

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

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



CELE PROJEKTU

- Opracowanie markerów molekularnych genów odporności wybranych genotypów porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (*C. ribicola*) – cel osiągnięty.
- Optymalizacja warunków metody sztucznego zakażania roślin porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) urediniosporami grzyba *C. ribicola* w warunkach szklarniowych – cel osiągnięty.
- Testowanie roślin wybranych genotypów porzeczki czarnej na obecność *blackcurrant leaf chlorosis virus* (BClCaV) i *Ribes americanum virus A* (RAVA) z wykorzystaniem techniki RT-PCR oraz przeprowadzenie analizy sekwencji i analizy filogenetycznej wykrytych izolatów BCIV i BCVA – cel osiągnięty.
- Ocena polowej podatności genotypów porzeczki czarnej na zasiedlenie przez wielkopąkowca porzeczkowego w warunkach naturalnej presji szpecielu oraz zebranie uszkodzonych przez szkodnika pąków w celu potwierdzenia w nich obecności żywych szpecieli – cel osiągnięty.

MATERIAŁY I METODY (1)

I. Materiał badawczy:

1. Liście z widocznymi objawami rdzy wejmutkowo-porzeczkowej (*C. ribicola*) w postaci rdzawych skupień urediniospor na dolnej stronie blaszki liściowej (Fot. 1), zebrane z 20 wybranych genotypów porzeczki czarnej
2. Krzewy rosnące w doświadczeniu oraz na plantacjach towarowych porzeczki czarnej zlokalizowanych w województwie łódzkim (SD Dąbrowice i Miedniewice) i lubelskim (Klementowice, Karmanowice i okolice) – 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 porzeczki czarnej



Fot. 2. Chlorotyczna blaszka liściowa porzeczki czarnej na plantacji w rejonie Klementowic (woj. lubelskie)

MATERIAŁY I METODY (2)

II. Metody badawcze:

1. Opracowanie markerów molekularnych (RAPD i SSR) genów odporności wybranych genotypów porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (*Cronartium ribicola*).

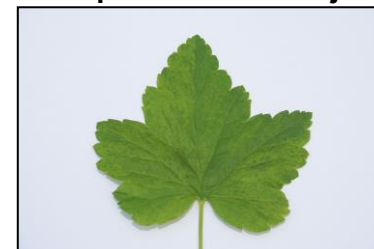
2. Optymalizacja warunków oraz opracowanie metody sztucznego zakażenia roślin porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) urediniosporami grzyba *C. ribicola* w warunkach szklarniowych (Fot. 3).

3. Testowanie roślin wybranych genotypów porzeczki czarnej na obecność *Blackcurrant leaf chlorosis virus* (BCLCaV) związanego z chlorozą porzeczki czarnej i *Ribes americanum virus A* (RAVA) powodujący deformację liści (Fot. 4).

4. Ocena polowej podatności genotypów porzeczki czarnej na zasiedlenia przez wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*) w warunkach naturalnej presji szpeciela (Fot. 5).



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



Fot. 4. Chloroza na liściu porzeczki czarnej testowanej na obecność BCLCaV.



Fot. 5. Objawy porażonych pąków porzeczki czarnej przez wielkopąkowca porzeczkowego.

WYNIKI – Temat badawczy 1

Tabela 1. Stężenie oraz wartości współczynników 260/280 nm, 260/230 nm preparatów DNA wyizolowanych z liści 20 genotypów porzeczki czarnej, Skierniewice, 2025 r.

Lp.	Genotyp	Zmodyfikowana metoda Doyle'a i Doyle			Zestaw komercyjny NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel)		
		Stężenie DNA (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm	Stężenie DNA (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm
1	Polonus	113*	1,93*	1,97*	–	–	–
2	Tisel	104*	1,87*	1,99*	–	–	–
3	Polares	114*	1,95*	2,00*	–	–	–
4	Imandra	118*	1,95*	1,82*	–	–	–
5	Sanjuta	95*	1,82*	1,94*	–	–	–
6	Coronet	33	0,95	0,76	62	1,86	1,96
7	Consort	39	0,83	1,00	58	1,87	1,92
8	PC-13B/11	135*	1,90*	1,90*	–	–	–
9	12D/40	100*	1,99*	1,92*	–	–	–
10	PC-797	44	1,05	0,82	55	1,90	2,02
11	Bona	51	0,92	1,07	71	1,87	1,98
12	Polben	145*	1,90*	1,92*	–	–	–
13	Tiben	61	1,03	0,84	65	1,92	1,86
14	Ruben	99*	1,87*	1,90*	–	–	–
15	Elo	107*	1,93*	1,97*	–	–	–
16	Ores	122*	0,96*	0,93*	–	–	–
17	Narve Viking	97*	1,79*	2,01*	–	–	–
18	PC-05	60	1,91	1,07	65	1,98	1,89
19	PC-811	116*	1,93*	1,95*	–	–	–
20	PC-778	43	1,52	1,12	59	1,82	1,87

* preparaty DNA o stężeniu i czystości wystarczającej do analiz PCR

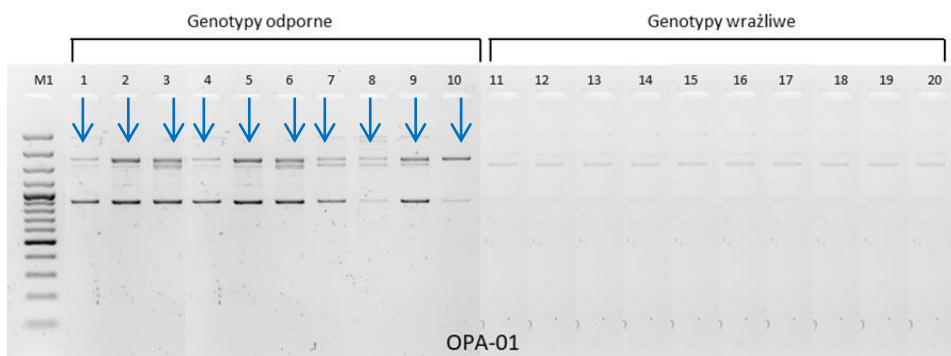
Metoda izolacji genomowego DNA z liści porzeczki czarnej wg Doyle i Doyle (1987) zmodyfikowana przez Trzewik i in. (2016) pozwoliła na otrzymanie preparatów DNA o stężeniu i czystości odpowiedniej do analiz PCR dla 13 z 20 badanych genotypów. Preparaty DNA o odpowiednim stężeniu i czystości dla 7 pozostałych genotypów otrzymano przy użyciu zestawu NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel) (Tabela 1).

W celu poszukiwania markerów odporności na rdzę wejmutkowo-porzeczkową przeprowadzono reakcje PCR z 30 starterami RAPD oraz 25 parami starterów SSR dla 20 wybranych genotypów porzeczki czarnej.

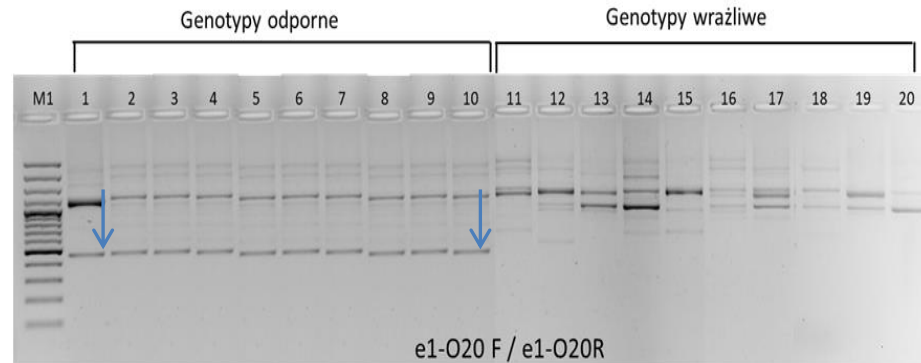
Przeprowadzono łącznie 2200 reakcji PCR, ze względu na trudności z otrzymaniem odpowiedniej ilości i jakości DNA trwają analizy elektroforetyczne.

WYNIKI – Temat badawczy 1

Produkty amplifikacji uzyskano na preparatach DNA badanych genotypów porzeczki czarnej w reakcjach 11 spośród 30 testowanych starterów RAPD. W reakcjach z 10 starterami otrzymano produkty, które występowały zarówno u genotypów wrażliwych, jak i odpornych na rdzę wejmutkowo-porzeczkową. Jeden spośród testowanych starterów RAPD – OPA-1 generował prążki o wielkości ok. 1600 pz różnicujące genotypy odporne i wrażliwe na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (Fot. 1). Produkty amplifikacji uzyskano na preparatach DNA badanych genotypów porzeczki czarnej w reakcjach 7 spośród 25 testowanych par starterów SSR. W reakcjach z 6 starterami otrzymano produkty, które występowały zarówno u genotypów wrażliwych, jak i odpornych na rdzę wejmutkowo-porzeczkową. Jedna spośród testowanych par starterów SSR (e1-O20F/e1O20R) generowała prążki o wielkości ok. 400 pz różnicujące genotypy odporne i wrażliwe na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (Fot. 2).



Fot. 1. Profile prążkowe otrzymane przy użyciu startera OPA-01 dla roślin porzeczki czarnej odpornej: 1 – Polonus, 2 – Tisel, 3 – Polares, 4 – Imandra, 5 – Sanjuta, 6 – Coronet, 7 – Consort, 8 – PC-13B/11, 9 – 12D/40, 10 – PC-797, wrażliwej: 11 – Bona, 12 – Polben, 13 – Tiben, 14 – Ruben, 15 – Elo, 16 – Ores, 17 – Narve Viking, 18 – PC-05, 19 – PC-811, 20 – PC-778 na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (*Cronartium ribicola*), M1 – wzorzec wielkości fragmentów DNA Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)



Fot. 2. Profile prążkowe otrzymane przy użyciu startera e1-O20F/e1-O20R dla roślin porzeczki czarnej odpornej: 1 – Polonus, 2 – Tisel, 3 – Polares, 4 – Imandra, 5 – Sanjuta, 6 – Coronet, 7 – Consort, 8 – PC-13B/11, 9 – 12D/40, 10 – PC-797, wrażliwej: 11 – Bona, 12 – Polben, 13 – Tiben, 14 – Ruben, 15 – Elo, 16 – Ores, 17 – Narve Viking, 18 – PC-05, 19 – PC-811, 20 – PC-778 na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, (*Cronartium ribicola*) M1 – wzorzec wielkości fragmentów DNA Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

WYNIKI – Temat badawczy 2

Tabela 2. Podatność wybranych genotypów porzeczki czarnej na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (*Cronartium ribicola*), Skierniewice, 2025 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	2,4 d-g
2	Ben Tirran	Szkocja	1,4 b-e
3	Gofert	Polska	2,6 e-h
4	Imandra	Rosja	1,8 cde
5	Sunderbyn II	Szwecja	3,8 hi
6	Tihope	Polska	2,2 c-f
7	Tsema	Holandia	4,0 i
8	Ruben	Polska	3,6 ghi
9	Tiben	Polska	3,6 ghi
10	Bona	Polska	3,3 f-i
11	Elo	Estonia	3,0 f-i
12	Polben	Polska	4,0 i
13	Tisel	Polska	1,4 b-e
14	Polonus	Polska	1,4 b-e
15	Polares	Polska	1,2 bcd
16	Ores	Polska	3,8 hi
17	Ben Tron	Szkocja	3,0 f-i
18	Narve Viking	Norwegia	3,2 f-i
19	PC-797	Polska	1,0 abc
20	PC-811	Polska	2,6 e-h
21	PC-778	Polska	2,4 d-g
22	PC-13B/11	Polska	0,4 ab
23	12D/40	Polska	1,2 bcd
24	26/1/1	Szkocja	2,4 d-h
25	PC-05	Polska	3,6 ghi
26	PC-32	Polska	0,4 ab
27	Titania	Szwecja	2,2 c-f
28	Sanjuta	Ukraina	0,0 a
29	Consort	Kanada	0,0 a
30	Coronet	Kanada	0,0 a
Średnia ogólna			2,2

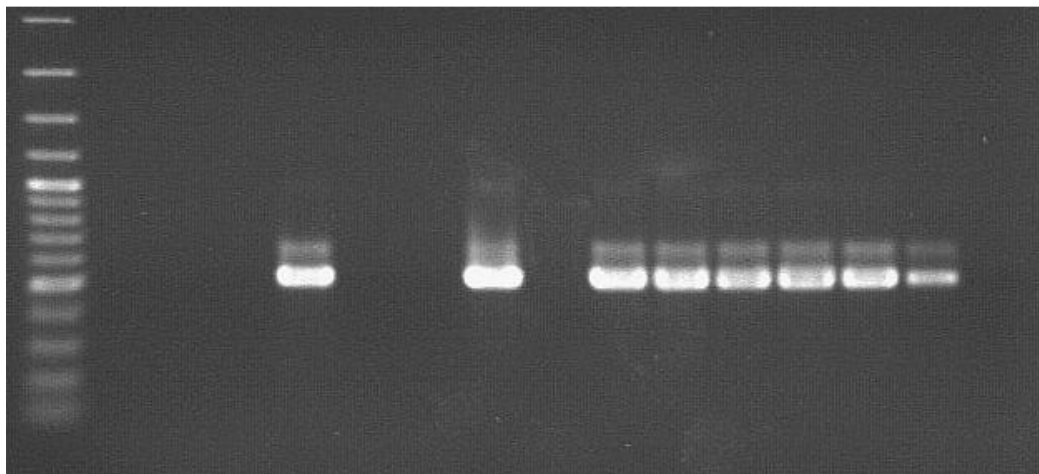
1. W warunkach sztucznej inokulacji zarodnikami grzyba *Cronartium ribicola* średnie porażenie 30 ocenianych genotypów porzeczki czarnej wynosiło **2,2** i zawierało się w przedziale od **0,0 do 4,0** wg skali bonitacyjnej 0-5 (Tabela 2).
2. Objawów rdzy wejmutkowo-porzeczkowej nie obserwowano na roślinach 3 odmian: **‘Sanjuta’** (Ukraina) oraz **‘Consort’** i **‘Coronet’** (Kanada).
3. Na roślinach dwóch genotypów polskiej hodowli, (**PC-13B/11** i **PC-32**) stwierdzono bardzo niskie nasilenie choroby (**0,4**).
4. Największe nasilenie (**3,6 - 4,0**) objawów tej choroby stwierdzono na roślinach **7 genotypów** (**‘Sunderbyn II’**, **‘Tsema’**, **‘Ruben’**, **‘Tiben’**, **‘Polben’**, **‘Ores’** i klonie hodowlany **PC-05**).

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.

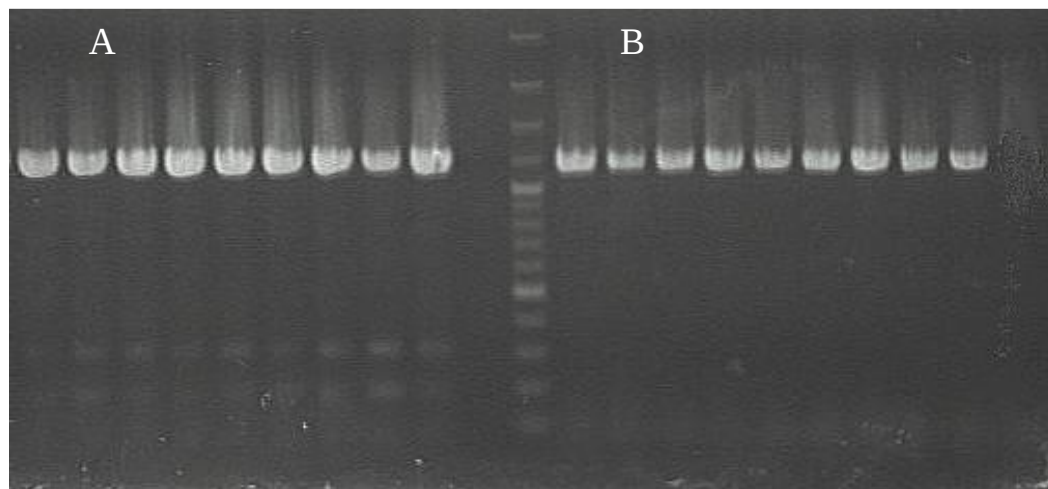
WYNIKI – Temat badawczy 3

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Fot. 6. Elektroforogram produktów reakcji RT-PCR uzyskanych dla prób porzeczki czarnej z kolekcji odmian w Dąbrowicach ze starterami BCIdaeoRNA2F1/BCIdaeoR2 specyficznymi dla fragmentu RNA2 *Blackcurrant leaf chlorosis associated virus*. **M** – marker wielkości; **1** – Ben Lomond 9; **2** – Ben Lomond 10; **3** – Ruben; **4** – Foxendown 1; **5** – Tisel; **6** – Tiben; **7** – Ores 3; **8** – Ores; **9** – Foxendown 2; **10** – Ores 4; **11** – Ojebyn 5; **12** – Ojebyn 6; **13** – Titania 7; **14** – Titania 8; **15** – Bona.

1 2 3 4 5 6 7 8 K⁺ K⁻ M 1 2 3 4 5 6 7 8 K⁺ K⁻



Fot. 7. Elektroforogram produktów reakcji RT-PCR uzyskanych dla prób porzeczki czarnej z kolekcji odmian w SD w Dąbrowicach, w których wykryto BCLCaV ze starterami BCLCaV1173CP-F/BCLCaV1173CP-R **(A)** specyficznymi dla genu białka płaszczka oraz BCLCaV1184MP-F/BCLCaV1184MP-R **(B)** specyficznymi dla genu białka transportowego *Blackcurrant leaf chlorosis associated virus*. **M** – marker wielkości, **1, 2** – ‘Foxendown’; **3, 4** – ‘Ores’; **5, 6** – ‘Ojebyn’; **7, 8** – ‘Titania’; **K⁺** – kontrola pozytywna; **K⁻** – kontrola negatywna (zdrowa porzeczka czarna odm. ‘Ben Hope’).

WYNIKI – Temat badawczy 4

Lp.	Genotyp	Kraj pochodzenia	Stopień zasiedlenia pąków przez wielkopąkowca porzeczkowego		
			Wiosna 07.04.2025	Jesień 20.10.2025	Średnia roczna
1	Andega	Francja	0,0	0,1	0,0
2	Ben Tirran	Szkocja	0,0	0,0	0,0
3	Ben Tron	Szkocja	1,0	0,4	0,8
4	Gofert	Polska	1,0	1,1	1,0
5	Imandra	Szwecja	0,3	0,4	0,4
6	Sunderbyn II	Szwecja	0,0	0,0	0,0
7	Tihope	Polska	0,8	0,9	0,7
87	Tsema	Holandia	0,0	0,0	0,0
9	Ruben	Polska	1,8	1,1	1,4
10	Tiben	Polska	0,0	0,0	0,0
11	Bona	Polska	11,0	8,6	9,6
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	3,1	2,7	2,8
16	Polonus	Polska	0,1	0,1	0,1
17	Tiben II	Polska	3,4	2,7	3,0
18	Tisel	Polska	0,7	0,6	0,6
19	Ruben II	Polska	1,5	1,6	1,5
20	9A/9	Polska	0,1	0,1	0,1
21	12D/4	Polska	0,7	1,2	0,8
22	12D/40	Polska	1,1	1,3	1,1
23	PC-797	Polska	2,3	2,2	2,2
24	PC-811	Polska	3,1	2,7	2,9
25	PC 825	Polska	3,6	3,2	3,4
26	PC-778	Polska	2,4	2,3	2,3
27	PC-13B/11	Polska	1,8	2,2	1,9
27	26/1/1	Szkocja	0,7	1,1	0,8
29	Titania	Szwecja	0,7	0,8	0,7
30	Sanjuta	Ukraina	0,0	0,1	0,0
Średnia ogólna			1,37	1,24	1,27

Wielkopąkowiec porzeczkowy

- Uszkadza pąki i jest wektorem rewersji porzeczeki czarnej.
- Maleńki szpeciel - 0.15 -0.25 mm, żeruje i zimuje w pąkach porzeczeki (Fot. 8.)
- 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. 8. Widok szpecieli wielkopąkowca porzeczkowego w pąku porzeczeki czarnej pod mikroskopem.

WNIOSKI

1. Nad poszukiwaniem markerów molekularnych odporności porzeczek czarnej na rdzę wejmutkowo-porzeczkową (*C. ribicola*), na 33 genotypach porzeczek czarnej przetestowano łącznie 62 startery RAPD i 29 par starterów SSR. Prążki generowane przez starter OPA-01 o wielkości 1600 pz oraz e1-O20F/e1-O20F o wielkości 400 pz mogą być wykorzystywane jako prążki markerowe odporności roślin na tego patogena w hodowli odpornościowej.
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 trzech odmian ('Sanjuta', 'Consort' i 'Coronet') nie zaobserwowano żadnych objawów rdzy wejmutkowo-porzeczkowej.
5. We wszystkich trzech latach badań (2023-2025), w wyniku sztucznej inokulacji, zaobserwowano objawy rdzy wejmutkowo-porzeczkowej na roślinach odmiany 'Titania', dotychczas nie porażanej przez tego patogena w warunkach polowych w Polsce.
6. Polskie odmiany, które w warunkach polowych wykazywały małą podatność na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, w wyniku sztucznej inokulacji, były w niskim, średnim lub wysokim stopniu, porażone przez *C. ribicola*.
7. Przeprowadzone wstępne badania sztucznej inokulacji roślin porzeczek czarnej grzybem *C. ribicola*, w warunkach szklarniowych wymagają potwierdzenia w badaniach przy użyciu technik molekularnych.
8. Negatywne wyniki testów na obecność BCLCaV oraz RAVA w próbach pobranych z prywatnych plantacji porzeczek czarnej zlokalizowanych w różnych rejonach kraju wskazują na brak potencjalnego zagrożenia tymi wirusami.
9. BCLCaV może być rozprzestrzeniany z pyłkiem na sąsiednie plantacje porzeczek czarnej z roślin w kolekcjach odmian sprowadzonych z różnych krajów.
10. W 2025 roku na krzewach ocenianych genotypów porzeczek czarnej rosnących w doświadczeniu polowym zagrożenie ze strony wielkopąkowca porzeczkowego kształtowało się na średnim poziomie.
11. Badane genotypy porzeczek czarnej różnią się w stopniu porażenia przez tego szkodnika: brak objawów stwierdzono u odmian- 'Andega', 'Ben Tirran', 'Sunderbyn II', 'Tsema', 'Tiben', 'Elo', 'Ores', 'Polares' i 'Sanjuta'.
12. Większość testowanych genotypów porzeczek czarnej należała do grupy odpornych na tego szkodnika.
13. Najwięcej zasiedlonych przez szpeciele pąków stwierdzono na krzewach odmiany 'Bona'.
14. Pod mikroskopem w uszkodzonych przez szpeciele pąkach potwierdzono liczne osobniki wielkopąkowca porzeczkowego.