

ŽLAHNJENJE HMELJA NA ODPORNOST NA BOLEZNI: Postopki in tehnike pri selekciji križancev

Sebastjan RADIŠEK¹, Andreja ČERENAK¹, Branka JAVORNIK²

UDC / UDK 633.791:632.4 (497.4)(045)
pregledni znanstveni članek / review article
prispelo / received: 25.10.2007
sprejeto / accepted: 12.12.2007

IZVLEČEK

Cilj vzgoje novih sort hmelja na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije je povečana količina in kvaliteta pridelka (grenčica, aroma) ter odpornost na bolezni in škodljivce. V prispevku so predstavljeni postopki selekcij križancev na najpomembnejše bolezni hmelja - hmeljeva peronospora, hmeljeva pepelovka in hmeljeva uvelost.

Ključne besede: hmelj, žlahtnjenje, bolezni, odpornost

HOP DISEASE RESISTANCE BREEDING: Procedures and techniques in selection of seedlings

ABSTRACT

The breeding programme of new hop varieties at the Slovenian Institute for Hop Research and Brewing is concentrated to the improved quantity and quality (bitterness, aroma) of the yield and resistance against diseases and pests. In our article, procedures in selection of seedlings to the most important hop diseases are (downy mildew, powdery mildew and Verticillium wilt) are outlined and discussed.

Keywords: hop, breeding, diseases, resistance

1 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec;
sebastjan.radisek@ihps.si

2 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

1 UVOD

Odpornost rastlin na bolezni je eden izmed pomembnih dejavnikov integriranega varstva rastlin in predstavlja glavni izziv pri žlahtnjenju novih sort. Na splošno velja, da je ocenjevanje deleža okuženega tkiva dober pokazatelj odpornosti rastlin. Vsekakor pa delež okuženega tkiva ni rezultat le stopnje odpornosti rastlin ampak tudi interakcij z ostalimi dejavniki, med katerimi lahko omenimo koncentracijo inokula, neenakomerna razporeditev inokula, vitalnost rastline in vplive okolja. Tako je uporaba ustreznih selekcijskih metod in razumevanje interakcij na nivoju rastlina-patogen nujna za vzgojo odpornih rastlin.

Žlahtnjenje hmelja ima na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) več kot 50-letno tradicijo, rezultati dela pa se kažejo v 12 lastnih sortah hmelja. Danes je nad 95% slovenskih hmeljišč zasajenih s slovenskimi sortami hmelja, od katerih največji delež z več kot 60 % predstavlja sorta Aurora. Prvotno je bil program vzgoje odpornih sort osredotočen predvsem na dve glavni bolezni; hmeljevo peronosporo (*Pseudoperonospora humuli* (Miyabe & Takah.) G.W. Wils.) in hmeljevo pepelovko, ki jo povzroča gliva *Podosphaera macularis* Wallr. U. Braun & Takam. Od leta 1997, ko je na območju zahodnega dela Savinjske doline prišlo do izbruha in širjenja letalne oblike hmeljeve uvelosti [8] je eden izmed glavnih ciljev žlahtnjenja tudi odpornost na omenjeno bolezen.

V članku so predstavljene selekcijske metode, ki se uporabljajo pri vzgoji novih sort hmelja.

2 SELEKCIJA NA HMELEJEVO PEPELOVKO

Med glivo *Podosphaera macularis* in hmeljno rastlino je potrjena »gen za gen« interakcija, v kateri so odkriti različni geni odpornosti (RB, R1, R2, R3, R4, R5, R6) in njim ustrezni patotipi [4, 10, 11]. V tem sistemu je del R genov aktiven pri interakciji z določenimi patotipi in neaktiven pri drugih patotipih. Kadar populacijo patogena tvorijo različni patotipi ravno ti neaktivni geni dajejo zlahka občutek, da gre za pojav delne odpornosti. Glede na to se je potrebno pri umetnih okužbah rastlin v tovrstnih odnosih izogniti uporabi mešanic različnih patotipov in uporabiti en patotip s čim višjo stopnjo patogenosti oz. širino virulence [7]. Pri selekcijah na odpornost je prav tako pomembno, da omogočajo hkratno testiranje večjega števila genotipov. V primeru hmeljeve pepelovke je to možno izvesti na mladih sejančkih, saj se R geni izražajo tudi v mladem tkivu [2, 3].

Selekcijo na hmeljevo pepelovko izvajamo v rastlinjaku. Kot vir okužbe se uporablja glivni izolat, ki ga pridobimo iz okuženih storžkov v hmeljiščih v predhodnem letu. Izolat namnožimo na hmeljnih rastlinah občutljivih sort, ki so posajene v loncih (Magnum, Northern Brewer, Southern Star,...). Po fazi dormance se inokulatorske rastline en mesec pred sejanjem semen hmelja prestavijo v rastlinjak, kjer se ob primernih pogojih dobro razrastejo in postanejo močno okužene s hmeljevo pepelovko. Ko sejančki dosežejo velikost 15-20 cm, namestimo med njih kot vir okužbe inokulatorske rastline. V zadnjih dveh letih smo vpeljali tudi okuževanje s suspenzijo spor, katere prednost je zagotavljanje enakomerne razporeditve in koncentracije inokula. Inokulum pripravimo s spiranjem konidijev iz okuženih listov inokulatorskih rastlin z 0,01 % (vol/vol) raztopino Tween 20. Suspenzijo spor umerimo s Thoma števno komoro na koncentracijo 50.000 konidijev/ml. Rastline okužimo z nanosom suspenzije z ročno razpršilko. Približno po 2-3 tednih pričnemo s selekcijo in ocenjevanjem sejančkov. Družine in posamezne

sejančke ocenimo z lestvico od 0 do 4 glede na delež okužene listne površine s hmeljevo pepelovko (0 = 0%, 1 = ≤ 10%, 2 = 11-30%, 3 = 31-60%, 4 = > 60%). Vse rastline ocenjene s 3 ali 4 uničimo, rastline z nižjimi ocenami pa nadaljujejo postopek vzgoje novih sort.

3 SELEKCIJA NA HMELJEVO PERONOSPORO

Oomiceta *Pseudoperonospora humuli* je eden izmed najpomembnejših patogenov v pridelovanju hmelja. Povzročča lokalizirane infekcije listja, cvetov in storžkov ter sistemične infekcije, katerih rezultat so klorotični poganjki, okrnjeni v rasti ('kuštravci') in propadanje koreninskega sistema. Pri rastlinah so znani različni tipi genetske odpornosti na oomicete, ki so določeni na podvrstnem ali sortnem nivoju (specifična odpornost sorte na sev), ali na vrstnem oz. rodovnem nivoju (negostiteljska ali nespecifična odpornost). Glede na opravljena opazovanja je odpornost hmelja na hmeljevo peronosporo kvantitativna lastnost, ki je kontrolirana poligeno [6]. Znana je različna ekspresija odpornosti hmeljnega tkiva, saj so nekatere sorte precej odporne na sistemične infekcije korenike in hkrati občutljive na okužbo storžkov ter obratno [9]. Poleg omenjenega je pri odpornosti potrebno omeniti še nejasnost vloge spolne faze (oospore) in ostalih genetskih mehanizmov pri fiziološki specializaciji patogena.

Na IHPS se selekcija na hmeljevo peronosporo izvaja na sejančkih po končani selekciji na hmeljevo pepelovko. Vir okužbe predstavljajo sistemično okuženi primarni in sekundarni poganjki (kuštravci), ki jih spomladi nabereмо v hmeljiščih. Sporulacijo pospešimo s škropljenjem kuštravcev s sterilno destilirano vodo in inkubacijo v plastičnih vrečkah čez noč pri sobni temperaturi in v temi. Inokulum pripravimo s spiranjem sporangijev iz listov s sterilno destilirano vodo, nakar suspenzijo umerimo s Thoma števno komoro na koncentracijo 50.000 sporangijev/ ml. Rastline okužimo s pršenjem z ročno razpršilko in čez noč pokrijemo s plastično folijo, s čimer zagotovimo visoko zračno vlažnost. Po 6-8 dnevih se pojavijo prvi znaki infekcije na listih, vendar pa se selekcija izvede šele, ko se razvijejo terminalni kuštravci (po 14-21 dnevih). Vse sejančke z razvitimi kuštravci ali visoko okuženostjo listov izločimo, odpornost družin sejančkov pa se zabeleži kot odstotek selekcioniranih rastlin.

4 SELEKCIJA NA HMELJEVO UVELOST

Hmeljeva uvelost je sistemska bolezen, ki jo povzročata talni glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. Glivi vstopita v rastline z neposredno penetracijo v ravnih regijah korenin ali skozi poškodbe, ki olajšajo dostop do prevodnega sistema. Rastline prizadeneta z akumulacijo biomase v ksilemu kar otežuje oskrbo z vodo in hranili. Ob tem tvorita fitotoksine in spekter različnih encimov za razgradnjo celičnih sten, kot so pektinaze, polisaharidaze in proteinaze. Za razvoj bolezni morata biti zadoščena dva pogoja, in sicer (1) vstop glive v prevodni sistem in (2) naselitev glive v prevodnem sistemu. Glede na to se vsak mehanizem gostiteljske rastline, ki pripomore k preprečitvi vstopa patogena v prevodno tkivo ali omejitvi širjenja patogena po rastlini smatra kot del odpornosti na hmeljevo uvelost [14]. Mehanizmi odpornosti, ki vplivajo na prvi pogoj so akumulacija kaloznega tkiva okrog penetracijske hife (tvorba ligninskih gomoljev) in tvorjenje fitoaleksinov. Mehanizmi, ki se pojavijo po začetni infekciji prevodnega sistema pa so tvorjenje til, gelov sinteza fitoaleksinov in nastanek oksidacijskih reakcij [1, 14].

Obrambne reakcije rastlin pred vstopom patogena v prevodno tkivo niso specifične in jih srečamo pri večini gostiteljskih rastlin, medtem ko v primeru vstopa patogena v prevodno tkivo prihaja do specifičnega odziva, kar opazimo kot razlike v odpornosti posameznih sort [13].

Pri hmelju sta znana dva bolezenska sindroma, letalni (progresivni) in blagi sindrom, katerih razvoj je pogojen z virulenco patogena, občutljivostjo hmeljnih sort in vpliva okolja [5, 12, 14]. Hmeljeva uvelost, ki jo povroča *V. dahliae* je relativno redka in se odraža z blagimi simptomi, medtem ko *V. albo-atrum* kaže večjo preferenco za hmelj in povzroča glavno izbruhov tako letalne kot blage oblike bolezni. Do blage oblike prihaja ob okužbah občutljivih sort hmelja z manj virulentnimi izolati ali pri tolerantnih sortah okuženih z zelo virulentnimi izolati. Letalna oblika bolezni se razvije iz okužb občutljivih sort hmelja z zelo virulentnimi izolati.

Preizkušanje odpornosti hmeljnih genotipov se na IHPS izvaja na prostorsko izolirani lokaciji pri zunanjih pogojih ali pozimi v kontroliranih pogojih rastišnih komor. Rastlinski material predstavljajo rastline, vzgojene z zelenim razmnoževanjem, stare vsaj 1 leto in posajene v lončke. Vsako leto testiramo skupno 30-40 genotipov hkrati z referenčnimi sortami, ki vključujejo občutljivi sorti Fuggle in Celeio, delno odporno sorto Wye Challenger in odporno Wye Target. Za inokulacijo uporabljamo vsaj 3 visoko virulentne izolate glive *V. albo-atrum* (patotip PV1; genotip PG2), ki povzročajo letalno obliko bolezni. Inokulum pripravimo s 5 dnevnim gojenjem kultur izolatov v tekočem gojišču (General fungal medium; [15]) na rotacijskem stresalniku (50 rpm) pri sobni temperaturi in v temi. Spore s filtracijo ločimo od biomase in umerimo v sterilni destilirani vodi na koncentracijo 5×10^6 konidijev. Dvanajst rastlin vsakega genotipa inokuliramo z 10 minutnim namakanjem korenin v inokulu. Inokulirane rastline posadimo v 4l lonce ter navijemo na vodila dolžine 3 m, ki so pritrjena na žično oporo. Dognojevanje poteka tedensko z dodajanjem visokih odmerkov dušičnih gnojil, kar ugodno vpliva na razvoj glive in izražanje bolezenskih znamenj. Prvi simptomi se pojavijo približno 4 tedne po inokulaciji. Rastline tedensko opazujemo in ocenjujemo s skalo od 0-5 glede na delež prizadete listne površine (PLP). Ocena 0 predstavlja rastline brez bolezenskih znamenj, 1 = 1 - 20 % PLP, 3 = 41 - 60 % PLP, 4 = 61 - 80 % PLP in 5 = 81 - 100 % PLP. Po končanem opazovanju zunanjih bolezenskih znamenj se oceni še stopnja kolonizacije prevodnega tkiva s prerezom stebel in korenin (skala 0-2). Potrditev okužbe posameznih rastlin izvedemo z reizolacijo glive v sterilnih pogojih na krompirjev agar, pri čemer identifikacijo potrdimo na osnovi morfoloških lastnosti kulture s svetlobnim mikroskopom. Končna ocena genotipa se izrazi kot povprečna vrednost ocen bolezenskih znamenj pri okuženih rastlinah in je razvrščena v eno izmed 3 kategorij odpornosti: 0-1: odporen, 2-3: srednja odpornost, 4-5: občutljiv. Pri odpornih genotipih se z namenom potrditve ocenjevanja preizkušanje ponovi v naslednji sezoni ali v rastni komori v zimskem času.

5 SELEKCIJA NA POLJU (hmeljeva peronospora in pepelovka)

Po začetni selekciji na hmeljevo peronosporo in hmeljevo pepelovko na stopnji sejancov rastline posadimo na polje, kjer opazujemo še ostale agronomsko pomembne lastnosti. Na istem polju posadimo kot kontrolne rastline občutljive sorte (Magnum za hmeljevo pepelovko; Bobek ali Savinjski golding za hmeljevo peronosporo). Prvoletni nasad oskrbujemo z načeli dobre agronomske prakse, medtem ko dvo- in večletne nasade med vegetacijo ne škropimo proti hmeljevi pepelovki. Škropljenje proti hmeljevi peronospori v spomladanskem času izvršimo šele po tem, ko se na občutljivih rastlinah pojavijo znaki sistemične okužbe, kar nam omogoči dodatno izločitev zelo občutljivih genotipov. Vsaka rastlina je ocenjena glede na pojav

okuženega tkiva po lestvici od 0-2 in sicer odporne z 0 (brez ali s šibkimi bolezenskimi znamenji), delno odporne (1 – srednja stopnja okuženosti) in občutljive (2 – visoka stopnja okuženosti). Enak postopek se uporablja v kolekcijskem nasadu s posajenimi 5, 10 ali 20 rastlinami posameznega genotipa.

6 RAZVOJ SELEKCIJ V PRIHODNJE

V članku so predstavljene selekcijske metode s ciljem vzgoje novih sort hmelja, ki bodo vključevale trajno ali vsaj delno odpornost na bolezi. Trenutno selekcije izvajamo na osnovi ocenjevanj bolezenskih znamenj, katerih razvoj na rastlinah je odvisen od interakcij med mnogimi dejavniki.

Prav tako so nekatere tehnike v procesu selekcije tehnično in časovno zahtevne, zato se v prihodnje odpirajo možnosti za nadgradnjo obstoječih selekcij z uporabo različnih markerskih sistemov (MAS; angl. Marker Assisted Selection), med katerimi lahko kot zelo uporabne omenimo molekulske markerje.

7 VIRI

1. Beckman, C.H., The nature of wilt diseases of plants.- American Phytopathology Society, (1987). St. Paul, Minnesota, s. 182.
2. Darby, P., Single gene traits in hop breeding.- Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Ed.: Seigner E. Canterbury, Kent, England, 5-7 August 2001, pp 76-80.
3. Darby, P., Mansfield, J. W., Godwin J.R. The assessment of partial resistance to powdery mildew in hops.- Plant Pathology 38(1989), s. 219-225.
4. Godwin, J.R., Resistance to powdery mildew disease in hops.- PhD Thesis (1985), University of London, Wye College.
5. Isaac, I., Keyworth, W. G., *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(1948), s. 243-249.
6. Neve R.A., Hops.- London, Chapman and Hall, (1991), s. 266.
7. Parlevliet, J.E., Can horizontal resistance be recognized in the presence of vertical resistance in plants exposed to a mixture of pathogen races.- Phytopathology, 73(1983), s. 379.
8. Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop.- European Journal of Plant Pathology 116(2006), s. 301–314.
9. Royle, D., Kremheller H. T. Downy mildew of the Hop.- The Downy mildews. Academic press, London, (1981), s. 395-419.
10. Seefelder S., Lutz A., Seigner E., Mapping of a powdery mildew resistance gene in hop (*Humulus lupulus* L.).- Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, George, South Africa, 20-25 February 2005, s. 31-34.

11. Seigner E., Seefelder S., Haugg B., Hesse H., Rösch H., and Felsenstein F., Investigations on the virulence spectrum of hop powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*).- Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Canterbury, Kent, England, 5-7 August 2001, s. 33-37.
12. Sewell, G. W. F., Wilson, J. F., The nature and distribution of *Verticillium albo-atrum* strains highly pathogenic to the hop.- Plant Pathology 33(1984) s. 39-51.
13. Talboys, P. W. Some mechanisms contributing to *Verticillium* resistance in the hop root.- Transactions of British Mycological Society. 41(1958) s. 227-241.
14. Talboys, P. W., Resistance to vascular wilt fungi.- Proceedings of the Royal Society (London), 181(1972) s. 319-333.
15. Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer K., Fingerprinting in Plants and Fungi.- London, CRC Press, Inc., (1995) s. 322.