

## IDENTIFIKACIJA DVEH PATOTIPOV GLIVE *Verticillium albo-atrum* NA HMELJU Z MOLEKULSKIMI MARKERJI IN UMETNIMI OKUŽBAMI HMELJA

Sebastjan RADIŠEK<sup>1</sup>, Jernej JAKŠE<sup>2</sup>, Branka JAVORNIK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec,

<sup>2,3</sup>Biotehniška fakulteta, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Ljubljana

### IZVLEČEK

Hmeljeva uvelost je ena od najpomembnejših bolezni hmelja. Povzročata jo glivi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn, ki spadata med parazite prevodnega sistema hmelja in številnih drugih rastlin. Omenjeni glivi na hmelju izzoveta blago in letalno obliko obolenja v odvisnosti od patotipa glive, občutljivosti kultivarja in ekoloških razmer. V letu 1974 je bila v Sloveniji prvič identificirana blaga oblika hmeljeve uvelosti kot posledica okužb z omenjenima glivama, od leta 1997 pa letalna oblika *V. albo-atrum* v zahodnem delu Savinjske doline povzroča večjo gospodarsko škodo. V raziskavi smo analizirali seve glive *V. albo-atrum* in *V. dahliae* izolirane iz različno obolelega hmelja in drugih gostiteljskih rastlin. Z umetnimi okužbami testnih kultivarjev hmelja smo ugotovili razlike v virulenci med proučevanimi izolati. Pri proučevanju genetske variabilnosti izolatov smo uporabili AFLP molekulska tehnika, s katero smo ugotovili dve osnovni skupini, ki ju predstavljajo izolati *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. V skupini *V. albo-atrum* smo določili razlike med različno virulentnimi hmeljnimi izolati, kar z rezultati umetnih okužb hmelja jasno kaže na pojav dveh hmeljnih patotipov *V. albo-atrum* v Sloveniji.

Ključne besede: hmelj, hmeljeva uvelost, molekulska markerji, umetne okužbe, *Verticillium albo-atrum*

### ABSTRACT

#### IDENTIFICATION OF TWO *Verticillium albo-atrum* HOP PATHOTYPES USING MOLECULAR MARKERS AND ARTIFICIAL INOCULATIONS OF HOP

Hop wilt is one of the most important diseases of hop. It is caused by *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold and *Verticillium dahliae* Klebahn, which are among the tracheomycotic parasites of hop and other plants. These fungi induce mild and lethal forms of hop wilt, depending on the pathotype, sensitivity of cultivars and ecological factors. In Slovenia, the mild form of hop wilt was first identified in 1974 as a cause of infections by both mentioned fungi. Since 1997, the lethal form of *V. albo-atrum* in the west part of the Savinja valley has caused economic damage. In our research, we analysed strains of *V. albo-atrum* and *V. dahliae* isolated from infected hop plants and other hosts. By artificial inoculations of test hop cultivars, we determined differences in virulence among isolates. Genetic variability was evaluated by the AFLP molecular technique, in which we clearly distinguish *V. albo-atrum* and *V. dahliae* isolates into two groups. In the *V. albo-atrum* group, genetic differences were found between hop isolates in correlation with their virulence, indicating two *V. albo-atrum* hop pathotypes in Slovenia.

Key words: hop, hop wilt, molecular markers, artificial inoculations, *Verticillium albo-atrum*

## 1 UVOD

Hmeljeva uvelost je ena od najpomembnejših bolezni hmelja. Povzročata jo glivi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn, ki spadata med parazite prevodnega sistema hmelja in številnih drugih rastlin. V Evropi omenjeni

<sup>1</sup> mag., univ. dipl. inž. agr., Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

<sup>2</sup> dr., univ. dipl. inž. agr., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

<sup>3</sup> prof. dr., prav tam

glivi povzročata največ škode na hmelju, zato so njuni hmeljni patotipi uvrščeni na evropsko (EPPO) in slovensko listo karantenskih škodljivih organizmov. Razlog, da sta glivi izredno nevarni hmelju je v tem, da še vedno ne poznamo ustreznega fungicida s katerim bi ju lahko uspešno preprečevali ali zdravili obolele rastline. Prav tako lahko s trajnimi organi preživita neugodne razmere tudi po več let, njun infekcijski pritisk v hmeljiščih hitro narašča in počasi pojenja, zaradi česar se zelo hitro širita v nasadih in zunaj njih z različnimi agrotehničnimi ukrepi. Tako je v primeru kontaminacije hmeljišča sajenje odpornih ali tolerantnih kultivarjev in izvajanje fitosanitarnih ukrepov edini uspešen način zatiranja te bolezni. V letu 1974 je bila v Sloveniji prvič identificirana blaga oblika hmeljeve uvelosti kot posledica okužb z omenjenima glivama (Dolar, 1975), od leta 1997 pa letalna oblika *V. albo-atrum* v zahodnem delu Savinjske doline povzroča večjo gospodarsko škodo. Bolezen je hitro napredovala in se razširila na ostala hmeljišča neodvisno od posajenega kultivarja. Raziskave hmeljeve uvelosti so pokazale, da so razlike med pojavom blage oz. letalne oblike odvisne od virulence povzročitelja, občutljivosti kultivarjev in ekoloških razmer od katerih sta najpomembnejša nizka temperatura tal in gnojenje z dušičnimi gnojili (Isaac in Keyworth, 1948; Sewell and Wilson, 1974; Talboys, 1972). Identifikacija in ovrednotenje virulence povzročitelja je pomembna pri izvajanju fitosanitarnih ukrepov in v žlahtnjenju rastlin. Pri hmeljnih izolatih *V. albo-atrum* se je to najuspešneje določevalo s pomočjo patogenih testov, ki se izvajajo na različno občutljivih kultivarjih hmelja (Clarkson in Heale, 1985; Sewell and Wilson, 1984). Zaradi dolgotrajnosti in delovne zahtevnosti patogenih testov so raziskovalci poskušali razviti hitrejše metode od katerih so največ rezultatov pokazale molekulske tehnike (Carder in Barbara, 1991; Griffen *et al.*, 1997, Nazar *et al.*, 1991).

S pojavom letalne oblike hmeljeve uvelosti v Sloveniji, katero povzroča gliva *V. albo-atrum*, se je pojavila domneva, da imamo dva hmeljna patotipa te glive, ki povzročata različni obliki hmeljeve uvelosti. V ta namen smo v raziskavi z uporabo patogenih testov ovrednotili virulenco različnih hmeljnih izolatov ter jih nato analizirali z uporabo novejših molekulske metode AFLP.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Zbiranje raziskovalnega materiala

V raziskavi smo zajeli zbirko izolatov gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. Sevi so bili izolirani iz različno (blaga/letalna oblika) obolelih hmeljnih rastlin v letih 1998 do 2000 na glavnih pridelovalnih območjih hmelja. V analizo smo vključili tudi izolata *V. albo-atrum*, ki smo ju izolirali iz kumar in surfinij ter izolat *V. dahliae* iz paprike.

### 2.2 Umetne okužbe testnih kultivarjev hmelja

Poskus je potekal na raziskovalni postaji Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, ki je izolirana od ostalih hmeljišč in ima ugodne mikroklimatske razmere za razvoj hmeljeve uvelosti. Pri tem smo uporabili 4 testne kultivarje Wye Target, Fuggle, Cicero in Celeia z znanim odzivom na hmeljevo uvelost (Clarkson in Heale, 1985; Radišek *et al.*, 2001b; Sewell and Wilson, 1984). Testirali smo 8 izolatov glive *V. albo-atrum*, ki smo jih izolirali iz rastlin z letalno obliko bolezni in 4 izolate iste glive, ki so bili izolirani iz rastlin obolelih z blago obliko hmeljeve uvelosti. Deset rastlin vsakega kultivarja smo inokulirali s posameznim izolatom. Pri tem smo uporabili metodo inokulacije injiciranja inokula v prevodni sistem rastlin. Kot inokulum smo uporabili suspenzijo konidijev, ki smo jo s pomočjo svetlobnega mikroskopa in Thoma komore umerili na koncentracijo  $2 \times 10^6$  konidijev/ml. Kontrolne rastline smo inokulirali s sterilno destilirano vodo. Bolezenska znamenja smo ocenjevali v tedenskih presledkih kot deleže poškodovane površine listov s skalo od 0-5. Za posamezno rastlino smo izračunali indeks obolenja s pomočjo Townsend-Heubergerjeve formule. Dobljene podatke smo statistično ovrednotili z analizo variance.

### 2.3 AFLP molekulska analiza

Izolate smo najprej namnožili v tekočem gojišču, kateremu je sledila izolacija DNA po SDS protokolu, ki sta ga razvila Lee in Taylor (1990) z določenimi modifikacijami. Uporabljena je bila optimizirana AFLP metoda za analizo gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* (Radišek *et al.* 2001a). Genomsko DNA (500 ng) smo prek noči inkubirali ob zastopanosti restrikcijskih endonukleaz (*EcoRI* in *MspI*) na temperaturi 37 °C. Na nastale restrikcijske fragmente smo v postopku ligacije dodali encimsko specifične adapterje, ki služijo kot tarčno mesto za začetne oligonukleotide v polimerazni verižni reakciji (PCR). Preamplifikacijo smo izvedli z *EcoRI* in *MspI* začetnimi oligonukleotidi brez dodanih selektivnih nukleotidov. Sledila je selektivna amplifikacija, kjer smo uporabili začetne oligonukleotide z dvema selektivnima nukleotidoma. Namnožene PCR produkte smo ločili z denaturacijsko poliakrilamidno elektroforezo in določili s srebrovo detekcijo. Dobljene rezultate smo ustrezno statistično ovrednotili z računalniškim programom NTSYS 2.02-pc. Iz matrik osnovnih podatkov AFLP analize smo izračunali Jaccardove koeficiente sorodnosti, ki so služili kot osnova za izdelavo dendrogramov z metodo neponderirane aritmetične sredine (UPGMA).

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3.1 Določanje virulence izolatov glive *V. albo-atrum* z umetnimi okužbami hmelja

V poskusu smo 12 hmeljnim izolatom določali virulenco z inokulacijo testnih kultivarjev Wye Target, Fuggle, Cicero in Celeia. Prva bolezenska znamenja so se izrazila 4 tedne po inokulaciji v obliki kloroznega in nekroznega tkiva med listnimi žilami in na robovih listov. Vsi izolati, ki smo jih izolirali iz rastlin z letalno obliko hmeljeve uvelosti, so inducirali isto obliko obolenja na občutljivima kultivarjema Fuggle in Celeia ter blažjo obliko boleznj na ostalima dvema odpornejšima kultivarjema. Štirje izolati pridobljeni iz rastlin, ki so izražale blago obliko hmeljeve uvelosti, so povzročili le blažja obolenja na občutljivima kultivarjema, medtem ko na odpornejših Wye Target in Cicero bolezenskih znamenj ni bilo. Na osnovi ocenjevanj in izračunov indeksov obolenj so se izolati razdelili v dve patogeni skupini, ki smo ju poimenovali PG1 in PG2 (Preglednica 1).

Preglednica 1: Razdelitev izolatov *V. albo-atrum* glede na povprečne vrednosti indeksov obolenj testnih kultivarjev 42 dni po inokulaciji

Table 1: Classification of *V. albo-atrum* isolates according to the mean values of severity indexes on test cultivars 42 days after inoculations

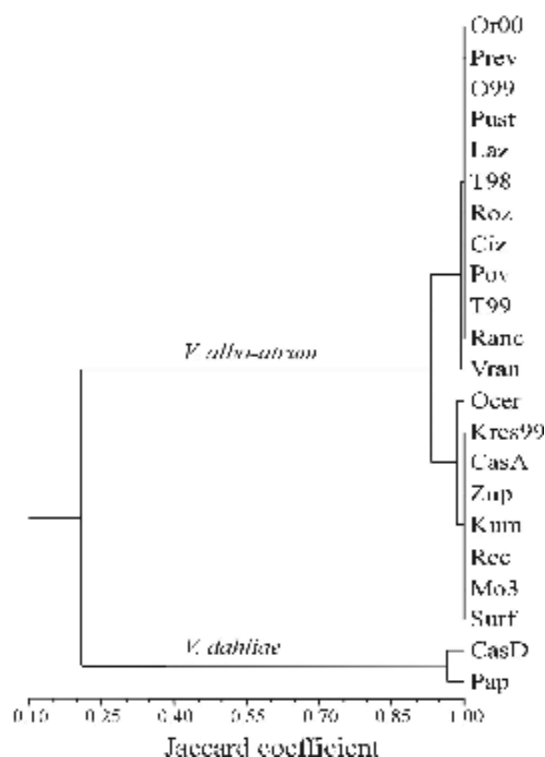
Izolat	Povprečje <sup>x</sup>	Patogena skupina
Or00	29,4a	PG2
Prev	29,5a	PG2
Pust	27,8a	PG2
Vran	25,2a	PG2
Roz	29,1a	PG2
Ciz	28,0a	PG2
Ranc	29,4a	PG2
Tr99	27,1a	PG2
Ocer	2,1b	PG1
Kres99	2,4b	PG1
Zup	1,9b	PG1
Rec	2,2b	PG1

<sup>x</sup> Povprečne vrednosti označene z isto črko se med seboj statistično ne razlikujejo (Duncanov test; P = 0,05)

<sup>x</sup> Means followed by the same letter are not significantly different (Duncan's test; P = 0,05)

### 3.2 AFLP analiza

V prvi stopnji molekulske analize smo na 7 izolatih orientacijsko preizkusili 39 kombinacij začetnih oligonukleotidov. Pri tem smo skupno namnožili 1268 DNA fragmentov v velikosti od 50 do 800 baznih parov. S posamezno kombinacijo smo, ob upoštevanju dobro ločljivih PCR produktov, namnožili od 17 do 51 fragmentov. Na osnovi polimorfizma med različno virulentnimi izolati iz hmelja smo za analizo vseh 22 izolatov izbrali 7 kombinacij. Največ polimorfni fragmentov smo določili med obema vrstama gliv, kjer je koeficient variabilnosti znašal 81,3 %. Pri *V. dahliae* smo jasno določili razlike med izolatoma iz hmelja in paprike. Skupina izolatov *V. albo-atrum* se je razdelila na dve podskupini, od katerih prva vsebuje izolate iz letalne oblike hmeljeve uvelosti, druga pa izolate iz blage oblike hmeljeve uvelosti in izolata iz kumar ter surfinij (slika 1). V obeh podskupinah izolatov smo ugotovili manjše variabilnosti med posameznimi izolati, vendar nedvoumno grupiranje različno virulentnih izolatov *V. albo-atrum* iz hmelja nakazuje njihovo genetsko različnost in s tem potrjuje identifikacije dveh patotipov omenjene glive.



Slika 1: Dendrogram osnovan na osnovi AFLP analize 20 izolatov *Verticillium albo-atrum* in 2 izolatov *V. dahliae*.

Figure 1: Dendrogram generated from AFLP analysis of 20 *Verticillium albo-atrum* isolates and 2 *V. dahliae* isolates

## 4 SKLEPI

Zaradi pojava dveh oblik hmeljeve uvelosti v Sloveniji, ki ju povzroča gliva *V. albo-atrum*, smo sumili na zastopanost dveh različno virulentnih patotipov te glive. V ta namen smo v raziskavi uporabili metodo umetnega okuževanja testnih kultivarjev hmelja in molekulske analizo. Z umetnimi okužbami smo dokazali razlike v virulenci in pri tem določili dve patogeni skupini izolatov PG1 in PG2.

V diagnostiko gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* smo vpeljali AFLP molekulske analizo in pri tem ovrednotili genetsko sorodnost med obema vrstama in znotraj njih. Pri tem smo ugotovili visoko raven genetskega polimorfizma med obema vrstama, določili razlike med

izolati iz različnih gostiteljskih rastlin obeh gliv in razlike med izolati *V. albo-atrum*, ki povzročajo blago in letalno obliko hmeljeve uvelosti.

Z raziskavo smo dokazali, da je vzrok pojava dveh oblik hmeljeve uvelosti v Sloveniji, v dveh različno virulentnih patotipih glive *V. albo-atrum*.

## 5 LITERATURA

- Carder, J. H., and Barbara, D. J. 1991. Molecular variation and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) within and between six species of *Verticillium*. *Mycological Research* 8: 935-94.
- Clarkson, J. M., and Heale, J. B. 1985. Pathogenicity and colonization studies on wild-type and auxotrophic isolates of *Verticillium albo-atrum* from hop. *Plant Pathology* 34: 119-128.
- Dolinar M. 1975. Uvelost hmelja (*Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae*). Poročilo za leto 1975. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 12 str.
- Griffen, A. M., Bainbridge, B. W., and Heale, J. B. 1997. Ribosomal, mitochondrial and amplified DNA polymorphisms in *Verticillium albo-atrum* pathogenic to hops, lucerne and other plants. *Mycological Research*, 101: 1085-1091.
- Isaac, I., and Keyworth, W. G. 1948. *Verticillium* wilt of the hop (*Humulus lupulus*). A study of the pathogenicity of isolates from fluctuating and from progressive outbreaks. *Annals of Applied Biology* 35: 243-249.
- Lee, S. B., Taylor, J. W., 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. V: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky D. H., White J. J., Eds T. J. (eds). San Diego, Academic Press: 282-287.
- Nazar, R. N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D., Robb, J. 1991. Potential use of PCR-amplified detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 39: 1-11.
- Radišek, S., Jakše, J., and Javornik, B. 2001a. Optimisation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*). Zbornik, Biotehniške fakultete, Univerza v Ljubljani, 77-2: 139-146.
- Radišek S., Dolinar M., Simončič A., Žolnir M., 2001b. Stanje in aktivnosti na področju hmeljeve uvelosti (*V. albo-atrum* Reinke & Berthold in *V. dahliae* Klebahn) v Sloveniji v letu 2000. Hmeljarski bilten, 8: 43-46.
- Sewell, G. W. F., and Wilson, J. F. 1974. Hop wilt, soil temperature and nitrogen. East Malling Research Station Annual Report for 1973: 203-204.
- Sewell, G. W. F., and Wilson, J. F. 1984. The nature and distribution of *Verticillium albo-atrum* strains highly pathogenic to the hop. *Plant Pathology* 33: 39-51.
- Talboys, P. W. 1972. Resistance to vascular wilt fungi. *Proceedings of the Royal Society (London)* 181: 319-333.