

## 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](mailto: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, inż. Julia Trzcńska, Dorota Starzec, Aleksandra Supeł, Barbara Sobieszek, Patrycja Rakowska, Agnieszka Budzałek, Stanisław Bodek Leszek Skorupiński

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)

## 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)

## 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)



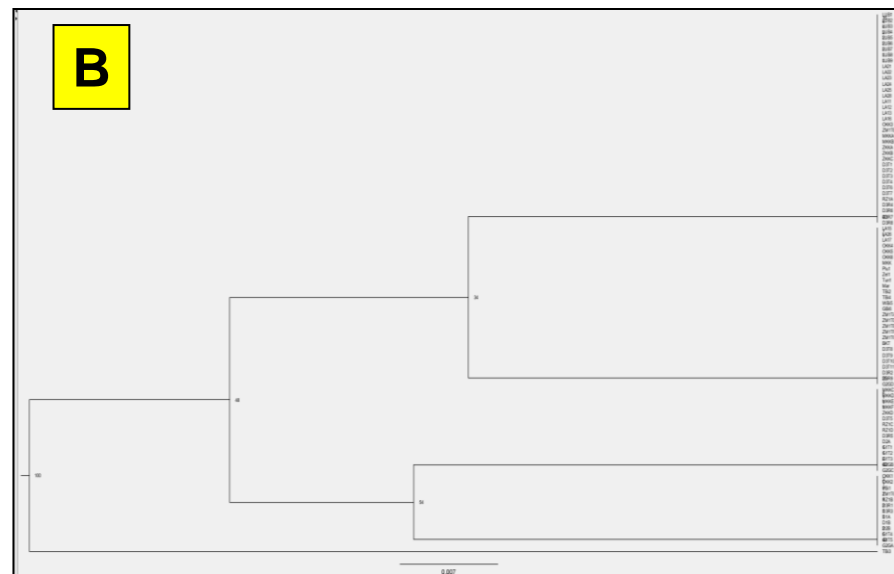
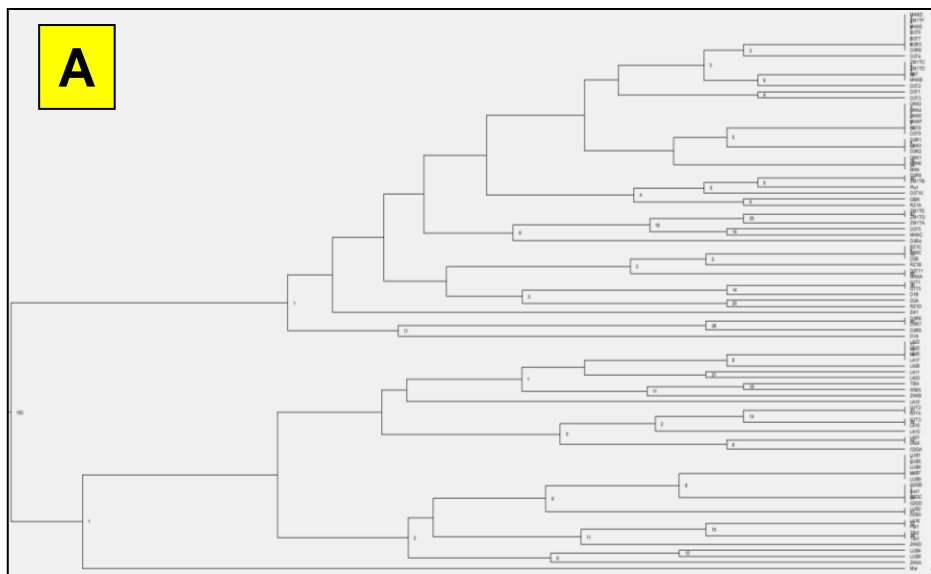
Fot. 3. Rdza wejmutkowo-porzeczkowa (*C. ribicola*) na liściu porzeczki czarnej.



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

# WYNIKI – Temat badawczy 1

- Zastosowane startery umożliwiły na uzyskanie **25** produktów reakcji o różnej długości w metodzie ISSR PCR, **20** produktów w metodzie RAPD PCR oraz **27** produktów w metodzie MP PCR.
- Największe zróżnicowanie pomiędzy szczepami *C. ribicola* uzyskano dla metody ISSR PCR (najwięcej odgałęzień i klastrów na dendrogramie **(Rys. 1A)**). Dużo mniejsze zróżnicowanie pomiędzy badanymi szczepami stwierdzono dla metody RAPD PCR **(Rys.1B)**. Zastosowanie metody MP PCR nie wykazało różnic między badanymi izolatami tego patogena.

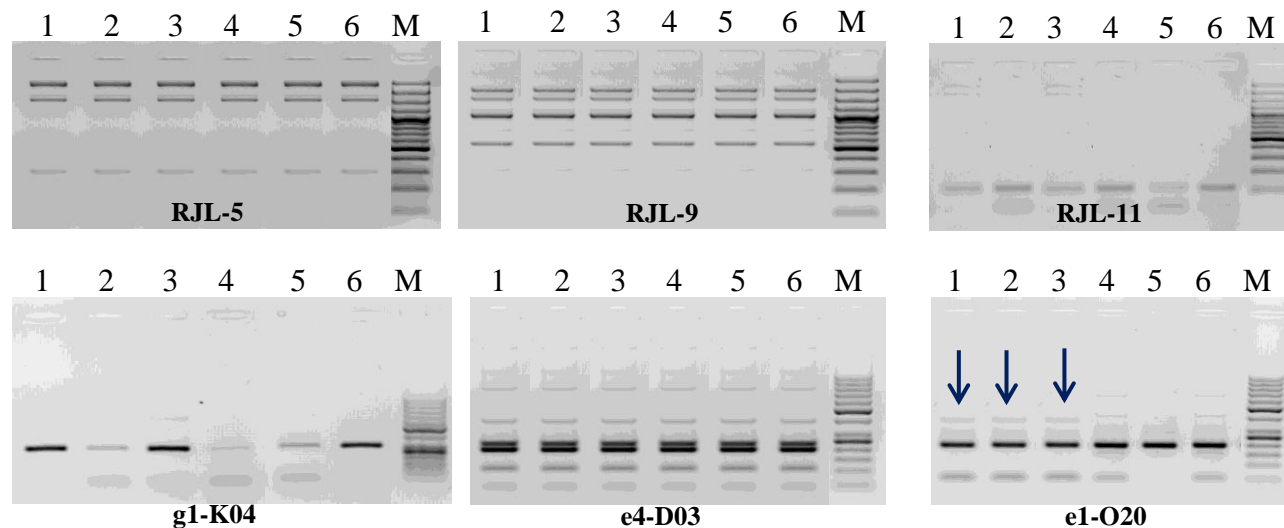


**Rys. 1.** Dendrogram zbudowany na podstawie polimorfizmu DNA wybranych izolatów *C. ribicola*, wykrytego w metodzie ISSR PCR (**A**) oraz w metodzie RAPD PCR (**B**)



# WYNIKI – Temat badawczy 2

Nie otrzymano powtarzalnych produktów amplifikacji z żadnym z 30 testowanych starterów RAPD. Produkty amplifikacji uzyskano na preparatach DNA badanych genotypów porzeczki czarnej w reakcjach 12 spośród 30 testowanych par starterów SSR. W reakcjach z 11 starterami otrzymano produkty, które występowały zarówno u genotypów wrażliwych, jak i odpornych na rdzę wejmutkowo-porzeczkową. Jedna spośród testowanych par starterów SSR generowała prążki różnicujące genotypy wrażliwe i odporne na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (Fot. 1). Produkty o wielkości ok. 400 bp otrzymane przy wykorzystaniu pary starterów e1-O20F/e1O20R dla roślin porzeczki czarnej odpornych na rdzę wejmutkowo-porzeczkową w kolejnych etapach badań poddane analizie w kierunku ich przydatności jako markera odporności na tę chorobę.



**Fot. 1.** Profile prążkowe otrzymane przy użyciu starterów SSR: RJL-5, RJL-9, RJL-11, g1-K04, e4-D03, e1-O20 dla roślin porzeczki czarnej odpornej: 1 – Ben Tirran, 2 – Gofert, 3 – Titania, wrażliwej: 4 – Ruben, 5 – Tihope, 6 – Tisel, M – wzorec wielkości fragmentów DNA Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)

# 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) <sup>A</sup> |
|-----------------------|--------------|------------------|---|
| 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   |
| <b>Średnia ogólna</b> |              |                  | <b>3,5</b>  |

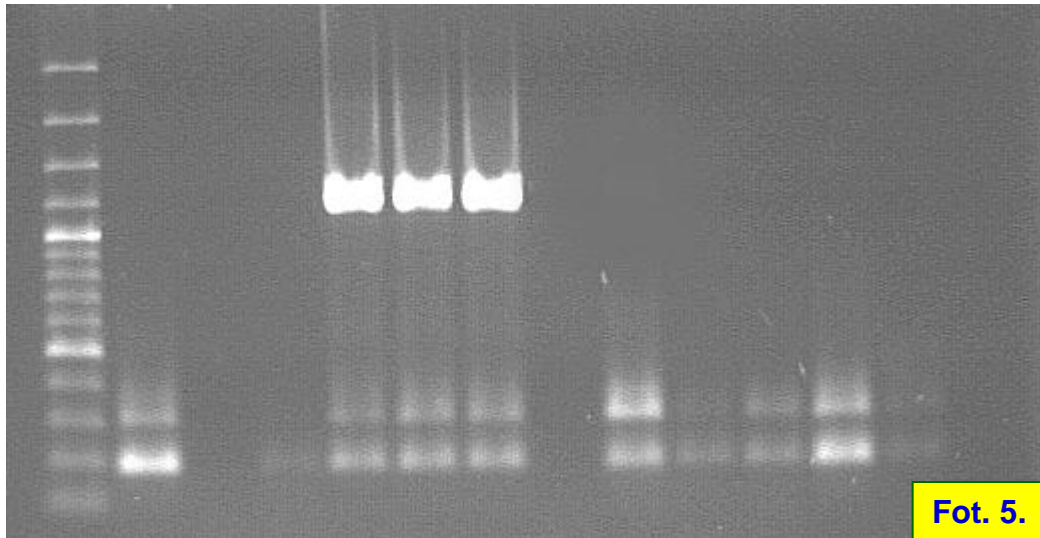
1. W warunkach sztucznej inokulacji zarodnikami grzyba *C. ribicola* średnie porażenie ocenianych genotypów porzeczki czarnej wynosiło 3,5 i zawierało się w przedziale od 0,0 do 5,0 wg 6-cio stopniowej skali bonitacyjnej (Tabela 2).
2. Dziewięć testowanych genotypów porażonych było w średnim stopniu (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  $p = 0,05$ .

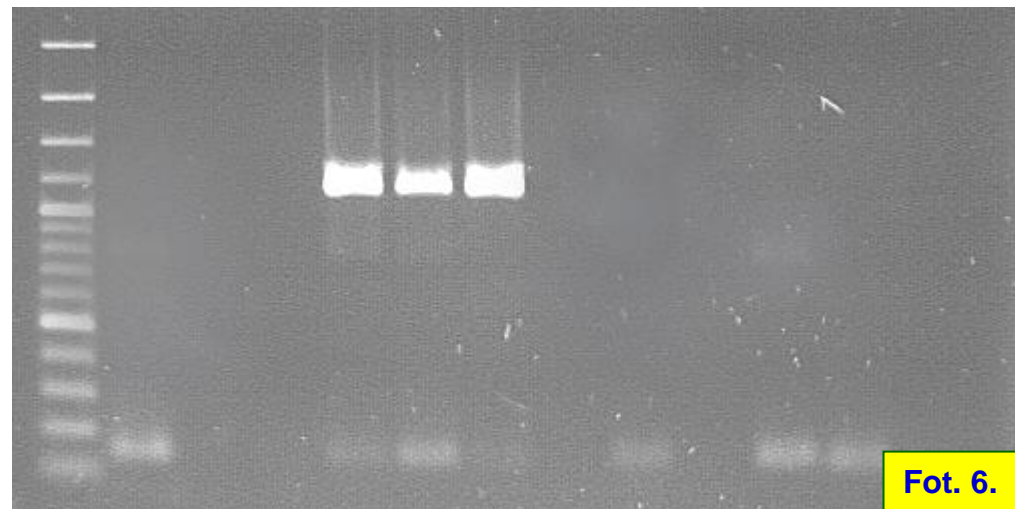
# WYNIKI – Temat badawczy 4

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. 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 porzeczki 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.
4. Jedna para spośród 30 testowanych par starterów SSR generowała prążki różnicujące genotypy porzeczki czarnej odporne i wrażliwe na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (*C. ribicola*).
5. Metoda sztucznej inokulacji mieszaniną urediniosporów *C. ribicola* w warunkach szklarniowych okazała się skuteczna w fenotypowej ocenie porażenia roślin testowanych genotypów porzeczki 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. Większość testowanych genotypów było w średnim stopniu porażonych przez tego patogena.
8. 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*.
9. Po raz pierwszy w Polsce wykryto *Blackcurrant leaf chlorosis virus* (BCLCaV).
10. Wykrycie BCLCaV w roślinach porzeczki 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 porzeczki.
11. W 2024 roku na krzewach ocenianych genotypów porzeczki czarnej rosnących w doświadczeniu polowym zagrożenie ze strony wielkopąkowca porzeczkowego kształtowało się na średnim poziomie.
12. Na genotypach porzeczki czarnej takich jak 'Ben Tiran', 'Sunderbyn II', 'Tsema', 'Elo', 'Ores', 'Polares' i 'Sanjuta' nie notowano pąków uszkodzonych przez wielkopąkowca porzeczkowego.
13. Większość testowanych genotypów porzeczki czarnej należy do grupy odpornych na tego szkodnika.
14. Najwięcej zasiedlonych przez szpeciele pąków stwierdzono na krzewach dwóch genotypów: 'Bona' i PC 811.
15. Pod mikroskopem w uszkodzonych przez szpeciele pąkach znaleziono liczne osobniki wielkopąkowca porzeczkowego.