

WYKORZYSTANIE METODY RT-PCR W HODOWLI ODPORNOŚCIOWEJ PORZECZKI CZARNEJ (*Ribes nigrum* L.) NA REWERSJĘ

Stanisław Pluta, Tadeusz Malinowski, Anita Kuras, Edward Żurawicz

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach

Wstęp

Rewersja, wywoływana przez wirus *Blackcurrant reversion virus* – BRV [LEMMETY, LEHTO 1999], jest najgroźniejszą chorobą wirusową porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) [KNIGHT 1985; ADAMS, THRESH 1987], występującą we wszystkich krajach, w których gatunek ten jest uprawiany na skalę towarową. Dwie formy (typy) chorobowe: rewersja typu E (European) oraz rewersja typu R (Russian) różnią się stopniem zniekształcenia kwiatostanów, a częściowo także intensywnością innych objawów chorobowych. Rewersja typu R jest uważana za groźniejszą od rewersji typu E, jednak oba typy choroby są w wysokim stopniu szkodliwe [PLUTA, ŻURAWICZ 1999; 2001].

W hodowli twórczej porzeczki czarnej najważniejszym kierunkiem jest hodowla odpornościowa na rewersję porzeczki oraz jej wektora i najgroźniejszego szkodnika – wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophopsis ribis* WEST.) [THRESH 1964; TRAJKOVSKI, ANDERSON 1992]. W programach hodowlanych wykorzystuje się znane i dostępne źródła genów odporności na BRV – dziki gatunek *Ribes dikuscha* oraz odmiany wywodzące się od niego, jak: 'Golubka', 'Novost', 'Awgustowska', 'Primorskij Czempion', 'Rus', 'Minaj Szmyriew' i inne [RAVKIN 1987; OGOLCOVA 1991]. Efektem prac hodowlanych było otrzymanie w szkockim Instytucie (SCRI) nowej odmiany porzeczki czarnej odpornej na rewersję 'Ben Gairn', pochodzącej ze skrzyżowania odmian 'Ben Alder' i 'Gołubka' [BRENNAN i in. 1998].

W Zakładzie Hodowli Roślin Sadowniczych Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa (ISK) w Skierniewicach prowadzone są także szerokie badania we współpracy z innymi specjalistami nad uzyskaniem materiałów hodowlanych odpornych na wielkopąkowca i rewersję [PLUTA i in. 2000].

W tej pracy przedstawiono zastosowanie metody IC-RT-PCR do wykrywania wirusa BRV i identyfikacji jego szczepów dla potrzeb hodowli odpornościowej. Metodę stosowano przy ocenie odporności na rewersję roślin wybranych genotypów, rosnących w kolekcji odmian oraz do identyfikacji wirusa BRV w próbkach roślin. Ocenę odporności prowadzono poprzez zakażanie badanych roślin, obserwację ewentualnych objawów chorobowych (przede wszystkim w okresie kwitnienia) i testowanie metodą RT-PCR na obecność wirusa.

Materiał i metody

Przedmiotem badań były krzewy porzeczki czarnej rosnące w polowej kolekcji odmian, tunelu foliowym, w karkasie i maceczniku. Wiosną 2001 i 2002 roku przebadano testem RT-PCR na obecność wirusa 54 rośliny. Materiał wyjściowy (14 genotypów, 18 przetestowanych roślin) stanowiły odmiany zagraniczne, sprowadzone z Ukrainy, Rosji i Białorusi. Krzewy tych odmian rosną w pojemnikach w karkasie oraz tunelu i są one wykorzystywane w programie hodowlanym (krzyżowaniach) w ramach hodowli odpornościowej na rewersję. Materiał w kolekcjach polowych, poddany silnej presji infekcyjnej, stanowiły rośliny prawie 100 genotypów, z których 34 przebadano testem RT-PCR. Metodę tą zastosowano także do sprawdzenia materiału elitarnego dwóch nowych odmian hodowli ISK – 'Tiben' i 'Tisel' (testowano po jednej roślinie macecznej).

Wiosną w okresie kwitnienia krzewów porzeczki czarnej wykonywano obserwacje pod kątem występowania charakterystycznych objawów rewersji obu typów (E i R) na pąkach i kwiatach. W późniejszym terminie (początek – połowa VI) obserwowano objawy rewersji na liściach.

Do testów na obecność wirusa rewersji (BRV) pobierano próbki liści lub liści i kwiatostanów. Testy prowadzono metodą IC-RT-PCR (ang. immunocapture – reverse transcription – polymerase chain reaction). Probówki opłaszczano przeciwciałami wyizolowanymi z surowicy anty-BRV otrzymanej od dr K. Lehto (University of Turku, Finlandia). Probówki po inkubacji ekstraktu z materiału roślinnego (noc w +4°C) płukano 4-krotnie buforem PBS-T, następnie krótko buforem Tris-Cl w stężeniu 0,01 mol·dm⁻³ o pH 8,0. Po odwirowaniu i odciągnięciu supernatantu pompką wodną do probówek pipetowano bezpośrednio mieszaninę reakcyjną. Reakcję prowadzono z wykorzystaniem zestawu „SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq*” (Invitrogen, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Wykorzystywano startery BRAV5, BRAV6 [LEMMETTY i in. 1998] oraz BRVUnF1, BRVUnR1, zaprojektowane w Pracowni Wirusologii ISK. Analizę elektroforetyczną produktów PCR prowadzono w żelu agarozowym.

W metodzie IC-RT-PCR-RFLP stosowano enzymy restrykcyjne *AluI*, *RsaI* i *HinfI*, wybrane na podstawie wyników analizy odczytanych sekwencji cDNA 30 izolatów (dane niepublikowane). Analizę komputerową prowadzono przy użyciu pakietu programów DNASTAR v. 5.0 (LaserGene, USA). Hydrolizę enzymatyczną produktów IC-RT-PCR prowadzono przez noc w 37°C. Do rozdzielania uzyskanych fragmentów DNA stosowano elektroforezę w 6% żelu poliakrylamidowym.

Wyniki i dyskusja

W latach 2001 i 2002 przebadano ponad 60 próbek materiału roślinnego porzeczki czarnej testem IC-RT-PCR na obecność wirusa rewersji (BRV). Przykładowe wyniki przedstawiono w tab. 1 i na rys. 1.

W pierwszej grupie testowanych roślin (materiał wyjściowy) analizowano 18 próbek pobranych z krzewów 14 odmian, ostatnio uzyskanych z zagranicy (wyniki dla 13 próbek przedstawiono w tabeli). W przypadku dwóch odmian ('Klusonowskaja' i 'Alta') stwierdzono porażenie wirusem niektórych roślin. Zastosowanie metody IC-RT-PCR umożliwiło wczesne wykrycie porażenia i wyeliminowanie chorych roślin. W pozostałych genotypach rewersji nie wykryto. Odmiany,

takie jak: 'Gołubka', 'Minaj Szmyriew', 'Binar', 'Wernisaż' i 'Sofijewskaja', są potencjalnymi źródłami genów odporności na rewersję. Wykorzystywane są one w krzyżowaniach realizowanych w ramach programu hodowli odpornościowej porzeczki czarnej.

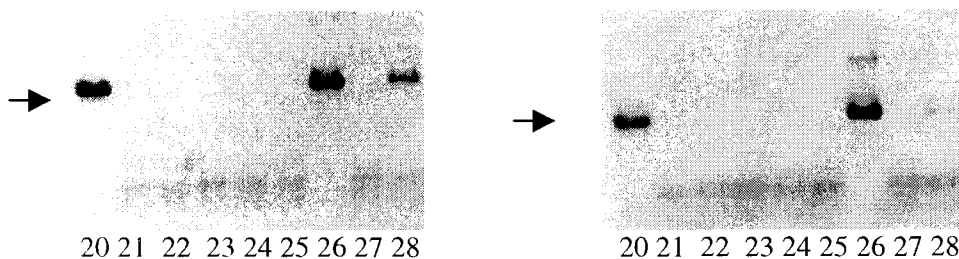
Tabela I; Table 1

Wyniki testów IC-RT-PCR na obecność wirusa rewersji (BRV) w materiałach hodowlanych i nowych odmianach porzeczki czarnej
Results of IC-RT-PCR tests for the presence of reversion virus (BRV) in breeding materials and new cultivars of black currant

Nr; No.	Etykieta (kod) Label (code)	Odmiana lub klon Cultivar or clone	Kraj pochodzenia Country of origin	Wynik Result
0	1	2	3	4
Materiał wyjściowy; Starting material				
1.	01256	Klusonowskaja	Rosja; Russia	+
2.	01258	Minaj Szmyriew	Białoruś; Belorussia	-
3.	01259	Alta	Ukraina; Ukraine	-
4.	01260	Binar	Rosja; Russia	-
5.	01261	Wielikoliennaja	Rosja; Russia	-
6.	01262	Alta	Ukraina; Ukraine	-
7.	01263	Ulubiennaja Kopania	Ukraina; Ukraine	-
8.	01264	Wernisaż	Ukraina; Ukraine	-
9.	01265	Sofijewskaja	Ukraina; Ukraine	-
10.	01267	Gołubka	Rosja; Russia	-
11.	Ukraina 7A 1/3	Alta	Ukraina; Ukraine	-
12.	Ukraina 7A 2/3	Alta	Ukraina; Ukraine	+
13.	Ukraina 8A 1/3	Wernisaż	Ukraina; Ukraine	-
Materiał w kolekcjach polowych; Material in field collections				
14.	BRV2001-001	Amos Black	Anglia; England	+
15.	BRV2001-002	Barchatnaja	Rosja; Russia	+
16.	BRV2001-003	Ben Lomond	Szkocja; Scotland	+
17.	BRV2001-004	Bija	Rosja; Russia	+
18.	BRV2001-010	Noir de Burgunge	Francja; France	+
19.	BRV2001-011	Ojebyn	Szwecja; Sweden	+
20.	BRV2001-023	Bona	Polska; Poland	+
21.	BRV2001-024	Krasa Lwowa	Ukraina; Ukraine	-
22.	BRV2001-025	Urałoczka	Rosja; Russia	-
23.	BRV2001-026	Szachalewskaja	Ukraina; Ukraine	-
24.	BRV2001-027	Ukrainka	Ukraina; Ukraine	-
25.	BRV2001-028	Katjusza	Białoruś; Belorussia	-
26.	BRV2001-029	Klusonowskaja	Rosja; Russia	+
27.	BRV2001-030	Birulewskaja	Ukraina; Ukraine	-

0	1	2	3	4
28.	BRV2001-031	Dubiginai	Litwa; Lithuania	+
29.	BRV2001-034	Wira	Rosja; Russia	-
30.	BRV2001-035	Dolia	Rosja; Russia	-
31.	BRV2001-037	Nadina	Ukraina; Ukraine	-
32.	BRV2001-038	Ametist	Ukraina; Ukraine	-
33.	BRV2001-039	Lebid	Ukraina; Ukraine	-
34.	BRV2001-040	Klon nr 7-201-146	Ukraina; Ukraine	-
35.	BRV2001-041	Klon nr 5-284-37	Ukraina; Ukraine	-
Materiał elitarny nowych odmian; Elite material of new cultivars				
36.	BRV2001-151	Tiben	Polska; Poland	-
37.	BRV2001-156	Tisel	Polska; Poland	-

- + – wynik pozytywny; stwierdzono obecność wirusa (BRV) w materiale roślinnym; positive result, BRV was detected in plant sample
 - – wynik negatywny, nie stwierdzono obecności wirusa (BRV) w materiale roślinnym; negative result, BRV was detected in plant sample



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów IC-RT-PCR uzyskanych przy testowaniu próbek liści porzeczki czarnej (numery próbek jak w tabeli 1). Test prowadzono z wykorzystaniem starterów BRAV5-BRAV6 (lewa strona) i BRVUnF1-BRVUnR1 (prawa strona). Strzałkami wskazano położenie specyficznych produktów PCR

Fig. 1. Electrophoretic pattern of IC-RT-PCR products obtained during testing of samples of black currant leaves (sample numbers correspond to Table 1). Test was conducted using two primer sets: BRAV5-BRAV6 (left) and BRVUnF1-BRVUnR1 (right). Arrows indicate positions of specific PCR products

Wśród 22 genotypów z kolekcji polowych przedstawionych w tab. 1, porażeniu rewersją uległy rośliny 9 odmian. W krzewach pozostałych 13 odmian/klonów nie stwierdzono obecności BRV. Były to głównie stare odmiany i klony pochodzące z kilku krajów europejskich. Krzewy tych genotypów rosły w polu od 5 do 8 lat w warunkach silnej presji infekcyjnej. Brak porażenia wskazywał na ich wysoką odporność polową. Niektóre z nich mogą być wykorzystane w hodowli odpornościowej.

Trzecią grupę testowanych roślin stanowił materiał elitarny nowych odmian porzeczki czarnej wyhodowanych w ISK. W żadnej z badanych 10 roślin nie wykryto obecności BRV. W tabeli przedstawiono wyniki testu dla dwóch próbek.

Wyniki testów IC-RT-PCR były w wysokim stopniu zgodne z wcześniejszymi obserwacjami symptomów rewersji na roślinach. W niektórych przypadkach

wykrywano wirusa także w krzewach niewykazujących wyraźnych objawów chorobowych. Metoda IC-RT-PCR jest stosowana przy ocenie nowych klonów hodowlanych. Umożliwi to szybsze uzyskiwanie wyników, szczególnie przy ocenie odporności materiałów hodowlanych poprzez sztuczne zakażenie (szczepienie).

Opracowana metoda IC-RT-PCR-RFLP umożliwiła identyfikację wybranych izolatów BRV. W hodowli odpornościowej metoda ta może być wykorzystywana do badania zróżnicowania wrażliwości nowych odmian i klonów porzeczki czarnej na różne szczepy wirusa rewersji.

Literatura

- ADAMS A.N., THRESH J.M. 1987. *Reversion of black currant*, w: *Virus diseases of small fruits*. USDA. Handbook 631: 133–136
- BRENNAN R.M., GORDON S.L., LANHAM P.G. 1998. *Black currant breeding and genetics*. Annual Report Scottish Crop Research Institute for 1997/98: 89–92.
- KNIGHT V.H. 1985. *Reversion virus*. Report of East Malling Research Station for 1984: 167–168.
- LEMMETTY A., LEHTO K. 1999. *Successful back-inoculation confirms the role of blackcurrant reversion virus as the causal agent of reversion disease*. Eur. J. Plant Pathol. 105: 297–301.
- LEMMETTY A., SUSI P., LATVALA S., LEHTO K. 1998. *Detection of the putative causal agent of blackcurrant reversion disease*. Acta Hort. 471: 93–98.
- OGOLCOVA T.P. 1991. *Selekcja czarnej smorodiny – prozloje, nastojaszczie, buduszczie*. Tipografia „Trud”, Oriel, Russia: 381 ss.
- PLUTA S., ŻURAWICZ E. 1999. *Influence of graft-inoculation methods on the spread of two forms of reversion in black currant (Ribes nigrum L.) plants*. Acta Hort. 505: 167–172.
- PLUTA S., ŻURAWICZ E. 2001. *Effect of reversion virus on the yield and fruit size in blackcurrant (Ribes nigrum L.)*. Acta Hort. 585: 393–398.
- PLUTA S., ŻURAWICZ E., MALINOWSKI T., GAJEK D. 2000. *Breeding of black currant (Ribes nigrum L.) resistant to gall mite and reversion virus*. Acta Hort. 538: 463–468.
- RAVKIN A.S. 1987. *Czernaja smorodina. Ischodnyj matrial, selekcja, sorta*. Izdatielstwo Moskowskiwo Uniwersiteta 1987: 210 ss.
- THRESH J.M. 1964. *Association between black currant reversion virus and its gall mite vector (Phytoptus ribis Nal.)*. Nature 202: 1085–1087.
- TRAJKOVSKI V., ANDERSON M. 1992. *Breeding black currant for resistance to powdery mildew, gall mite and reversion disease*. Report for 1990–1991. Balsgard, Sweden: 181–189.

Słowa kluczowe: porzeczka czarna, *Ribes nigrum* L., rewersja, BRV, hodowla odpornościowa

Streszczenie

Rewersja porzeczki czarnej, wywoływana przez wirus BRV (ang. *Blackcurrant reversion virus*), jest najgroźniejszą chorobą wirusową porzeczki czarnej.

Znane są dwa typy rewersji: E (European) i R (Russian). Oba typy są w wysokim stopniu szkodliwe. Dlatego w hodowli odpornościowej konieczne jest badanie odporności na rewersję typu E i R. W tej pracy przedstawiono zastosowanie metody IC-RT-PCR do wykrywania wirusa BRV i identyfikacji jego izolatów dla potrzeb hodowli odpornościowej. Metodę stosowano do testowania hodowlanych materiałów wyjściowych i materiału elitarnego nowych odmian oraz przy ocenie odporności na rewersję wybranych genotypów. W latach 2001–2002 przebadano ponad 60 próbek pobranych z 54 roślin. Obecność wirusa sprawdzano stosując dwa różne zestawy starterów w reakcji RT-PCR. Zastosowanie testu IC-RT-PCR umożliwiło wczesne wykrycie choroby i wyeliminowanie porażonych roślin. Opracowano także metodę IC-RT-PCR-RFLP umożliwiającą identyfikację kilku wybranych izolatów na podstawie wzoru prążków cDNA, uzyskiwanych po trawieniu produktu RT-PCR trzema enzymami restrykcyjnymi. Metoda ta będzie stosowana przy badaniu zróżnicowania odporności odmian i klonów porzeczki czarnej na rewersję typu E i R.

THE USE OF RT-PCR METHOD IN THE BLACKCURRANT (*Ribes nigrum* L.) BREEDING FOR RESISTANCE TO REVERSION

Stanisław Pluta, Tadeusz Malinowski, Anita Kuras, Edward Żurawicz
Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice

Key words: blackcurrant, *Ribes nigrum* L., reversion, BRV, resistance breeding

Summary

Reversion caused by *Blackcurrant reversion virus* (BRV) is the most serious virus disease of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). Two forms (types) of disease: E (European) and R (Russian) are known. Both types are highly harmful. Therefore, the resistance to both types should be checked at breeding for resistance. Application of IC-RT-PCR method for detection of BRV and identification of its isolates were presented in this paper. The method was applied for testing parental forms and elite plant material of new cultivars as well as for evaluation of selected genotypes' resistance to reversion. More than 60 samples collected from 54 plants were tested in 2001 and 2002. The virus detection was conducted using two different primer sets in IC-RT-PCR reaction. Application of IC-RT-PCR tests enabled early detection of virus infection and rejection of diseased plants. IC-RT-PCR-RFLP method was designed for identification of selected isolates based on using three restriction enzymes for digestion of RT-PCR product. This method could be used for investigation of resistance of blackcurrant cultivars and clones to E and R types of reversion.

Dr Stanisław **Pluta**

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa
ul. Pomologiczna 18
96-100 SKIERNIEWICE