

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, dr Anna Poniatowska, mgr Monika Michalecka, 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

- Charakterystyka genetyczna populacji grzyba *Cronartium ribicola* - sprawcy rdzy wejmutkowo-porzeczkowej i identyfikacja jego ras – 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 28 genotypów (odmiany i klony hodowlane) porzeczki czarnej zgromadzonych w hodowlanej kolekcji ZHRO – **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 hodowlanej kolekcji odmian z rodzaju *Ribes*.

II. Metody badawcze:

1. Izolacja DNA grzyba *Cronartium ribicola*, sprawcy rdzy wejmutkowo-porzeczkowej (Fot. 4) opartą o odczynnik CTAB (Doyle i Doyle, 1990).
2. Amplifikacja DNA *Cronartium ribicola* w reakcjach ISSR PCR.
3. Amplifikacja DNA *Cronartium ribicola* w reakcjach RAPD PCR
4. Amplifikacja DNA *Cronartium ribicola* w reakcjach PCR MP
5. Odczytanie wielkości produktów reakcji i przygotowanie danych do analiz bioinformatycznych w celu oszacowania zróżnicowania genetycznego populacji grzyba *C. ribicola*.
6. Ocena polowej podatności na rdzę wejmutkowo-porzeczkową wybranych genotypów porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) oraz zebranie prób liści z urediniosporami grzyba *C. ribicola* do sztucznego zakażenia roślin.
7. Identyfikacja, charakterystyka molekularna oraz ocena zróżnicowania genetycznego wybranych izolatów wirusa rewersji porzeczki czarnej (*Blackcurrant reversion virus*, BRV) (Fot. 5) wykrytych w roślinach różnych genotypów porzeczki czarnej.



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



Fot. 5. Objawy rewersji BRV na pąkach (A) i liściach (B) porzeczki czarnej.

II. Metody badawcze:

Analiza zróżnicowania genetycznego populacji grzyba *C. ribicola* przy wykorzystaniu metody ,odcisku palca':

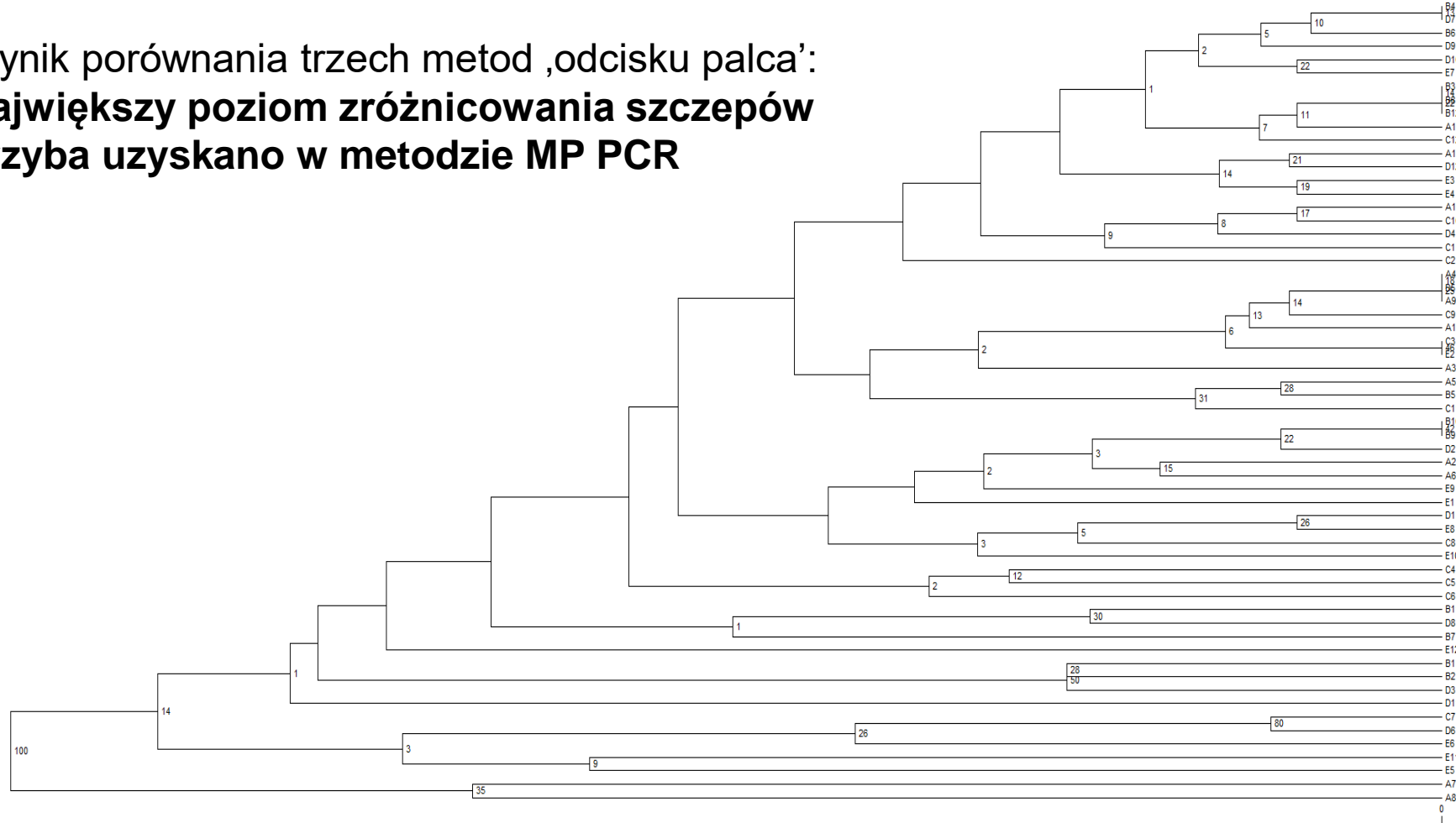
- a) 3 x MP PCR
- b) 3 x RAPD PCR
- c) 5 x ISSR PCR

Etapy: 1) Izolacja DNA z 200 szczepów grzyba *C. ribicola*
2) Amplifikacja DNA w reakcjach PCR
3) Odczytanie wielkości produktów dla każdej metody i zakodowanie ich w postaci kodu binarnego
4) Analiza bioinformatyczna
5) Wizualizacja uzyskanych dendrogramów.

Tabela 1. Lokalizacja i wykaz odmian porzeczki czarnej, z których pobierano próby do badań.

Lokalizacja	Odmiana/klon porzeczki czarnej	Liczba uzyskanych izolatów
SD Dąbrowice		
1	Tisel	20
2	Polben	20
3	Tihope	20
4	klon PC_col27_2020	20
5	klon CDPC	20
Sad Pomologiczny		
6	Polares	20
7	Tihope	20
8	Ben Tron	20
9	Narve Viking	20
10	Bem Gairn	20

Wynik porównania trzech metod ,odcisku palca':
**Największy poziom zróżnicowania szczepów
grzyba uzyskano w metodzie MP PCR**



MP PCR

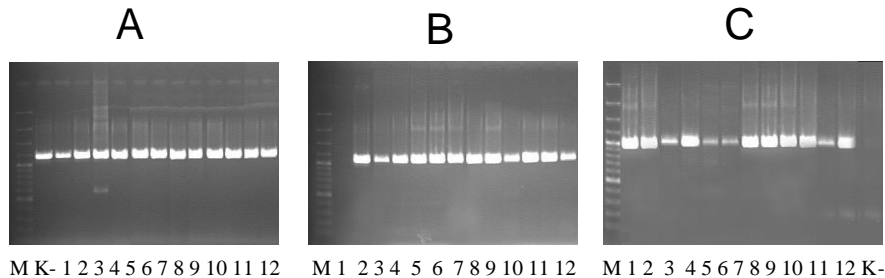
Konstrukcja drzewa na podstawie: UPGMA, współczynnik Nei and Li, próbkowanie 1000 bootstrap.

Tabela 1. Podatność wybranych genotypów porzeczki czarnej na rdzę wejmutkowo-porzeczkową, w hodowlanej kolekcji odmian, Skierniewice, 2022 r.

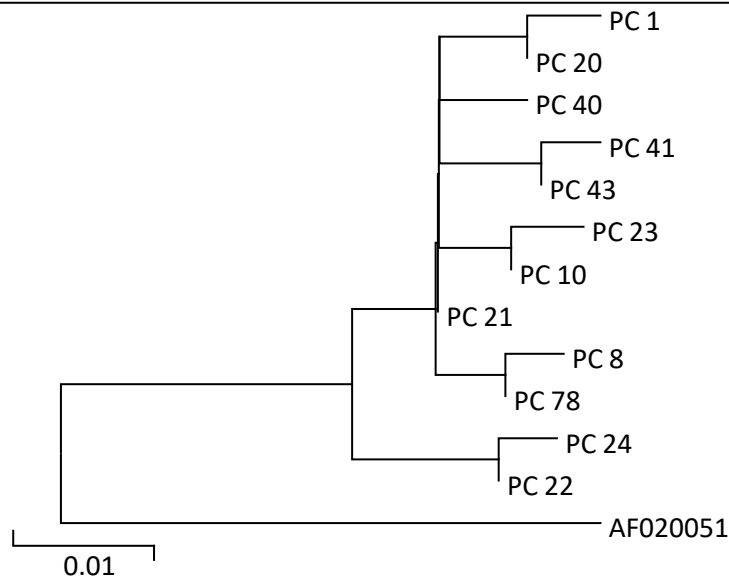
Lp.	Genotyp	Kraj pochodzenia	Stopień porażenia przez <i>C. ribicola</i> wg skali bonitacyjnej (0-5)*	
			1. Termin oceny 03.08.2022	2. Termin oceny 11.10.2022
1	Andega	Francja	0,00 a	0,00 a**
2	Ben Tirran	Szkocja	0,00 a	0,00 a
3	Ben Tron	Szkocja	0,00 a	0,00 a
4	Gofert	Polska	0,00 a	0,00 a
5	Imandra	Rosja	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	0,50 ab
11	Bona	Polska	0,00 a	0,00 a
12	Elo	Estonia	0,00 a	0,00 a
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	0,30 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	0,30 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	0,00 a
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 drugim roku badań, podobnie jak w 2021 roku, w pierwszym terminie oceny, (3 sierpnia 2022 r.), na liściach testowanych genotypów nie stwierdzono objawów tej choroby.
- W drugim terminie oceny (11 października 2022 r.), słabe objawy choroby (stopień porażenia od 0,3 do 0,5) stwierdzono na roślinach 2 odmian ('Tiben' i 'Tisel') oraz klonie hodowlanym (12D/4).

* 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. Rozdział elektroforetyczny produktów RT-PCR z trzema starterami: 2BRV2000F/2BRV3000R (A), 2BRV3000F/2BRV4000R (B) i 2BRV4000F/2BRV5000R (C); M – marker wielkości, K – kontrola (zdrowa roślina porzeczki czarnej, 1 – 12 próby z roślin porzeczki czarnej porażonych wirusem rewersji (BRV)).



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne przedstawiające podobieństwo sekwencji nukleotydów fragmentu RNA 2 izolatów wirusa rewersji porzeczki czarnej oraz szczepu referencyjnego o numerze dostępu w bazie GenBank AF020051.

- Badania wykazały przydatność własnych zaprojektowanych trzech par starterów (2BRV2000F/2BRV3000R, 2BRV3000F/2BRV4000R i 2BRV4000F/2BRV5000R) umożliwiające amplifikację fragmentu genomu wirusa zawierające gen białka płaszczka wirusa oraz gen białka transportowego (Rys.1).

- Łącznie wykonano 150 testów na obecność wirusa rewersji porzeczki czarnej w próbkach liści 28 genotypów porzeczki czarnej.

- Badane izolaty grupowały się na oddzielnej gałęzi drzewa filogenetycznego, niż szczep referencyjny. Świadczy to o wysokim stopniu pokrewieństwa między nimi. Spośród wykrytych izolatów wyróżniały się dwa: PC 22 i PC 24, które tworzyły oddzielny układ w obrębie podklastru grupującego wszystkie badane izolaty BRV (Rys. 2). Obydwa te izolaty wywoływały objawy rewersji typu rosyjskiego (R) podczas, gdy pozostałe - typu europejskiego (E).

1. Największy poziom zróżnicowania szczepów grzyba uzyskano w metodzie MP PCR
2. Nie zaobserwowano związku między genetyką populacji *C. ribicola*, a ich pochodzeniem, tzn. lokalizacją plantacji, czy odmianą, z której pochodziły.
3. W sezonie 2022 roku nasilenie rdzy wejmutkowo-porzeczkowej na roślinach testowanych genotypów porzeczek czarnej było bardzo niskie.
4. Pierwsze objawy tej choroby na liściach ocenianych odmian i klonów hodowlanych pojawiły się dopiero w październiku 2022 r.
5. Słabe objawy choroby stwierdzono na 3 spośród 30 ocenianych genotypów (odmian i klonach hodowlanych) porzeczek czarnej.
6. Objawy chorobowe obserwowane na krzewach porzeczek czarnej wskazują na obecność dwóch różnych typów rewersji: rosyjskiej i europejskiej.
7. W 38 roślinach porzeczek czarnej udało się wykryć BRV, stosując cztery pary starterów w reakcji RT-PCR, które są przydatne do wykrywania BRV techniką RT-PCR.
8. Zsekwencjonowany 1919 pz fragment RNA 2 zawiera gen białka płaszcza i gen białka transportowego 12 izolatów BRV.
9. Badane izolaty BRV są zróżnicowane genetycznie.
10. Nie ma zależności pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym badanych izolatów BRV, a pochodzeniem geograficznym genotypów porzeczek czarnej i pochodzeniem izolatów wirusa.
11. Największe różnice występują w sekwencji nukleotydów izolatów PC 22 i PC 24, które w odróżnieniu od pozostałych izolatów, wywołują objawy rosyjskiego typu rewersji.