

Detektion av reversionsvirus i svarta vinbärsplantor med hjälp av RT-PCR

KIMMO RUMPUNEN, ANDERS DAHLQVIST OCH GUNILLA ÅHMAN

Sammanfattning

Reversion är en av de allvarligaste sjukdomarna som kan drabba svarta vinbärsplantor. Reversion orsakas av ett virus som på sikt gör buskarna helt sterila och buskarna kan då följaktligen ej sätta bär. Reversionsviruset sprids med vinbärgallkvalstret (*Cecidophyopsis ribis*), en synnerligen effektiv vektor, som snabbt även smittar friskt utgångsmaterial. Det finns idag inga godkända växtskyddsmedel mot vinbärgallkvalster eller reversionsvirus. Enda möjligheten att slippa ifrån gallkvalster och reversion, och därigenom kunna upprätthålla lönsamheten i svartvinbärsodling, är således tillgång till resistent sorter.

Försök att resistensförädla svarta vinbär mot reversionsvirus har pågått under större delen av 1900-talet. Att dessa försök inte haft nämnvärd framgång, beror på att det hittills inte har funnits någon snabb och säker analysmetod för denna sjukdom. Den reversionsframkallande patogenen, svarta vinbärs reversions virus (blackcurrant reversion virus, BRV), blev inte isolerad och identifierad förrän mot slutet av 1990-talet. Man visste inte ens att sjukdomen orsakades av ett virus. Det enda sättet som fanns att testa förekomsten av reversion i en planta, var att skottympa den på en svartvinbärsort som får tydliga blad- och blomsymptom av BRV och sedan vänta ett år eller mer på symptomen. Nu när den orsakande patogenen är funnen och karakteriserad, kan viruset snabbt detekteras i laboratorium.

Vi har inom ramen för ett partnerskapsprojekt satt upp en ny, känslig och specifik molekylär metod (RT-PCR) som



Figur 1. Bild på frisk buske med riklig sättnings av svarta vinbär. Svarta vinbärs reversionsvirus (BRV) är en allvarlig skadegörare på vinbär som på sikt kan göra buskarna helt sterila men det kan vara svårt att i tidigt stadium bedöma förekomst av virus t.ex. med hjälp av symptom på blommor och blad. Nya molekylära PCR-baserade metoder har nu visat sig vara både tillförlitliga och snabba när det gäller detektion av BRV. (Foto: Kimmo Rumpunen)

gör det möjligt att påvisa BRV-RNA i svarta vinbär inom några dagar. Metoden har framgångsrikt testats på olika sorter och selektioner i syfte att påskynda resistensförädlingsarbetet av svarta vinbär. Slutsatsen av våra försök, och försök som genomförts utomlands, är att den molekylära metoden både är effektiv och pålitlig, och kan användas som ett diagnostiskt test, såväl inom växtförädling som vid förökning och certifiering av plantor för kommersiell odling.

Reversion hos svarta vinbär

En rad olika skadegörare och sjukdomar kan angripa svarta vinbär vilket försvårar och fördyrar kommersiell odling. Särskilt allvarlig är sjukdomen reversion och dess vektor vinbärgallkvalstret (*Cecidophyopsis ribis*) (SJV, Rapport 1999:16). Reversion leder förr eller senare till sterilitet hos blommorna och orsakas av ett virus som kan infektera både röda och svarta vinbär. Reversion medför stora

Tabell 1. Förekomst av gallkvalster (antal infekterade uppsvälda knoppar) och reversionsvirus (detekterat med RT-PCR; + = förekommer, - = förekommer ej) hos olika selektioner och sorter i försök med svarta vinbär på Balsgård 2010. Av varje sort planterades ursprungligen 7 plantor. Bedömningen och provtagning har utförts efter 5 odlingsår. De första gallkvalsterangreppen noterades 2009. Endast två sorter ('Ben Finlay' och 'Poesia') samt en selektion (SCRI 8944-13) har helt undgått angrepp av gallkvalster. Förekomst av reversionsvirus (BRV) kunde påvisas i en selektion (BRi 9729-03-002) redan andra året efter noterat gallkvalsterangrepp. (Tabell modifierad efter Rumpunen & Öberg, 2011).

Sort	Antal buskar	Buskar med galler	Antal galler per buske	Min antal galler	Max antal galler	BRV
'Ben Finlay'	7	0	0.0	0	0	-
'Poesia'	6	0	0.0	0	0	-
SCRI 8944-13	7	0	0.0	0	0	-
BRi 9502-10-148	7	1	0.1	0	1	-
BRi 9502-10-167	7	4	0.9	0	2	-
BRi 9344-1	7	2	1.0	0	6	-
BRi 9504-2-227	7	3	1.6	0	8	-
'Ben Gairn'	7	5	1.9	0	5	-
BRi 9715-02-058	7	6	3.1	0	12	-
'Intercontinental'	7	6	3.9	0	8	-
'Ben Hope'	7	7	4.4	1	12	-
BRi 9764-03-217	7	7	6.0	1	16	-
BRi 9729-03-002	7	7	6.3	4	9	+
'Big Ben'	7	6	6.6	0	16	-
'Titania'	7	7	7.3	2	14	-
'Hildur'	6	6	23.7	6	50	-

skördeminskningar och är spridd över stora delar av världen (dock ej i Amerika). Därmed räknas den som en av de allvarligaste virusjukdomarna på växter. Det finns minst två kända former av reversionsvirus som angriper svarta vinbär: den vanliga europeiska formen (E) och den allvarligare ryska formen (R) som påträffats i Skandinavien och Finland (Jones et al. 1998, Lehto et al. 2004). Båda formerna ger bladsymptom samt minskad behåring och ökad färg på blomknopparna. Den ryska formen ger dessutom ökat antal sepaler (fördubbling av antalet hos blommorna) och än kraftigare färgförändringar hos blomknopparna. Polska försök har visat att båda formerna, vid inokulering i fält, gav upphov till 80–90 % skördeminskningar efter 6 år (Pluta & Zurawicz 2002). Nya undersökningar har karakteriserat viruset som *blackcurrant reversion virus* (BRV) tillhörande släktet *Nepovirus* och familjen *Comoviridae* (Jones & McGavin 2002). Det är mycket svårt att kontrollera sjukdomen på ett effektivt sätt eftersom den sprids genom mikroskopiska vinbärgallkvalster när de suger näring inuti knopparna.

Sjukdomssymptomen utvecklas ibland snabbt men oftare ganska långsamt vilket kan göra det svårt att med säkerhet detektera virusförekomsten visuellt.

Resistensförädling av svarta vinbär

Avsaknaden av resistent sorter och effektiv behandling mot gallkvalster i ekologisk odling har medfört att det endast är en liten del av svart vinbärsproduktionen, både i Sverige och utomlands, som idag odlas ekologiskt. Gallkvalstren (Figur 2) är ett stort problem även i konventionell odling, framförallt sedan de effektivaste växtskyddsmedlen nyligen förbjudits. Bästa sättet att kontrollera gallkvalster och reversion är att utnyttja genetiskt betingad resistens mot skadegöraren/sjukdomen. Växtförädling av vinbär både i Sverige och utomlands har därför under lång tid haft som mål att kombinera resistens mot mjöldagg med resistens mot gallkvalster och reversion.

Släktet *Ribes* består av ca 150 olika arter och återfinns i tempererade områden i framförallt Europa och Nordamerika. Samtliga arter är diploida och

kan enkelt korsas, och ett flertal arter har använts som genkällor för olika ändamål (Brennan 1990). Resistens mot gallkvalster har t.ex. hämtats från krusbär (*Ribes uva-crispa*). För att skapa nya sorter med resistens mot reversionsvirus har i stor utsträckning *R. dikuscha* använts (Brennan & Gordon 2002). Ett exempel på en nyare reversionsresistent sort av svarta vinbär som nu även saluförs i Sverige är den skotska sorten 'Ben Gairn'. Denna sort är tyvärr inte resistent mot gallkvalster vilket innebär att gallkvalster kan angripa knopparna och därmed påverka både blomning, kartsättning och avkastning. 'Ben Hope' är ytterligare en skotsk sort som tidigare ansetts vara gallkvalsterresistent. Resistensen är numera bruten vilket bland annat framgått av försök på Balsgård (Rumpunen och Öberg, 2011).

Detektion av reversionsvirus i svarta vinbär

Resistensförädlingen mot reversion i svarta vinbär skulle kunna effektiviseras om man kunde använda en analysmetod som gjorde det möjligt att snabbt kvantifiera virus. Tidigare var det en tidskrävande procedur att avgöra ifall svarta vinbärsbuskarna var smittade av viruset. Standardmetoden för att detektera BRV i svarta vinbär är att ympa kvistar eller skott av test-sorten på en icke infekterad standardplanta (t.ex. 'Öjebyn' eller 'Baldwin' som får tydliga bladsymptom av BRV), och därefter undersöka utvecklingen av eventuella symptom hos de framväxande skotten på standardplantan under två års tid (OEPP/EPPO 2008). Nya undersökningar har visat att virus sprider sig olika snabbt i olika sorter och att det därför kan krävas minst tre års studier! Eftersom BRV sprider sig ojämnt i vinbärsbusken rekommenderas dessutom att testa flera skott per planta vilket gör att metoden både tar lång tid och blir dyr. Nya molekylära

metoder som är både säkra och mycket känsliga gör det emellertid möjligt att på ett fåtal dagar avgöra om plantorna är infekterade (Jones & McGavin 2002, Dolan et al. 2011). Med denna metod kan virus både detekteras och kvantifieras, så att virushalten och därmed mottagligheten för BRV hos olika buskar kan mätas och jämföras. Vi har satt upp, anpassat och testat denna molekylära metod under 2007–2010 både i pågående sortförsök och i växtsamlingar för att identifiera resistenskällor med varaktig resistens för framtida nyttjande i växtförädlingen av svarta vinbär på Balsgård. Metoden finns nu kommersiellt tillgänglig hos ScanBi Diagnostics AB och beskrivs översiktligt nedan.

RT-PCR-analys av reversionsvirus

Vid analys av reversionsvirus krävs ett representativt prov av växtmaterial från den planta som ska testas. Det går bra att analysera både blad och knoppar men ett prov bestående av fem vilande knoppar som samlas från fem olika kvistar har visat sig vara både enkelt att hantera och representativt med tanke på eventuell variation i förekomst av virus hos olika delar av plantan. Knopparna kan förvaras svalt om de ska analyseras inom en vecka eller vid -80°C för senare analys. Det första steget vid analys är extraktion och rening av RNA ur växtmaterialet. Därefter görs en omvänd transkribering av virus-RNA till en komplementär DNA-sträng genom att utnyttja PCR (polymerase chain reaction = polymeras kedjereaktion) och slumpmässiga ”primers”. Nästa steg är att detektera och kvantifiera mängden virus vilket görs genom RT-PCR (realtime-PCR). Med hjälp av ett BRV-specifikt ”primer-par” och en BRV-specifikt ”probe” amplifieras den komplementära DNA-strängen under ett cykliskt PCR-förlopp. Mängden amplifierad produkt kan därefter direkt mätas



Figur 2. Symptomen för gallkvalsterangrepp är mycket tydliga på svarta vinbärsbuskar under senvintern och tidig vår. Angripna knoppar sväller upp för att senare torka in. Dessa knoppar bör avlägsnas så fort de blir synliga för att på så sätt minska spridningen av gallkvalster som bär på reversionsviruset. Bilden visar angrepp på sorten 'Storklas'. Denna sort är extremt mottaglig både för gallkvalster och reversionsvirus och bör därför ej planteras i områden där gallkvalster förekommer. (Foto: Kimmo Rumpunen).

spektrofotometriskt via ökad fluorescens.

Erfarenheter vid användning av RT-PCR-analys av reversionsvirus i svarta vinbär

Drygt 100 selektioner och sorter har hittills testats i sortförsök och växtsamlingar på Balsgård. Metoden har visat sig vara både effektiv och pålitlig och potentiella resistenskällor mot reversion har identifierats.

Vid bedömning av gallkvalster samt analys av reversionsvirus i ett ekologiskt sortförsök som planterats på Balsgård 2006 angreps de första buskarna av gallkvalster 2009. Vid utvärdering 2010 var den nya skotska sorten 'Ben Finlay', den skotska selektionen SCRI 8944-13 och den ryska sorten 'Poesia' de enda sorterna som helt undgått angrepp (Tabell 1). Både 'Ben Finlay' och SCRI 8944-13 har en känd resistensgen mot gallkvalster (*Ce*-gen från krusbär, Brennan et al. 2009) men

huruvida samma gäller för 'Poesia' är okänt. 'Poesia' har i ett sortförsök i Litauen också undgått gallkvalsterangrepp (Sasnauskas et al. 2009) och kan därför vara av intresse för vidare utvärdering för sin motståndskraft mot gallkvalster. Reversionsvirus detekterades i en selektion vilket visar att viruset kan spridas mycket snabbt (eftersom det kunde detekteras redan år två efter det första konstaterade gallkvalsterangreppet). För att tillförlitligt kunna bedöma mottaglighet/motståndskraft mot gallkvalster och reversion hos sorterna i detta försök krävs ytterligare flera odlingsår.

En sort av svarta vinbär som befunnits vara extremt mottaglig både för gallkvalster och reversion är den vid fritidsodling mycket populära sorten "Storklas". Sorten kan av dessa anledningar ej rekommenderas för odling – åtminstone inte i områden där gallkvalster förekommer.

RT-PCR-analys av BRV i vinbär

har nyligen jämförts med standardmetoden (skott ympning) och befunnits vara tillförlitlig nog för att användas vid certifiering av svarta vinbärspantor inom EU (Dolan et al. 2011). Eftersom svarta vinbär kan angripas av flera olika virus som påverkar tillväxt och avkastning, varav reversion är det allvarligaste, bör förökningsmaterial av vinbär alltid vara certifierat.

Litteratur

- Brennan RM 1990. Currants and gooseberries (*Ribes*). Acta Horticulturae 290:459–487.
- Brennan RM & Gordon SL 2002. Future perspectives in blackcurrant breeding. Acta Horticulturae 585:39–45.
- Brennan RM, Jorgensen L, Gordon S, Loades K, Hackett C, Russell J. 2009. The development of a PCR-based marker linked to resistance to the blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis* Acari: Eriophyidae). Theoretical and Applied Genetics 118:205–211.
- Dolan A, MacFarlane SA, McGavin WJ, Brennan RM, McNicol JW 2011. Blackcurrant reversion virus. Validation of an improved diagnostic test, accelerating testing in breeding and certification of blackcurrants. Journal of Berry Research 1:201–208.
- Jones AT, Brennan RM, McGavin WJ, Lemmetty A 1998. Gallings and reversion disease incidence in a range of blackcurrant genotypes, differing in resistance to the blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis*) and blackcurrant reversion disease. Annals of Applied Biology 133:375–384.
- Jones AT & McGavin WJ 2002. Improved PCR detection of blackcurrant reversion virus in *Ribes* and further evidence that it is the casual agent of reversion disease. Plant Disease 86:1333–1338.
- Lehto K, Lemmetty A, Keränen M 2004. The long 3' non-translated regions of blackcurrant reversion virus RNAs are highly conserved between virus isolates representing different phenotypes and geographic origins. Archives of Virology 149:1867–1875.
- OEPP/EPPO 2008. Certification scheme for *Ribes*. Bulletin OEPP/EPPO 38:14–18.
- Pluta S & Zurawicz E 2002. Effects of reversion virus on the yield and fruit size in black currant (*Ribes nigrum* L.). Acta Horticulturae 585:393–396.
- Rumpunen K & Öberg E 2011. Svarta vinbär för ekologisk odling. Slutrapport för projekt finansierat av jordbruksverket 2005–2010. Rapport 2011:31. Landskap Trädgård Jordbruk Rapportserie, Sveriges Lantbruksuniversitet, Alnarp.
- Sasnauskas A, Trajkovski V, Strautina S, Tikhonova O, Siksnianas T, Rubinskiene M, Viskelis P, Lanauskas J, Valiuskaite A, Rugienius R, Bobinas C. 2009. Evaluation of blackcurrant cultivars and perspective hybrids in Lithuania. Agronomy Research (special issue II) 737–743.

Faktaruta

- Faktabladet är utarbetat inom LTJ-fakultetens område Växtförädling och Bioteknik, SLU Alnarp, www.ltj.slu.se
- Projektet är finansierat av av LTJ-fakulteten SLU Alnarp, Jordbruksverket och Scanbi Diagnostics AB. Det ingår också i ClimaFruit – ett transnationellt EG projekt (Interreg IVB) som syftar till att säkra en hållbar utveckling av bärproduktionen i Nordsjöregionen.
- Projektansvarig/författare: Kimmo Rumpunen, forskare, Hortikulturell växtförädling, SLU Balsgård
- Författare:
Kimmo Rumpunen, Område Växtförädling och Bioteknik [kimmo.rumpunen@slu.se];
Anders Dahlqvist, Scanbi Diagnostics AB, [anders.dahlqvist@scanbidiagnostics.com];
Gunilla Åhman, Scanbi Diagnostics AB, [gunilla.ahman@scanbidiagnostics.com]
- På webbplatsen <http://epsilon.slu.se> kan du hämta detta faktablad elektroniskt

