

Nova spoznanja pri proučevanju viroidnih zakrnelosti hmelja v Sloveniji

Dr. Sebastjan Radišek, Tanja Guček, prof. dr. Jernej Jakše, prof. dr. Branka Javornik in dr. Jaroslav Matoušek, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani in Institute of Plant Molecular Biology, České Budějovice

Uvod

Leta 2007 smo na območju Šempetra v Savinski dolini odkrili izbruh neznane in agresivne bolezni, ki na hmelju povzroča zakrnelost in odmiranje rastlin z zelo hitro dinamiko širjenja. Po obsežni diagnostični analizi je bil v obolelih rastlinah potrjen *Hop stunt viroid* (HSVd) (Radišek s sod., 2012), ki je opisan kot povzročitelj nevarne bolezni viroidne zakrnelosti hmelja. Ta bolezen je po prvem odkritju leta 1940 na Japonskem prizadela večino hmeljišč in povzročila hudo gospodarsko škodo, ki se je končala z občutnim zmanjšanjem japonske pridelave hmelja (Sano, 2003). Zaradi specifičnih lastnosti viroidne zakrnelosti hmelja v Sloveniji, ki se izražajo predvsem v mnogo krajši inkubacijski dobi in višji stopnji agresivnosti, kot je bila do sedaj opisana za to bolezen, so bile opravljene dodatne diagnostične analize z metodo NGS (ang. next generation sequencing), ki so v simptomatičnih rastlinah presenetljivo potrdile prisotnost še enega viroida in sicer *Citrus bark cracking viroida* (CBCVd). Hkrati se je v okviru iste raziskave ugotovilo, da je glavni povzročitelj viroidne zakrnelosti hmelja v Sloveniji dejansko CBCVd, medtem, ko je HSVd najverjetneje zaradi antagonističnega odnosa s CBCVd v obolelih rastlinah neaktiven, občasno prisoten ali pa ga sploh ni več možno zaznati (Jakše s sod., 2014). Oba na novo odkrita viroida na hmelju predstavljata prvo najdbo v Evropi in v primeru CBCVd celo prvo znano najdbo na hmelju. Zaradi nevarnosti za širjenje ter nastanka večje gospodarske škode se tako od leta 2011 v Sloveniji izvajajo uradni ukrepi za preprečevanje in popolno izkoreninjenje omenjenih viroidov na hmelju.

Bolezenska znamenja na hmelju in poimenovanja

Bolezenska znamenja, ki jih povzročata CBCVd in HSVd na hmelju, so si glede na prizadetosti posameznih tkiv podobna. Oba viroida povzročata krajšanje in zbitost vmesnih členkov glavnih trt in stranskih poganjkov, kar opazimo kot zakrnelo rast. Prav tako oba povzročata odvijanje poganjkov in slabši razvoj storžkov in listne mase. Precejšna razlika pa je v času inkubacijske dobe, saj v primeru okužb hmelja s HSVd prva bolezenska znamenja opazimo šele 3-5 let po okužbi, medtem ko v primeru okužb hmelja s CBCVd prihaja do prvih bolezenskih znamenj že 4 mesece – 1 leta po okužbi.

Prav tako je razvoj bolezni pri CBCVd mnogo hitrejši in agresivnejši, saj rastline popolnoma odmrejo 3-5 let po okužbi, medtem ko s HSVd okužene rastline preživijo več kot 10 let in ne propadejo. Ker do sedaj CBCVd še ni bil odkrit na hmelju in zaradi povzročanja agresivnejše bolezenske oblike, se je pojavila potreba po novem terminološkem poimenovanju, ki je pomembno za nedvoumno razlikovanje med boleznimi. Tako sedaj poznamo 2 obliki viroidnih zakrnelosti hmelja; prvo, ki jo povzroča HSVd (slo. *viroid zakrnelosti hmelja*) in jo imenujemo »viroidna zakrnelost hmelja« (ang. hop stunt disease), in drugo, agresivnejšo obliko, ki jo povzroča CBCVd (slo. *viroid razpokanosti skorje agrumov*), in jo imenujemo »huda viroidna zakrnelost hmelja« (ang. severe hop stunt disease).



Zakrnela rast CBCVd okuženih rastlin v mesecu juniju. Lateralni poganjki spominjajo tudi na kuštrave poganjke. (Foto: S. Radišek)

Kaj vemo o CBCVd?

CBCVd je bil prvič odkrit leta 1988 v povezavi s proučevanjem bolezni eksokortis citrusov v Kaliforniji. CBCVd predstavlja krožna RNA molekula velikosti od 283-286 nukleotidov, ki s svojo prisotnostjo v celicah okuženih rastlin moti njihovo delovanje. Po prvem odkritju je bil potrjen kot patogen večine vrst rastlin iz rodu *Citrus* ter nekaterim sorodnim rastlinam, z umetnimi okužbami testnih rastlin pa so dokazali, da lahko okužuje tudi kumare, paradižnik, jajčevci in nekatere okrasne rastline. Kot četrti viroid, ki so ga

odkrili na agrumih, je bil najprej poimenovan CVd-IV, leta 2005 pa je bil zaradi neposredne povezanosti s pokanjem skorje na trilistem citronovcu preimenovan v *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd). Rezultati določanja razširjenosti viroidov na agrumih, ki so jih izvedli v nekaterih državah, so pokazala, da se CBCVd večinoma pojavlja v kombinaciji z ostalimi viroidi, kot je npr. HSVd in izredno redko v obliki samostojnih okužb. V literaturi ga najdemo tudi kot enega od viroidov, ki se komercialno uporabljajo za zmanjšanje velikosti agrumov. Odkritje CBCVd na hmelju predstavlja najdbo na povsem novem in nepričakovanem gostitelju, ki izraža visoko stopnjo občutljivosti, hkrati pa gre za pojav tega viroida v povsem novem okolju.

Epidemiološke lastnosti

Okužba rastlin z viroidi je sistemska in se je ne da ozdraviti. Viroidi se v hmeljiščih prenašajo mehansko z okuženim rastlinskim sokom, ki ostaja na orodju pri izvajanju različnih agrotehničnih ukrepov. Širjenje je najintenzivnejše v času rezi in ostalih spomladanskih opravil, kot je čiščenje in navijanje poganjkov, ko na rastlinah povzročamo največ poškodb. Zato je v tem času potrebno orodja (motike, hmeljarske nože, rezalnike..) večkrat razkužiti, predvsem takrat, ko končate opravila v okuženih nasadih. Razkuževanje je priporočljivo izvajati tudi v okviru posameznega nasada, predvsem na delih, kjer je bila bolezen najintenzivnejša. Ker vsaka okužena rastlina predstavlja vir infekcij, je potrebno zakrnele rastline vključno s koreninskim sistemom čim prej odstraniti iz hmeljišča. Pri tem odstranimo tudi sosednje rastline (ali uničimo del nasada), saj obstaja velika verjetnost, da so tudi te okužene, kljub ne-izražanju bolezenski znamenj. Čas do pojava prvih izrazitih bolezenskih znamenj se pri CBCVd giblje od 4 mesece – 1 leta po okužbi. V tem času so ne-simptomatične rastline infektivne in lahko povzročajo širjenje bolezni v nasadu. Pomemben vir širjenja predstavljajo tudi ostanki okuženih rastlin, v katerih lahko viroid preživi do njihove razgradnje. V okviru poskusov smo ugotovili, da CBCVd lahko preživi v posušenih ostankih rastlin do 2 meseca, v koreninah s herbicidi uničenimi rastlinami do 5 mesecev in v hmeljevini do 3-4 mesece. CBCVd poleg zakrnele rasti povzroča tudi suho trohnenje koreninskega sistema, kar pomeni, da so oleseneli deli trt pri obdelavi nasada (npr. brananje) lažje odtrgajo in tako prenesejo na neokužen del nasada. V primeru uničenja okuženih delov nasada ali celotnega nasada je potrebno temeljito izorati ostanke rastlin in izvesti vsaj 3 letno premeno, da ostanki hmelja popolnoma propadejo in z njimi tudi CBCVd. Na daljše razdalje se viroid največkrat razširi z okuženim sadilnim materialom, zato je pomembno, da

sajenje in obnavljanje nasadov temelji na sadikah, ki izvirajo iz ustrezno pregledanih (certificiranih) matičnih rastlin ali matičnih nasadov.



*Ostanki rastlin se lahko ohranjajo na premenah in predstavljajo vir okužbe za nove nasade.
(Foto: S. Radišek)*

Ukrepi preprečevanja in izkoreninjenja na okuženih posestvih

Razkuževanje opreme

Razkuževanje opreme je pomemben ukrep, s katerim preprečujemo širjenje mehansko prenosljivih virusov in viroidov. Na tržišču lahko najdemo različna anti-viroidna razkužila, katerih učinkovitost je odvisna od uporabljene koncentracije in časa razkuževanja. Testiranja razkužil na hmelju za preprečevanje CBCVd so pokazala najhitrejše in učinkovito delovanje pripravka Virocid v min. 2% koncentraciji. Razkuževanje opreme opravljamo pred in po končanju del v posameznem hmeljišču, ne glede na okuženost. Na ta način preprečimo širjenje bolezni med obolelimi in zdravimi nasadi. V primeru preprečevanja širjenja bolezni v že okuženih nasadih pa je potrebno stopnjo razkuževanja intenzivirati. Namreč v pomladanskih mesecih, ko okužene rastline še ne izražajo simptomov (lahko pa so vir okužbe), opravljamo večino del, ki povzročajo poškodbe na rastlinah in s tem širjenje bolezni. Razkuževanje rezalnikov si lahko olajšamo z dograditvijo aplikacijskega elementa, ki sproti razkužuje

rezalne diske oz. temeljito razkuži diske na koncu vsake vrste. Ob čiščenju in navijanju poganjkov, kjer nastaja največ okužb, je potrebno sproti razkuževanje motik, hmeljarskih nožev in rokavic. Razkuževanje se lahko organizira tako, da vsak delavec ob zaključku del v posamezni vrsti z ročno razpršilko poškropi svojo opremo. V času obiranja je na trgalnike priporočljivo namestiti aplikacijski element, ki ob trganju sproti razkužuje trgalno glavo. Okužbe lahko nastajajo tudi preko ran, ki jih povzročajo osipalniki, brane, kultivatorji in pršilniki. Rastlinski sok, ki ostane na orodju, traktorski kabini, traktorskem obroču ali pršilniku, je lahko kužen do 14 dni in lahko v stiku z zdravo rastlino prodre preko mikro-ran v rastlino. Razkuževanje na posestvu si lahko olajšamo tudi z vzpostavitev stacionarnega razkuževalnega obroča s šobami, s katerim v celoti razkužimo traktor in orodje. Pri aplikaciji razkužil ni potrebno uporabljati velikih količin razkužil, dovolj je, da se oprema dobro omoči in posuši. Prav tako je potrebno upoštevati, da so vsa razkužila korozivna, zato je po razkuževanju pomembno tudi pranje orodja, s katerim razkužila speremo.



Razkuževalni obroč s šobami, s katerim v celoti razkužimo traktor in orodje (Foto: S. Radišek)

Uničevanje obolelih rastlin

V okuženem hmeljišču je potrebno redno uničevati obolele rastline, saj s tem ukrepom lahko bolezen popolnoma izkrcimo ali upočasnimo širjenje. Lokalno uničevanje zajema uničenje simptomatične rastline in najmanj dveh sosednjih rastlin na vsaki strani v isti vrsti. Sosednje rastline uničimo, ker je velika verjetnost, da so že okužene, vendar še ne kažejo simptomov. Če uničimo samo simptomatične, potem v nasadu pustimo del okuženih rastlin, ki širijo okužbo naprej, kar pomeni ponavljanje vsakoletnega napredovanja bolezni in izgubo nasada.

V primeru lokalnega uničenja je pomembno, da to opravimo takoj, ko v nasadu opazimo obolele rastline. Uničenje posameznih rastlin hmelja se izvede tako, da se trte prereže in iz hmeljišča najprej odstrani nadzemne dele rastlin, ki se jih uniči s sežigom ali zakopom. Podzemne dele rastlin se kemično tretira tako, da se prerezane konice trt tretira z neselektivnim herbicidom in tako prepreči ponovno obraščanje in izraščanje. V ta namen je registriran herbicidni pripravek Touchdown System4 (15% konc.). Podzemne dele hmelja je potrebno izkopati in uničiti najpozneje 4 mesece po obiranju pridelka. Lokalno uničevanje je smiselno izvajati samo v primeru manjšega števila obolelih rastlin, v primeru večjih žarišč pa je edini uspešen ukrep popolno izkrcenje hmeljišča. Tako v močno okuženem nasadu uničimo samo nadzemne dele okuženih rastlin, da zmanjšamo infekcijski potencial in preprečimo obiranje storžkov iz okuženih rastlin. Uničenje hmeljišča ali njegovega dela se izvede po obiranju pridelka s škropljenjem rastlin z neselektivnim herbicidom. Škropljenje izvedemo v pasovih. Po preteku najmanj 14 dni se rastline v celoti izorjejo in s sežigom uničijo na samem mestu izkrcenja ali na drugem primernem mestu, ki ga odredi fitosanitarna inšpekcija. Na uničenih površinah je potrebno izvesti 3 letno premeno z ne-gostiteljskimi rastlinami, med katerimi priporočamo predvsem trave, detelje, žita, oljno ogrščico, fižol in druge krmne rastline. Pri tem ne pozabimo na redno zatiranje plevelov in ponovno odgnanih rastlin hmelja.

Hmeljevina in ostali rastlinski ostanki

Hmeljevina iz okuženih hmeljišč predstavlja enega od glavnih virov nadaljnjega širjenja v nasadih. Tako je po obiranju hmelja iz okuženih hmeljišč dovoljeno odvažati svežo ali kompostirano hmeljevino le na travniške ali poljedelske površine ter na urejene deponije. Pri tem pazimo, da med prevozom preprečimo raznašanje rastlinskih delov.

Kot pomemben ukrep priporočamo termično kompostiranje hmeljevine. Po obiranju hmelja se na ustrezni lokaciji oblikuje kup sesekljan hmeljevine tako, da višina in širina nasutega kupa obsega vsaj 2 m in hkrati po širini ne presega 5 m. Kup naj bo po celotni dolžini enakomerne višine, priporoča pa se postavitev v smeri sever-jug, da se zagotovi več prisojnih strani kupa. Pomembno je, da kupa ne tlačimo, ampak ga oblikujemo samo z nasipanjem. Po ureditvi se kup prekrije s PVC folijo, katero se dobro spoji s tlemi ob robovih. PVC folija zagotavlja enakomernije segrevanje celotne prostornine kupa, prepreči uhajanje vlage in smradu ter spiranje hranilnih snovi

s padavinami. V tako urejenem kupu ob razgradnji ostankov rastlin prihaja do segrevanja, ki v primeru sredice doseže temperaturo tudi do 70°C, na površini in dnu pa do 40°C. Intenziven proces termofilne faze v takšnem kupu traja do 4 mesece, kar je dovolj, da v tem času propadejo nevarni škodljivi organizmi kot so virusi, viroidi in talne glive iz rodu *Verticillium*.

Po 4 mesečnem obdobju termofilne faze, v kateri se prostornina kupa zmanjša za skoraj polovico, se kup premeša, kar spodbudi razvoj skupine mikroorganizmov, ki pospešujejo razpad rastlinskega tkiva. V času mešanja se lahko kupu dodajo tudi mikrobiološki pripravki, ki pospešujejo proces kompostiranja. Po mešanju se kup ponovno prekrije s PVC folijo in pusti odležati še najmanj 2 meseca. Po obdobju najmanj 6 mesecev se PVC folija odstrani in tako kompostirana hmeljevina se razvozi na poljedelske in travniške površine. Kompostiranje hmeljevine je smiselno združevati z ukrepom uporabe biorazgradljivih vodil, saj v tem primeru ne onesnažujemo svojih obdelovalnih površin z nerazgradljivimi materiali. V času jesenske in spomladanske obdelave nasadov je potrebno ostanke trt in obrezline temeljito odstraniti iz nasada. Te lahko uničimo s sežigom ob hmeljišču ali na drugem primernem mestu. Ostanke lahko tudi deponiramo na mestih kompostiranja hmeljevine in z njimi ravnamo enako kot s hmeljevino iz okuženih nasadov.

Prostorska izolacija

Vsaka okužena kmetija si pri izkoreninjanju viroidne zakrnelosti lahko pomaga tudi s prostorsko izolacijo okuženih hmeljišč. Najpreprostejši način je, da najprej obdelamo zdrave in na koncu neokužene nasade. V okuženih nasadih je priporočljivo zmanjšati število delovnih operacij na minimum, s čimer znižamo verjetnost prenosa z obdelavo. V primeru večjih kompleksov, kjer si hmeljišča delijo isto žičnico, je priporočljivo zdrave nasade prostorsko izolirati od okuženih z drugo ne-gostiteljsko rastlinsko vrsto. Najprimernejše je, da v mejni poljini med zdravim in obolelim nasadom posejemo koruzo, sirek ali žito in s tem izoliramo okužbo. Pogosto so poljske poti med hmeljišči zelo ozke, kar pomeni, da lahko pride do prenosa rastlinskih ostankov iz okuženega hmeljišča v zdravo. To je še posebno velja za hmeljišča, ki jih poljska pot deli prečno in pri katerih se obdelava nadaljuje čez poljsko pot ali pa se zaradi premalo prostora obračanje izvede tudi na delu sosednjega hmeljišča. Bolezen se večinoma širi v okviru okuženega posestva. Vendar je potrebno upoštevati tudi lastniško prepletenost hmeljarskega območja (iste žičnice), kar pomeni veliko nevarnost za širjenje na ostale sosednje kmetije. V

kolikor je mogoče, svetujemo odmik od okuženih njiv tudi sosednjim kmetijam, saj ta vložek pretehta ukrepe, ki jih je potrebno izvajati v primeru okužbe nasada in posledično kmetije.



*Izolacija okuženega od zdravih nasadov s koruzo
(Foto: S. Radišek)*

Stanje, aktivnosti in cilj ukrepov

Da so okužbe CBCVd na hmelju na celem svetu prisotne le v Sloveniji in da je do prenosa na hmelj najverjetneje prišlo preko plodov okuženih agrumov, je statistično izredno redko ponovljiv pojav. Če pa pogledamo širše še na ostale rastline ali živali ter druga območja, pa vidimo, da se nepredvidljivi izbruhi bolezni dogajajo relativno pogosto, še posebej v koraku s procesom globalizacije. Pojav »hude viroidne zakrnelosti hmelja« v Sloveniji predstavlja nov trenutek v pridelavi, ki je po škodljivosti in problematiki primerljiv »verticilijski uvelosti hmelja«. Z dosedanjimi aktivnostmi smo v zadnjih treh letih uspeli preprečiti širjenje bolezni med kmetijami, še vedno pa vsakoletno prihaja do širjenja na nove nasade v okviru že okuženih kmetij. Tako smo v letu 2015 bolezen potrdili v 37 hmeljiščih, ki skupno zajemajo 61,5 ha površin v okviru 13 posestev. Pri tem se stopnja okuženosti v hmeljiščih razlikuje od le posameznih okuženih rastlin, do večjih žarišč, ki zahtevajo krčenje nasada. Bolezen je tako nevarna, da lahko ob morebitnem širjenju močno prizadene slovensko pridelavo hmelja. To pomeni skupen problem slovenskega hmeljarstva in ne samo problem okuženih kmetij. Ob okužbi nasadov in širjenju po posestvu nastaja toliko škode, dodatnega dela in vložkov, da je edina dolgoročna možnost popolno izkoreninjenje. Kompromisi z neozdravljivimi boleznimi se nikoli niso dobro končali. Pri tem strokovne službe lahko predstavljajo oporo, vendar ključno vlogo pri tem vedno nosi pridelovalec. Bolezen se ne ohranja v tleh in

nima razen človeka nobenih prenašalcev, kar pomeni, da jo je možno izkoreniniti. Za doseg tega cilja je treba ohraniti zaježitev širjenja med kmetijami in vsakoletno bistveno zmanjšati število okuženih hmeljišč.

Od prvega pojava leta 2007 smo novo bolezen uspeli proučiti do mere, s katero smo določili kritične točke in izvajanje ukrepov, ki so uspešni pri preprečevanju širjenja. Poleg sistematičnega nadzora, ki omogoča pregled stanja in hitro odkrivanje žarišč, bo v bodoče potrebno aktivnosti intenzivirati v smeri razvoja prilagojenih tehnologij, določitve virov odpornosti sort in preizkušanja novih rešitev. Vendar ne glede na vse ugotovitve, dokler bo bolezen neozdravljiva, bo krčenje okuženega nasada še vedno najučinkovitejši ukrep.

Viri in povezave

- Jakše J, Radisek S., Pokorn T., Moatoušek J., Javornik B., 2014. Deep-sequencing revealed a CBCVd viroid as a new and highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*, 64: 831–842
- Radisek S, Majer A, Jakse J, Javornik B, Matoušek J, 2012. First report of Hop stunt viroid infecting hop in Slovenia. *Plant Disease*, 96(4): 592.
- Sano T, 2003. Hop stunt viroid. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS, eds. *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 207-212.

Odločba o nujnih ukrepih za preprečevanje vnosa in širjenja viroidnih zakrnelosti hmelja (Uradni list RS, št. 21/15)

Odločba o določitvi okuženih območij z viroidnimi zakrnelostimi hmelja z dne 16.10.2015

http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/OBJAVE_ZA_JAVNOST/Javne_objave/Oglasna_deska/2014/Odlocba_podpisana.pdf

Fitosanitarni prostorski portal, <http://fito-gis.mko.gov.si/Default.htm>



*Utrinek s prvega tehnološkega sestanka v letu 2015
(Foto: D. Vrhovnik)*

Doktorsko delo na področju viroidnih obolenj hmelja

Mlada raziskovalka Tanja Guček se pod mentorstvom dr. Sebastjana Radiška in somentorstvom prof. dr. Jerneja Jakšeta z Biotehniške fakultete ukvarja z razvojem

metod za določanje in ovrednotenje viroidnih obolenj na hmelju. V ta namen je v letošnjem letu med drugim preučevala tudi gostiteljsko specifičnost na novo odkritega viroida na hmelju CBCVd (viroid razpokanosti skorje agrumov) med plevelnimi vrstami in gojenimi rastlinami, ki lahko predstavljajo vir širjenja okužbe viroida CBCVd v in med hmeljišči. Z viroidom CBCVd je okužila več kot 30 različnih rastlinskih vrst, od tega kar 20 plevelov, ki se najpogosteje pojavljajo v hmeljiščih. Kljub večkratnemu izpostavljanju rastlin okužbi s CBCVd se z viroidom ni okužila nobena izmed preiskovanih rastlinskih vrst, tako da sklepajo, da pleveli v hmeljiščih ne predstavljajo nevarnosti širjenja okužbe. Hkrati je mlada raziskovalka razvijala najnovejše metode za hitrejšo in občutljivejšo določanje viroidov in nadaljevala s proučevanjem stabilnosti v tleh.



*Testiranje gostiteljske specifičnosti viroida CBCVd med pleveli
(fluorescentna osvetlitev v rastni komori) (Foto: S. Radišek)*