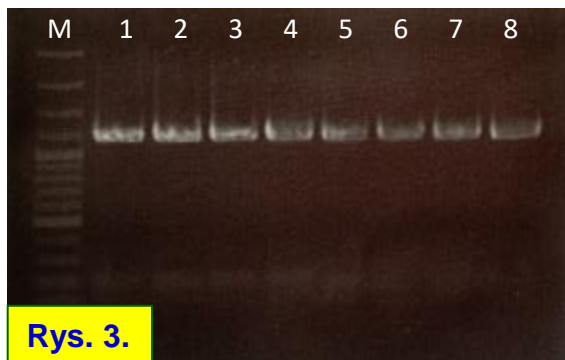
A - skala bonitacyjna 0-5, w której 0 - liście zdrowe, 1 = 1-3% powierzchni liści porażonej przez grzyb, 2 = 3-10%, 3 = 10-30%, 4 = 30-50%, 5- powyżej 50% powierzchni porażonej przez grzyb



Rys. 1. Przykład elektroforogramu produktów reakcji RT-PCR uzyskanych dla analizowanych genotypów porzeczek czarnej ze starterami BCIdaeoRNA1F1/BCIdaeoR2 specyficznymi dla *Blackcurrant leaf chlorosis virus*. M-marker wielkości, 1 - Ben Kliberk' 53; 2 - 'Ben Lomond' 31; 3 - 'Moka' 74; 4 - 'Ben Alder' 81; 5 - 'Tiben' 3/6; 6 - 'Vospaninnaja' 78; 7 - 'Foxendown' 18; 8 - 'Polares' 10; 9 - 'Ben Tiran' 82; 10 - 'Ben Finlay' 43; 11 - 'Croma'; 12 - 'Worchesterberry'.



Rys. 2. Przykład elektroforogramu produktów reakcji RT-PCR uzyskanych dla analizowanych genotypów porzeczek czarnej ze starterami BCIdaeoRNA1F2/BCIdaeoR2 specyficznymi dla *Blackcurrant leaf chlorosis virus*. M-marker wielkości, 1 - Ben Kliberk' 53; 2 - 'Ben Lomond' 31; 3 - 'Moka' 74; 4 - 'Ben Alder' 81; 5 - 'Tiben' 3/6; 6 - 'Ben Tron' 1/6; 7 - 'Bona' 24; 8 - 'Polares' 10; 9 - 'Ben Tiran' 82; 10 - 'Foxendown' 18; 11 - 'Ben Finlay' 43; 12 - 'Ben Grain' 14; 13 - 'Docka' 92; 14 - kontrola negatywna (zdrowa roślina).



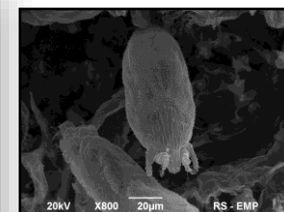
Rys. 3. Przykład elektroforogramu produktów reakcji RT-PCR uzyskanych dla analizowanych genotypów porzeczek czarnej ze starterami własnymi BCICaV1184MP-F/BCICaV1184MP-R (próby 1, 2, 3, 4) oraz BCICaV1176CP-F/BCICaV1176CP-R (próby 5, 6, 7, 8) specyficznymi dla *Blackcurrant leaf chlorosis virus*. M-marker wielkości, 1 - 'Ben Tron' 1/6; 2 - 'Vospaninnaja' 78; 3 - 'Foxendown' 18; 4 - 'Ben Finlay' 43; 5 - 'Ben Tron' 1/6; 6 - 'Vospaninnaja' 78; 7 - 'Foxendown' 18; 8 - 'Ben Finlay' 43.

WYNIKI – Temat badawczy 5

Lp.	Genotyp	Kraj pochodzenia	Stopień zasiedlenia pąków przez wielkopąkowca porzeczkowego		
			Wiosna	Jesień	Średnia roczna
			10.04.2023	10.10.2023	
1	Andega	Francja	0	0,0	0,0
2	Ben Tirran	Szkocja	0	0,0	0,0
3	Ben Tron	Szkocja	0	0,0	0,0
4	Gofert	Polska	0	0,2	0,1
5	Imandra	Szwecja	0	0,0	0,0
6	Sunderbyn II	Szwecja	0	0,0	0,0
7	Tihope	Polska	0	0,2	0,1
8	Tsema	Holandia	0	0,0	0,0
9	Ruben	Polska	0	0,3	0,1
10	Tiben	Polska	0	0,1	0,1
11	Bona	Polska	0	0,4	0,2
12	Elo	Estonia	0	0,0	0,0
13	Ores	Polska	0	0,1	0,1
14	Polares	Polska	0	0,0	0,0
15	Polben	Polska	0	0,1	0,1
16	Polonus	Polska	0	0,0	0,0
17	Tiben II	Polska	0	0,0	0,0
18	Tisel	Polska	0	0,3	0,1
19	Ruben II	Polska	0	0,0	0,0
20	9A/9	Polska	0	0,0	0,0
21	12D/4	Polska	0	0,0	0,0
22	12D/40	Polska	0	0,0	0,0
23	PC-797	Polska	0	0,0	0,0
24	PC-811	Polska	0	0,0	0,0
25	PC 825	Polska	0	0,0	0,0
26	PC-778	Polska	0	0,0	0,0
27	PC-13B/11	Polska	0	0,0	0,0
27	26/1/1	Szkocja	0	0,0	0,0
29	Titania	Szwecja	0	0,5	0,3
30	Sanjuta	Ukraina	0	0,0	0,0

Wielkopąkowiec porzeczkowy

- Uszkadza pąki i jest wektorem rewersji porzeczeki czarnej (Fot. 1)
- Małeńki szpeciel - 0.15 -0.25 mm, żeruje i zimuje w pąkach porzeczeki (Fot. 2)
- 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. 1. Uszkodzone pąki Fot. 2. Szpeciele na pąku

1. Największy poziom zróżnicowania badanych szczepów *C. ribicola* wśród zastosowanych metod uzyskano w metodzie ISSR PCR.
2. Analiza wyników grupowania badanych szczepów *C. ribicola* wskazuje na brak związku między genotypami szczepów, a odmianą czy lokalizacją plantacji, z której one pochodziły.
3. 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 wyższej w porównaniu do komercyjnego zestawu NucleoSpin® 96 Plant kit (Macherey-Nagel).
4. Dwa spośród 32 testowanych starterów RAPD generują prążki różnicujące genotypy odporne i wrażliwe na rdzę wejmutkowo-porzeczkową.
5. Metoda sztucznej inokulacji mieszaniną urediniosporów *C. ribicola* w warunkach szklarniowych okazała się skuteczna w fenotypowej ocenie porażenia testowanych genotypów porzeczek czarnej.
6. Testowane odmiany różnią się istotnie pod względem stopnia porażenia liści przez grzyb *C. ribicola*.
7. Na roślinach tylko jednej odmiany ('Sanjuta') nie zaobserwowano żadnych objawów rdzy wejmutkowo-porzeczkowej. Rośliny czterech odmian: 'Ben Tirran', 'Elo', 'Polonus' i 'Titania' były w niewielkim stopniu porażone przez tego patogena.
8. Polskie odmiany, które w warunkach polowych wykazywały małą podatność na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, w wyniku sztucznej inokulacji, były w średnim stopniu porażone przez *C. ribicola*.
9. Po raz pierwszy w Polsce wykryto *Blackcurrant leaf chlorosis virus*.
10. Wykrycie BCICaV w 8 spośród 40 badanych roślin porzeczek czarnej wskazuje na obecność potencjalnego źródła wirusa w kolekcji odmian i prawdopodobieństwo jego rozprzestrzeniania za pośrednictwem pyłku lub nasion.
11. Na młodych roślinach badanych genotypów porzeczek czarnej rosnących w doświadczeniu polowym zasiedlenie pąków przez wielkopąkowca porzeczkowego było na bardzo niskim poziomie.
12. Na krzewach kilku odmian porzeczek czarnej 'Bona', 'Gofert', 'Ores', 'Polben', 'Ruben', 'Tiben', 'Tihope', 'Tisel' i 'Titania' stwierdzono pojedyncze uszkodzone przez szpeciele pąki, zaś na pozostałych testowanych genotypach takich pąków jeszcze nie obserwowano.