

**IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA GLIV *VERTICILLIUM ALBO-ATRUM*
REINKE & BERTHOLD IN *VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEBAHN IZ HMELJA
(*HUMULUS LUPULUS* L.)**

Andreja ČERENAK¹, Marta DOLINAR², Magda RAK³

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec

IZVLEČEK

Glivici *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn sta bili v Sloveniji izolirani in identificirani iz hmelja leta 1974. Zaradi pojava bolj patogene oblike *Verticillium* spp. na območju Gomilskega (Spodnja Savinjska dolina) smo želeli povzročiteljici hmeljeve uvelosti ponovno izolirati. Pri prenosu glive iz *in vivo* v *in vitro* razmere smo ugotavljali najustreznejši čas inkubacije okuženega rastlinskega materiala in tehniko prenosa. Za najprimernejšo se je izkazala dvodnevna inkubacija. Uporabili smo dve tehniki prenosa gliv v sterilne razmere, pri čemer se je direktni prenos okuženega tkiva izkazal za znatno boljšega. V Šmartnem pri Slovenj Gradcu se redno pojavlja blaga oblika hmeljeve uvelosti, ki jo povzročata obe glivici. Iz vzorca, nabranega na omenjeni lokaciji, smo izolirali *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold ter *Verticillium dahliae* Klebahn in ju po 20 dnevih inkubacije določili na podlagi trajnih organov (trajni micelij ali mikrosklerocij). V hmeljnih steblih (trtah), nabranih na območju Gomilskega, kjer se pojavlja bolj patogen sev, smo zazdaj ugotovili le *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold.

Ključne besede: hmelj (*Humulus lupulus* L.), hmeljeva uvelost, identifikacija, izolacija, *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold, *Verticillium dahliae* Klebahn.

ABSTRACT

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI *VERTICILLIUM*
ALBO-ATRUM REINKE & BERTHOLD AND *VERTICILLIUM DAHLIAE*
KLEBAHN ON HOPS (*HUMULUS LUPULUS* L.)**

Fungi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold and *Verticillium dahliae* Klebahn were first time isolated and identified on hops in Slovenia in the year 1974. Due to outbreak of more pathogenic type of *Verticillium* sp. in Gomilsko area (Savinja Valley, Slovenia) we wanted to isolate and identify this new type of verticillium wilt. Transfer of the fungus from *in vivo* in *in vitro* conditions enabled us to study different methods of transfer and the duration of incubation. Direct transfer of infected tissue was considerable better than other tested methods. Two days incubation proved as the most convenient. In Šmartno near Slovenj Gradec the fluctuating type of verticillium wilt appears ordinary and is caused by *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold and *Verticillium dahliae* Klebahn. They were identified on the bases of resting organs (resting mycelium and microsclerotia) after 20 days of *in vitro* cultivation. On hop stems (branches) collected in Gomilsko area where the more pathogenic strain appears only *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold was present.

Key words: hop (*Humulus lupulus* L.), identification, isolation, *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold, *Verticillium dahliae* Klebahn, verticillium wilt

¹ dipl. biol., SI-3310, Žalec, Cesta Žalskega tabora 2

² mag., dipl. biol., prav tam

³ dipl. ing. kmet., prav tam

1 UVOD

Verticillium albo-atrum Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn (skupina Deuteromycotina), vretenasti talni glivi, sta povzročiteljici hmeljeve uvelosti (uvrščeni na A2 seznam karantenskih škodljivih organizmov). V uravnoteženih razmerah nista nevarni, s spremenjenimi ekološkimi razmerami ali z uvajanjem občutljivejših kultivarjev pa se infekcijski potencial obeh poveča. Obe glivici preživita v obliki micelija v tleh ali na rastlinskih ostankih gostitelja. V razvoju patogena je temperatura eden izmed pomembnejših dejavnikov (optimalna temperatura 17-20°C). Pri ustreznih razmerah so trosi glivic (konidiji) ali micelij sposobni prodreti skozi ranjeno povrhnjico in mlade, nepoškodovane korenine, ki še nimajo dovolj lignificirane celične membrane, v prevajalno tkivo. V njem se razraste micelij (traheomikoza), ki onemogoča pretok vode in v njej raztopljenih hranilnih snovi. Posledica zamašitve prevajalnega sistema je venenje in celo odmiranje rastline. Hmeljeva uvelost se pojavlja v blagi (fluctuating wilt) in letalni (bolj virulentni) obliki (progressive wilt). Pri blagi obliki se pojavlja odebeljenost rozg od korenike navzgor, rastlina pa začne naslednje leto z normalnim razvojem. Pri bolj virulentni obliki so znamenja obolenja podobna (zastopana vso rastno dobo), le da okužena rastlina popolnoma propade. Sami vizualni znaki (zvijanje listov navzgor, rumenenje in rjavenje listnih robov, odpadanje le-teh) niso zanesljivi, saj se ujemajo s fiziološkimi motnjami rastline. Bolezen je zelo nevarna, zlasti pri hmelju, ki je večletna rastlina. Glivici namreč okužujeta še druge rastline: paradižnik, krompir, kumare, papriko, meto, sladkorno peso, lucerno, oljno ogrščico, oljko in nekatere okrasne rastline. Glivici sta bili v Sloveniji prvič izolirani iz hmelja že leta 1974 (Dolinar, 1975) in sicer povzročiteljici blage oblike. Zaradi pojava bolj virulentne oblike *Verticillium* spp. na območju Gomilskega, smo želeli povzročiteljici hmeljeve uvelosti ponovno izolirati in ju identificirati.

2 MATERIALI IN METODE

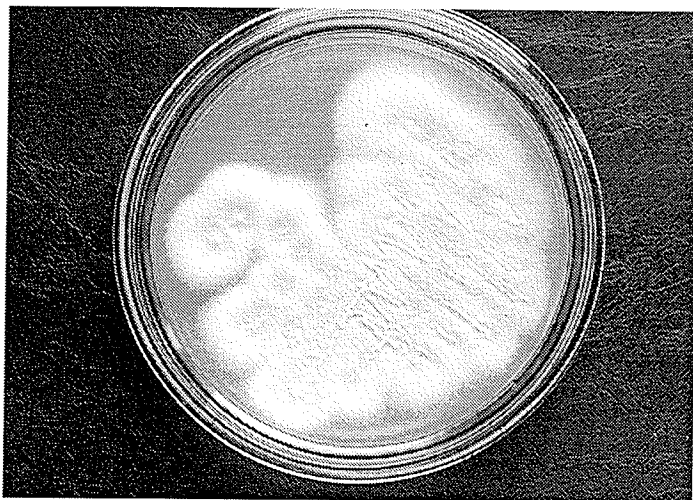
Glivici smo izolirali s prenosom v razmere *in vitro*. Uporabili smo komercialno pripravljen PDA substrat (potato-dextrose agar) z dodanim antibiotikom (streptomycin sulfat), umerjen na pH 4,8. Za izvorni material smo uporabili obolela stebela hmeljnih rastlin (trt), pri katerih smo v rastni dobi opazili značilna znamenja uvelosti hmelja. Vzorce smo nabrali na območju Gomilskega in Šentruperta v Savinjski dolini ter Šmartnega pri Slovenj Gradcu. Uporabili smo dve tehniki prenosa glive v sterilno okolje. Rozge, razpolovljene po dolžini, smo inkubirali v vlažni atmosferi, pri sobni temperaturi in dnevni svetlobi. S prevajalnega dela stebela smo po določenem času inkubacije postrgali bel, puhast micelij. V primeru, da smo pod lupo opazili značilno vretenasto razrast trosonoscev glive iz rodu *Verticillium*, smo micelij iz omenjenih vzorcev nacepili na poševna gojišča. Pri drugi tehniki prenosa patogena v tkivno kulturo pa smo s sterilno tehniko na gojišča direktno nanесли koščke okuženega prevajalnega tkiva trt, nabranih iz devetih različno lociranih hmeljišč. Pri prvi metodi prenosa glive smo primerjali dvo-, štiri- in sedemdnevni čas inkubacije. Po 14-dnevni inkubaciji smo s svetlobnim mikroskopom ločevali obe glivici na podlagi trajnih organov, na osnovi katerih je glivici sploh mogoče razlikovati.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

S primerjavo različne dolžine trajanja inkubacije smo ugotovili, da je najustreznejša dvodnevna inkubacija. Podaljševanje časa inkubacije se odraža z večjo zastopanostjo

drugih, neželenih organizmov (saprofitov) na vzorcih trt. Za tehniko prenosa glive v sterilne razmere se je izkazal znatno boljši direktni prenos okuženega tkiva na gojišče (brez predhodne inkubacije). Omenjena metoda se je izkazala za uspešnejšo, saj smo z rastlinskim materialom manj manipulirali in s tem zmanjšali verjetnost okužbe.

V Šmartnem pri Slovenj Gradcu se redno pojavlja blaga oblika hmeljeve uvelosti, ki jo povzročata obe glivici. Iz vzorca, nabranega na omenjeni lokaciji, smo izolirali *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold (slika 1) in *Verticillium dahliae* Klebahn in ju po 20 dnevih inkubacije določili na podlagi trajnih organov. *Verticillium dahliae* Klebahn oblikuje mikrosklerocije, *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold pa odebeljen micelij temne barve. Razlikovali pa smo ju tudi glede na velikost konidijev (2-4 μm) ter število fialid (4-7). Fialide so vejasto razvejane in potekajo iz trosonoscev (konidioforov). Na vsaki fialidi je samo en konidij, ki je enoceličen, prozoren in elipsoidne oblike, lahko pa je tudi enkrat septiran. V rozgah, nabranih na območju Gomilskega, kjer se pojavlja letalna (virulentna) oblika hmeljeve uvelosti, smo zazdaj ugotovili le *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold.



Slika 1: *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold; bel, puhast micelij
(foto: J. Rode)

Figure 1: *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold; white, puff micelium
(photo: J. Rode)

Čista kultura patogena, prenesena v razmere *in vitro*, je izrednega pomena za nadaljnje proučevanje virulentnosti glive ter določitve seva oz. sevov, zastopanih v slovenskih hmeljiščih. Zazdaj še ni na voljo pripravka, s katerim bi učinkovito preprečili pojav in širjenje glivic. Najuspešnejši način, s katerim se v svetu borijo proti hmeljevi uvelosti, je vzgoja odpornejših (tolerantnih) kultivarjev, kar pa bo v prihodnje tudi ena izmed prioritarnih nalog slovenskih žlahtnjiteljev hmelja.

4 SKLEPI

Na podlagi opravljenega poskusa lahko sklenemo:

- S primerjavo različne dolžine trajanja inkubacije smo ugotovili, da je najustreznejša dvodnevna inkubacija.
- Za tehniko prenosa glive v sterilne razmere se je izkazal znatno boljši direktni prenos okuženega tkiva na gojišče (brez predhodne inkubacije).
- Iz vzorca, nabranega v Šmartnem pri Slovenj Gradcu, smo izolirali *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn. V rozgah, nabranih na območju Gomilskega, kjer se pojavlja letalna oblika hmeljeve uvelosti, smo zazdaj ugotovili le *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold.

Izolacija in identifikacija glivic *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn je izrednega pomena, saj omogoča nadaljnje raziskave virulentnosti ter določitve seva oz. sevov glivic, zastopanih v slovenskih hmeljiščih.

5 LITERATURA

- Data Sheets on Quarantine Pests. *Verticillium* spp. on hops.- Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003.
- Dolinar, M. (1975): Uvelost hmelja (*Verticillium albo-atrum* in *dahliae*).- Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, poročilo za leto 1975, 12 s.
- Dolinar, M. / Žolnir, M. (1998): Hmeljeva uvelost (*Verticillium* sp.) v hmeljiščih.- Hmeljar (3-4), s. 38-39.
- Heale, J. B. (1988): *Verticillium* spp., the cause of vascular wilts in many species.- Advances in Plant Pathology (vol. 6), s. 291-311.
- Karapapa, V. K. / Bainbridge B. W. / Heale, J. B. (1997): Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape.- Mycol. Res. 101 (11), s. 1281-1294.