

3-4/99
leto 68

Hmelj

OSREDNJA KNJIŽNICA CELJE
Muzejski trg 1 a
3000 CELJE, p.p. 17

MAREC-APRIL 1999, ŽALEC, S. 29 - 48

ISSN 1318 - 6183

STROKOVNA PRILOGA



**Hmeljeva uvelost
*Verticillium
albo-atrum* se je
pojaviła v
slovenskih
hmeljiščih v
hujši obliki kot
smo jo poznali
do sedaj !**

foto: M. ŽOLNIR

VSEBINA

37. SEMINAR O HMELJARSTVU - UGOTOVITVE IN POBUDE	31
HMELJEVA UVELOST (<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke at Berthold in <i>Verticillium dahliae</i> Klebahn) V SLOVENIJI (Marta DOLINAR, Andrej SIMONČIČ).....	32
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA POVZROČITELJIC HMELJEVE UVELOSTI (<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold in <i>Verticillium dahliae</i> Klebahn) (Andreja ČERENAK, Marta DOLINAR, Magda RAK).....	37
UKREPI V ZVEZI S HMELJEVO UVELOSTJO V SLOVENIJI V LETIH 1998 IN 1999 (Andrej SIMONČIČ, Marta DOLINAR)	39
VIROIDI V SLOVENSKEM HMELJU (Vlasta KNAPIČ, Branka JAVORNIK)	43



Foto: M. Žolnir

Glede na pojav hmeljeve uvelosti v slovenskih hmeljiščih je v letošnji pomladi potrebno posvetiti največ pozornosti simptomom, ki jih podrobno opisujemo v tej številki. Vsa matična hmeljišča bodo pregledovali strokovnjaki IHP Žalec. Vse hmeljarje pa pozivamo, da med delom v svojih nasadih rastlino opazujejo in javijo sumljivo domiranje, venenje in sušenje hmelja.

Slika je z lanskega pregledovanja hmeljišč v juliju (ko so simptomi najbolj opazni), ki ga je vodila mag. Marta Dolinar. Mag. Dolinarjeva je glivici potrdila že leta 1974, v letih 1997 in 98 pa je začela tudi boj proti letalni obliki uvelosti. Mag. Dolinarjeva je 2. marca 1999 na četrtem slovenskem posvetovanju o varstvu rastlin v Portorožu za svoje bogato delo na področju fitopatologije prejela priznanje - srebrno značko, ki ga podeljuje Društvo za varstvo rastlin Slovenije.

V.K.

Revija Hmeljar

Strokovna revija s področja hmeljarstva
Žalskega tabora 2, 3310 Žalec

Izdajatelj in založnik: Hmeljarsko združenje Slovenije GIZ (Domača stran: <http://www.hmelj-giz.si>)

Glavni in odgovorni urednik: Martina Zupančič; Urednik strokovne priloge: Vlasta Knapič; Člani uredniškega odbora: Marjana Natek, Franc Puklavec, Marjan Drobne, Janez Luževič, dr. Lojze Četina, mag. Iztok Košir, mag. Marta Dolinar, Jože Brežnik, Vinko Drča, Irena Friškovec; Lektor: Anka Krčmar

Tisk: HARI tisk, Dobriša vas 36, Petrovče; Frekvenca: 12 - krat letno

Revija je po mnenju št. 23/40 pristojnega organa uvrščena med proizvode informativnega značaja, za katerega se plačuje davek od prometa proizvoda po 5 % stopnji.

Naklada: 700 izvodov

37. SEMINAR O HMELJARSTVU - UGOTOVITVE IN POBUDE

22. in 23. februarja je Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec v sodelovanju s Kmetijsko svetovalno službo Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS organiziral že tradicionalni, tokrat 37. seminar o hmeljarstvu.

Na letošnjem seminarju v Žalcu je bilo 97 udeležencev. Žal se minister za kmetijstvo ni odzval povabilu, seminarja pa sta se tudi letos udeležila člana Odbora za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano pri Državnem zboru RS: podpredsednik Geza Džuban in sekretarka Dragana Čuljkovič. Prisotne je pozdravil tudi župan občine Žalec Lojze Posedel.

Za 37. seminar o hmeljarstvu je programski odbor razpisal štiri glavne teme: perspektivnost slovenskega hmeljarstva v mednarodnem prostoru, tehnike pridelave hmelja in možne racionalizacije, problematika oblikovanja sortne politike, varstvo hmeljišč in karantenske bolezni v hmeljiščih. Večino prispevkov so pripravili strokovnjaki Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. S prispevkom o identifikaciji hmeljnih kultivarjev sta sodelovala tudi avtorja z Biotehniške fakultete v Ljubljani, v prispevku o podzemnem kapljičnem namakanju je bila soavtorica z Vodnogospodarskega inštituta v Ljubljani, s prispevkom o kakovosti slovenskih kultivarjev hmelja pa se je vključil tudi strokovnjak Poljoprivrednega inštituta v Križevcih. V sklopu sortne politike so se na letošnjem seminarju s prispevkom in konstruktivno razpravo aktivno vključili tudi predstavniki trgovcev hmelja s Hmezad Exporta v Žalcu.

Razprava je bila živahna predvsem v sklopu oblikovanja sortne politike. Iz predavanj, razprav ter pogovorov povzemamo za nadaljnje delo nekaj ugotovitev in pobud:

V okviru Hmeljarskega združenja Slovenije-GIZ se bomo hmeljarji - v sodelovanju z Ministrstvom za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in Vladnim uradom RS za evropske zadeve - aktivno vključili v spremljanje zakonodaje EU s področja hmeljarstva.

Svetovalna služba na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu bo ponudila hmeljarjem možnost analiziranja gospodarnosti pridelave hmelja, saj ugotavljamo, da je premalo pozornosti posvečene razvoju novih tehnik pridelave hmelja in racionalizaciji posameznih postopkov pridelave. V okviru možne racionalizacije je bila na letošnjem seminarju poudarjena racionalizacija gnojenja in postopka napeljave vodil. Hmeljišča so v glavnem prekomerno založena s fosforjem in kalijem, zato je nujno, da gnojimo na osnovi redne kemične analize tal. Iz poskusov na kultivarju aurora pa je razvidno, da pomeni eno vodilo na sadilno mesto v primerjavi z dvema vodiloma na sadilno mesto majhno razliko v pridelku na hektar, vendar precejšnje zmanjšanje stroškov.

Kot nova tehnika namakanja se dobro uveljavlja podzemno kapljično namakanje, ki ima v primerjavi s klasično tehnologijo namakanja prednosti predvsem s stališča varstva okolja, saj je pri tej tehniki vsebnost nitratov v talni raztopini in v storžkih hmelja manjša.

Kot vse večji problem hmeljarjev je bila izpostavljena tudi nenačrtna sortna politika. Skupna ugotovitev je bila, da morajo za uspešno dolgoročno sortno politiko pri oblikovanju sodelovati trgovina, stroka in pridelovalci, Hmeljarsko združenje Slovenije - GIZ pa se naj še bolj dejavno vključi v promoviranje slovenskega hmelja in v oblikovanje sortne politike. Poudarjeno je bilo, da je na svetovnem trgu veliko povpraševanje po grenčičnih kultivarjih hmelja in da bi bilo potrebno slovenski sortiment nujno prilagoditi. Trenutna tržna situacija kaže, da je možno prodati okrog 500 t slovenskega aromatskega hmelja, 1000 t cv. aurore s srednjo vsebnostjo alfa kislin, ostalo pa naj bi bil hmelj z vsebnostjo alfa kislin nad 12 %. V Sloveniji je v sortni listi od grenčičnih kultivarjev samo cv. magnum, zato je potrebno pospešeno vzgajati sadilni material in razširjati ta kultivar.

Na seminarju so bile dane smernice, kako opraviti predizbiro genskega materiala za potrebe žlahtnjenja in introdukcije. Udeleženci seminarja so se seznanili z rezultati introdukcije cv. nugget in magnum in z rezultati poskusnega varjenja piva s cv. magnum, taurus, columbus, križancem 132/151 in auroro 12. Ugotovili smo, da je potrebno razširiti sortiment grenčičnih kultivarjev v Sloveniji, zato je bila dana pobuda, da v letu 1999 pričnemo z introdukcijo cv. taurus in columbus in nadaljujemo s klonsko selekcijo cv. aurore na povišano vsebnost alfa kislin.

Predstavljena je bila tudi ugotovitev, da so pridelki v brezvirusnih nasadih večji in bolj kakovostni, zato je nujno nadaljevati z uporabo brezvirusnega sadilnega materiala. Zaradi velikih stroškov vzgoje sadik in testiranja matičnih nasadov je pomoč države neobhodna. Za nemoteno in pravočasno pripravo sadilnega materiala pa je potrebno le-tega pravočasno naročiti.

Hmeljarji so bili seznanjeni tudi z možnostmi identifikacije slovenskih hmeljnih kultivarjev s PCR metodo in analizo sekundarnih metabolitov.

V okviru varstva hmeljišč so bile podrobneje predstavljene značilnosti varstva hmelja v letu 1998 in smernice za varstvo hmeljišč v letu 1999. Najbolj pereč problem je bila vsekakor hmeljeva uvelost (*Verticillium* spp.). Za preprečevanje širjenja te bolezni je v prihodnje nujna izvedba nekaterih tehnik pridelave hmelja, upoštevanje higienskih standardov ter natančno spremljanje zdravstvenega stanja hmeljišč, potrebno pa bo tudi proučiti občutljivost kultivarjev, ki jih že pridelujemo v Sloveniji, in žlahtniti nove tolerantne kultivarje hmelja na hmeljevo uvelost.

Vsi preučevani slovenski kultivarji hmelja so okuženi tudi s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd), medtem ko hmeljevega stunt viroida (HSVd) v naših kultivarjih zanesljivo ni.

Ugotovili smo tudi, da lahko z zmanjšano količino vode hmeljišča prav tako učinkovito varujemo pred boleznimi in škodljivci.

za programski odbor:
dr. Dušica Majer

HMELJEVA UVELOST (*Verticillium albo-atrum* Reinke at Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn) V SLOVENIJI

Marta DOLINAR,* Andrej SIMONČIČ*

IZVLEČEK

Blaga oblika hmeljeve uvelosti je bila v Sloveniji prvič ugotovljena leta 1974. Kot povzročiteljici sta bili identificirani glivi *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae*. Na območju Gomilskega pa smo ugotovili leta 1997 bolj patogeno, letalno obliko, ki jo povzroča *Verticillium albo-atrum*. Okuženih je 22 ha hmeljišč. Proučevali smo znamenja obolenja. Le-ta ustrezajo opisu, ki velja v Angliji za progresivno obliko. Od blage oblike se razlikuje predvsem po tem, da rastline odmirajo in da se bolezen hitro širi v nasadu in v druga hmeljišča. Ker sta glivi *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae* na listi A2 karantenskih škodljivih organizmov, predvsem pa, ker obstaja nevarnost za slovensko hmeljarstvo, so bili izvedeni vsi ukrepi, da preprečimo širjenje bolezni.

1 UVOD

Hmeljeva uvelost, ki jo povzročata glivi *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae*, je bolezen vaskularnega sistema ne samo na hmelju, temveč tudi na drugih gojenih rastlinah. Glivi napravita največ škode na hmelju, zato so ju uvrstili na listo karantenskih škodljivih organizmov, ki jo pripravlja Evropska organizacija za varstvo rastlin (EPPO-European Plant Protection Organization). Ker smo jo leta 1974 našli v Sloveniji, je uvrščena tudi na slovensko A2 listo karantenskih škodljivcev.

Na hmelju se bolezen manifestira v blagi in letalni obliki, kar je odvisno od patogenosti soja in od občutljivosti kultivarja. Blago obliko so prvič ugotovili leta 1924 v Angliji (Harris, 1927). Leta 1933 pa se je pojavila progresivna oblika hmeljeve uvelosti. Znamenja obolenja je opisal Keyworth (1942). Bistvena razlika med obema je, da pri progresivni uvelosti rastline odmirajo, pri blagi pa se opomorejo in naslednje leto normalno rastejo naprej, čeprav lahko tudi ta oblika povzroči ekonomsko škodo. Škodo povzroča predvsem *Verticillium albo-atrum*, medtem ko *Verticillium dahliae* kaže na hmelju le blaga znamenja obolenja. Izjema je na Bavarskem, kjer naj bi gliva *V. dahliae* povzročala pogojno progresivno obolenje (Zinkernagel, 1981).

Hmeljeva uvelost, predvsem njena letalna oblika, je bila v Angliji nevarna bolezen hmelja in je to še danes. Od kar se je pojavila se nezadržno širi. Leta 1955 je bilo okuženih že 100 farm, leta 1960 pa 2.400 ha hmeljišč (Jary, 1961).

Drugo območje, kjer se hmeljeva uvelost pojavlja in dela škodo, je Hallertau na Bavarskem. Prvič so jo zasledili

leta 1952 (Zattler, 1960 b). Deset let kasneje že ni bilo pridelka na 150 ha, leta 1973 pa že na 807 hektarjih hmeljišč. Zinkernagel (1981) pravi, da je nemški soj pogojno progresiven, kar pomeni, da njegova agresivnost niha glede na vremenske razmere pa tudi glede na občutljivost kultivarja. V šestdesetih in sedemdesetih letih se je hmeljeva uvelost razširila skoraj na vseh hmeljarskih območjih Evrope, vendar le njena blaga oblika.

Glivi sta hmelju nevarni predvsem zato, ker ni kemičnega pripravka, s katerim bi obolenost preprečevali ali celo zdravili ter zato, ker se hitro širita po nasadu in v druga hmeljišča. Živita v zemlji kot parazita ali saprofita ter parazitirata na raznih plevelih, ne da bi kazali znamenja obolenja. S svojimi trajnimi organi pa preživita neugodne razmere tudi več let. Njun infekcijski pritisk v zemlji hitro narašča in počasi pojenjuje. Kot ukrep proti hmeljevi uvelosti so uspešni le tolerantni kultivarji v kombinaciji s spremenjenim načinom pridelovanja hmelja in z upoštevanjem higienskih mer, posebno v času obiranja.

2 BLAGA OBLIKA HMELJEVE UVELOSTI V SLOVENIJI

Hmeljeva uvelost naj bi se v Sloveniji domnevno prvič pojavila leta 1955, ko je bila ugotovljena ena okužena rastlina v Strmcu. V večji meri pa smo jo ugotovili leta 1974: najprej na območju Vojnika in v Arclinu na kultivarju aurora, ki so ga začeli pridelovati dve leti prej. Oboleli so skoraj vsi dve- in triletne nasadi aureore v Savinjski dolini, pa tudi izven nje.

Naslednje leto je sicer bilo po obsegu okuženih več nasadov, izraženo v relativnem deležu (%) pa manj (Tabela 1). Tudi znamenja obolenja niso bila tako močno izražena, kot leto poprej. Okužba je v naslednjih letih še pojenjala. Od 1977 naprej pa se je hmeljeva uvelost pojavljala le na kultivarju aurora, po letu 1982 pa tudi na bobku in kultivarjih C- generacije. Tu in tam smo našli odebeljene trte. Leto 1974 je bilo ugodno za razvoj hmeljeve uvelosti. Maj in junij sta bila hladna in leto je bilo sploh bolj mokro. V tem letu smo ugotovili skupno 21 uvenelih in suhih rastlin, naslednje leto le tri, potem pa vse do leta 1997, ko smo ponovno ugotovili suhe rastline v Slovenj Gradcu, nobene več. Razmere za razvoj hmeljeve uvelosti so na Koroškem ugodnejše, nasad pa je bil močno gnojen s kokošjim gnojem.

2.1 ZNAMENJA OBOLENJA V BLAGI OBLIKI

Pri blagi obliki hmeljeve uvelosti se začnejo pojavljati vidna znamenja obolenja od druge polovice julija pa vse

*Mag., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec /Institut für Hopfenforschung und Brauerei/Institute of Hop Research and Brewing Žalec

Tabela 1: Okužba aurore z *Verticillium* spp., 1975
 Table 1: Infestation of hops cv. Aurora by *Verticillium* spp., 1975
 Tabelle 1: Mit *Verticillium* spp. erkrankte Hopfen- gärten, 1975

Leto Year Jahr	Zdravi nasadi (ha) Healthy fields (ha) Gesunde Anlagen	Oboleli nasadi (ha) Erkrankte Anlagen (Ha) Infested fields (ha)	Vsota Sum Summe	% obolelih nasadov % of infested fields % der erkrankten Anlagen
1974	6,0	28,0	34,0	82,35
1975	26,7	42,0	68,7	61,14
1976	55,76	13,5	69,3	19,5

do spravila pridelka. Najprej začnejo rumeneti primarni listi - od tal navzgor po rastlini, nakar se pojavijo nekroze na robovih listov in med žilami. Robovi listov se zavijajo navzgor in če se lista dotaknemo, odpade. V tem času je

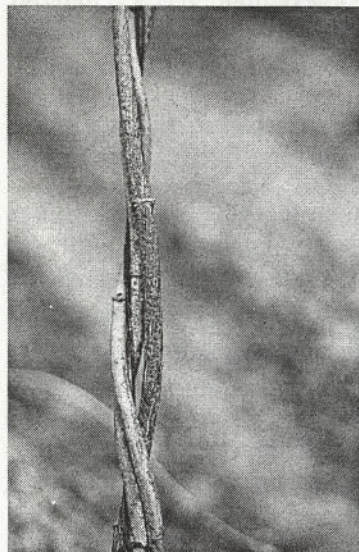


Foto: M. Žolnir

Slika 1: Zaradi verticilija odebeltene trte hmelja. Trte se debelijo od tal navzgor.

invazija patogena najmočnejša oziroma so znamenja obolenja najbolj zaznavna. Pri blagi obliki začnejo v tem času trte postajati v spodnjem delu debelejše (fat bines), kar je obrambna reakcija rastline gostiteljice, saj gliva povzroči hiperplazijo ksilema. Skorja postaja premajhna, poka in postane hrapava.

Tega pojava navadno pri progresivni obliki ni ali pa je neznatno izražen. Odebeltitev trt poteka od tal navzgor. Navadno se proces v tem stadiju ustavi. Trte odebeltijo v spodnji polovici rastline. Če

trto v višini 1 metra nad tlemi prerežemo in razpolovimo, vidimo nekrotično prevajalno tkivo, kar je zanesljivo znamenje, da gre za hmeljevo uvelost. Če se pa proces

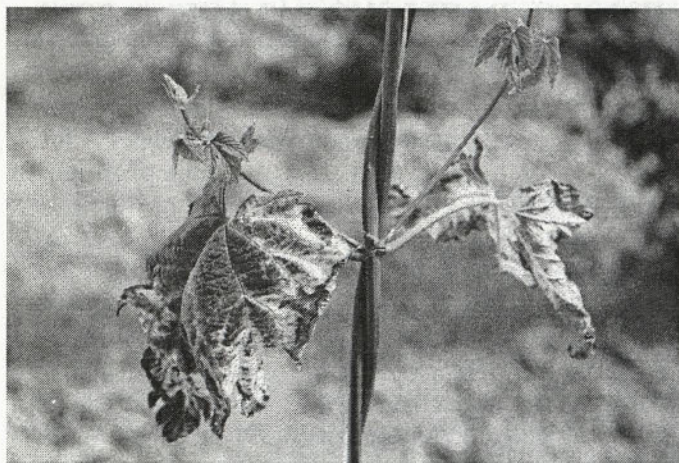


Foto: M. Žolnir

Slika 2: Na odebeltjenih trtah se primarni listi od spodaj navzgor sušijo in odpadajo.

nadaljuje, začnejo veneti stranski poganjki. Listi se posušijo in odpadejo. Storžki, ki so v tem času že formirani, se posušijo in navadno ostanejo na rastlini. Nadzemni deli rastline se posušijo (slika 2). Od blage oblike obolele rastline, tudi povsem suhe, naslednje leto normalno odganjajo in rastejo.

Ker se je hmeljeva uvelost v začetku sedemdesetih let pojavila v tako katastrofalni obliki v Nemčiji, je obstajala bojazen, da se bodo enake razmere ponovile v Sloveniji. Problema hmeljeve uvelosti smo se lotili načrtno. Najprej smo glivi izolirali in identificirali (Dolinar, 1975, 1976). Ugotovili smo *Verticillium albo-atrum*, ki prevladuje na težjih tleh, in *Verticillium dahliae*, ki prevladuje na lažjih (Dolinar, 1974b). Izvedli smo vse ukrepe, da se bolezen ne bi prenašala v druga hmeljišča in da se ne bi večal infekcijski pritisk glive v tleh.

Proučili smo znamenja obolenja, ki so ustrezala opisu Harrisa (1927) za lažjo obliko, kar je potrdil tudi Talboys iz East Mallinga. Domače in tuje kultivarje smo testirali na odpornost in ugotovili, da je aurora občutljiva. Ugotovili smo tudi, da se virulence posameznih izolatov *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae* ne razlikujejo. Reinfekcije smo delali v naravi, na povsem izoliranem mestu. Proučili smo nekatere ekološke pogoje, ki vplivajo na razvoj hmeljeve uvelosti. Ugotovili smo, da so pri razvoju hmeljeve uvelosti bistvenega pomena gnojenje z dušičnimi gnojili in pa talne razmere, predvsem toplota tal v globini 10 cm. Z dušičnimi gnojili pregnojena hmeljišča in hmeljišča na težkih, hladnih tleh so bila najmočnejše okužena. Raziskovanja smo leta 1978 zaključili s predpostavko, da gre za zelo blago obliko obolenja, ki nima posebnega vpliva na pridelek hmelja.

3 LETALNA OBLIKA HMELJEVE UVELOSTI

Leta 1997, tik pred obiranjem hmelja, so nas opozorili na venenje in sušenje rastlin v hmeljišču bobka na Gomilskem. Ko smo si ogledali nasad, kjer je bilo žarišče uvenelih in tudi že suhih rastlin, nismo bili povsem prepričani, da gre za hmeljevo uvelost, ker trte niso bile značilno odebeltene. Odebeltene trte so simptom, po katerem smo doslej razpoznavali hmeljevo uvelost na polju. Šele po mikroskopskem pregledu, kjer smo našli *Verticillium* spp., smo ugotovili, da gre dejansko za hmeljevo uvelost. Sumili smo, da gre za hujšo obliko. Ker smo videli zadnjo razvojno fazo hmeljeve uvelosti na rastlinah, smo se odločili, da z dokončnim mnenjem počakamo, da dobimo popolnejšo sliko o znamenjih obolenja.

3.1 ZNAMENJA OBOLENJA LETALNE OBLIKE

Pri letalni obliki hmeljeve uvelosti se znamenja obolenja pojavijo že v maju. Ko smo si konec aprila ogledali žarišča, smo videli, da je nekaj rastlin odmrlo že prek zime, del pa je slabo odganjal (slika 3). V drugi polovici

Tabela 2: Širjenje okužbe hmelja z *Verticillium albo-atrum*, 1997-1998.
 Table 2: Spreading of plants affected by *Verticillium albo-atrum*, 1997-1998.
 Tabelle 2: Verbreitung der Erkrankung des Hopfens mit *Verticillium* spp.

Hmeljišče Hopfenanlage Hop field	Število (1997) Number/ Zahl (1997)		Število (1998) Number/ Zahl (1998)	
	obolelih rastlin affected plants/ erkrankte Pfl.	propadlih rastlin dead plants/ abgestorbene Pfl.	obolelih rastlin affected plants/ erkrankte Pfl.	propadlih rastlin dead plants/ abgestorbene Pfl.
Orožim	16	8	115	30
Trogar	5	3	57	17



Foto: M. Žolnir

Slika 3: Pri letalni obliki uvelosti rastline preko zime odmirajo in spomladi slabo odganjajo.

meseca maja pa je hmelj že propadal, predvsem tiste rastline, ki so po rezi slabo odganjale. Prav te rastline so bile v predhodnem letu v avgustu suhe. Listi so kazali tipična znamenja obolenja z glivo *Verticillium albo-atrum*, to je rumenenje, nekroze ob robovih in med žilami. Robovi so se zasukali navzgor. Čim smo se lista dotaknili, je odpadel. Naslednja stopnja je bila, da so odpadli vsi listi, rastlina se je posušila in propadla.

Pri letalni obliki uvelosti rastline druga za drugo obolevajo, venijo, se sušijo in odmirajo. Znamenja obolenja so najbolj zaznavna v drugi polovici julija do obiranja hmelja, ko je invazija patogena na rastline največja. V tem času so rastline že dorasle in imajo formirane storžke. Znamenja obolenja pa so podobna kot pri blagi obliki. Rastline, ki obolijo v tem času, odmrejo prek zime ali pa v naslednji vegetacijski dobi. Primarni listi rumenijo od tal navzgor po rastlini, se posušijo in odpadejo. Veneti začnejo stranski poganjki. Vsi listi na rastlini se posušijo in odpadejo. Storžki, čeprav suhi, ostanejo na rastlini. Trte se pri tej obliki načeloma ne debelijo. Le tu in tam je mogoče zaslediti nekoliko debelejšo trto, kar pa ni zanesljiv simptom. Če trto prerežemo in razpolovimo, vidimo značilno nekrotično prevajalno tkivo. Znamenja obolenja popolnoma ustrezajo opisu progresivne oblike v Angliji (Keyworth, 1942).

3.2 ŠIRJENJE OKUŽBE PO NASADU IN V DRUGA HMELJIŠČA

Okužba se širi v hmeljišču v smeri obdelave in v stranske vrste. Širi se hitro, če upoštevamo, da je bilo spomladi v hmeljišču obolelih 10, konec julija pa že 74 rastlin (Tabela 2), do obiranja pa je okužba še narasla.

Primarno žarišče letalne oblike hmeljeve uvelosti se je v kompleksu hmeljišč Klinca II domnevno pojavilo že leta 1995 v nasadu savinjskega goldinga. Po pripovedovanju lastnika se je okužba v nasadu širila, tako da je lastnik hmelj leta 1996 izkrčil. Leta 1997 pa smo žarišče ugotovili na sosednji njivi, v istem kompleksu, na kultivarju bobek.

Iz slike 4 je razvidno, da je danes ugotovljenih osem žarišč. V dveh sosednjih hmeljiščih pa sta okuženi še ena do dve rastlini. Skoraj vsa žarišča se nahajajo v premeru dveh kilometrov, le eno je oddaljeno cca 4 km od primarnega. Vsega skupaj je okuženih 22 ha hmeljišč. Posamezni lastniki imajo okuženih po več hmeljišč, kar pomeni, da so si okužbo že prenesli - domnevno z obdelovalnimi stroji.



Slika 4: Žarišča okužb z *Verticillium* spp. v hmeljiščih. / Scattered groups of hop plants infected by *Verticillium* spp. / Die Herde der Erkrankungen mit *Verticillium* spp.

3.3 STA V SAVINJSKI DOLINI NA HMELJU RAZLIČNO PATOGENA SOJA *Verticillium albo-atrum* ?

Predno odgovorimo na vprašanje, je prav, da pogledamo, kaj je na tem področju narejenega v Angliji, kjer je bila hmeljeva uvelost največji problem in pomeni še danes potencialno nevarnost za hmelj.

Keyworth (1948) je dognal, da sta v Angliji v pokrajini Kent različno patogena soja *Verticillium albo-atrum*, ki se morfološko ne razlikujeta. Eden povzročča blago (fluctuating wilt), drugi pa letalno obliko hmeljeve uvelosti (progressive wilt). Ko so že mislili, da so patogena sredi šestdesetih let s strogimi higienskimi merami, s spremenjenim načinom pridelovanja in s tolerantnimi kultivarji obvladali, sta se pojavila še bolj patogena soja, ki sta povzročala škodo tudi na tolerantnih kultivarjih. Sewell in Wilson (1984) sta identificirala med različnimi izolati tri močno

virulentne: PV1, PV2 in PV3. Vsi trije izzovejo na občutljivih kultivarjih znamenja progresivne oblike obolenja. Identificiran je še blagi soj (F), ki izzove blaga znamenja obolenja na občutljivih kultivarjih.

Za določitev patogenosti sojev so v tem času razvili hitrejšo metodo s pomočjo indikatorskih kultivarjev (Clarkson in Heal, 1985). Testiranja se odvijajo v rastnih komorah in ne več na prostem. Izolate razvrščajo glede na učinek, ki jih imajo na indikatorske kultivarje. To je bistvenega pomena, kajti znamenja obolenja so odvisna od tolerance oziroma od občutljivosti kultivarja in od patogenosti soja.

Pravo zmedo je sprožil med znanstveniki pojav zelo patogenega soja PV3 na drugem hmeljarskem območju, kjer letalne oblike hmeljeve uvelosti dotlej niso poznali. Pojavil se je kljub strogi odredbi (The progressive wilt of Hops Order), ki naj bi onemogočala širjenje bolezni na druga območja. Še danes ni povsem jasno, ali je bil prenešen soj PV3 s sadilnim materialom ali je nastal z evolucijo iz F soja (Griffin et al., 1997). Mnenja znanstvenikov so različna. Zagovorniki nastanka novega soja z evolucijo so s poskusi dokazali, da nastanejo novi soji z rekombinacijo genov s pomočjo paraseksualnega ciklusa (Clarkson in Heal, 1985a) v rastlini. Oba avtorja sta raziskovala heterokarionsko kompatibilnost in genetsko rekombinacijo v rastlini med različnimi izolati *Verticillium albo-atrum* (Clarkson in Heal, 1985b).

Pri pojavu novega soja je potrebno čim hitreje ugotoviti njegovo patogenost. Še vedno jo ugotavljajo na bolj ali manj klasičen način z reinfekcijami določenih indikatorskih kultivarjev. Že v osemdesetih letih so intenzivno delali na tem, da bi s hitrejšimi metodami, predvsem molekularnimi, biokemičnimi in serološkimi, določili virulenco posameznih izolatov. Vsi poskusi so bili neuspešni.

S PCR- tehniko ločijo le posamezne vrste *Verticillium* spp. med seboj (Nazar et al., 1991). Najbolj obetavna je bila APD finger print metoda (Griffin et al., 1997). Analizirali so ribosomalno in mitohondrijsko DNK z RFLP metodo, hkrati pa delali APD fingerprint. Ugotovili so genetsko razliko med hmeljnimi in lucernimi fenotipi *Verticillium albo-atrum*. 27 hmeljevih izolatov so uvrstili v 13 APD fenotipov, ki pa niso imeli nič skupnega s patogenostjo niti z geografsko lokacijo. Kar zadeva razlikovanje virulence posameznih izolatov oziroma patogenosti posameznih sojev *Verticillium* spp., so se torej vse novejšie metode izkazale bolj ali manj neuspešne.

Poraja se vprašanje, ali gre pri nas za različno patogena soja *Verticillium albo-atrum*: eden je blag, ki je razširjen v Sloveniji že od leta 1974, drugi pa je bolj patogen, saj povzroča odmiranje rastlin. Dopuščamo pa tudi možnost, da gre le za eno obliko, ki se je leta 1997 oziroma domnevno 1995 pojavila zaradi določenih okoliščin v bolj patogeni obliki. Po Talboysu (1967) zunanji dejavniki močno vplivajo na sezonska nihanja znamenj obolenja. Pomembni so vremenski dejavniki v maju in juniju (Sewell, Wilson, 1974), po mnenju nemških avtorjev (Zinkernagel, 1982) pa vso vegetacijsko dobo, ki vplivajo na razvoj hmeljeve uvelosti, kar lahko potrdimo tudi mi.

Že 1974 smo ugotovili, da se *Verticillium* spp. dobro razvija, če je leto bolj hladno in vlažno in če so tla težka in vlažna ter s tem hladna. Zadnji dve leti sta bili predvsem v poletnem času bolj vlažni in hladni od predhodnih deset let, ko hmeljeve uvelosti skoraj nismo ugotovili. Ta dejstva govorijo v prid drugi tezi.

Vendar pa na podlagi znamenj obolenja in glede na to,

- da izhaja okužba iz enega žarišča,
- da je dokazano, da lahko nastanejo novi, bolj patogeni soji z evolucijo,
- da se okužba hitro širi v hmeljišču samem in v druga hmeljišča,
- da ni mogoče, da bi se ta soj prenesel od drugod, predvsem pa dejstvo,
- da se hmeljeva uvelost na istem kultivarju pojavlja v dveh oblikah, domnevam, da gre za nov, bolj patogen soj *Verticillium albo-atrum*. Za ugotovitev patogenosti so nujno potrebne raziskave predvsem zato, da se dokončno ugotovi, kako je bolezen nevarna slovenskemu hmelju.

Ne glede na vse pomisleke pa menim, da je prav, da smo storili vse, da se bolezen ne bi še bolj razširila. Že spomladi 1998 smo pripravili pridelovalne in higienske ukrepe za lastnike, ki imajo okužena hmeljišča. Priporočali smo manjšo porabo dušičnih gnojil in sprotno odstranjevanje in zažiganje okuženih rastlin.

Poseben program pa je bil sprejet za čas obiranja. Gliva se namreč najbolje razvija na odpadlih delih rastline. Hmeljarji pa pogosto še v času obiranja vozijo še sveže hmeljeve ostanke nazaj na njivo. Priporočali smo termično obdelavo ostankov hmeljevine ter odvoz teh ostankov na ustrezno odlagališče. Ker sta oba patogena na hmelju na listi karantenskih škodljivih organizmov, je kmetijski inšpektor odredil lastnikom okuženih hmeljišč, da izkrčijo hmeljišča in jih posejejo s travami oziroma z žiti. Hmeljišče mora ostati v premeni najmanj 4 leta. Na ta način se zmanjšuje infekcijski pritisk glive v tleh.

Narejen je tudi program aktivnosti, s katerim nameravamo hmeljevo uvelost omejiti in v čim krajšem času izkoreniniti. Reševanje tega vprašanja se bo v prihodnje odvijalo na dveh ravneh: na svetovalno strokovnem in na raziskovalnem. Med strokovnimi in svetovalnimi nalogami so najpomembnejše naslednje:

- redno in sistematično spremljane karantenskega škodljivega organizma,
- spremljanje infekcijskega pritiska glive v hmeljiščih, ki so v premeni,
- pripravljanje navodil in ukrepov za izvajanje higienskih mer v celotnem postopku pridelave hmelja in ravnanja s hmeljevino,
- prilagajanje tehnologije pridelave hmelja, ki bo zmanjšala pojav in širjenje bolezni.

Ker smo dejali, da se je letalne oblike hmeljeve uvelosti mogoče ubraniti le s tolerantnimi kultivarji, je to prednostna naloga pri žlahtnjenju hmelja, za kar pa je

potrebno uvesti metode testiranja na občutljivost za hmeljevo uvelost že obstoječih kultivarjev in tudi novih. Nič manj pomembna pa ni določitev patogenosti soja in ugotovitev, ali imamo opravka z dvema sojema, o čemer smo že govorili.

4 ZAKLJUČEK

Na območju Gomilskega je bila ugotovljena letalna oblika hmeljeve uvelosti, ki jo povzroča gliva *Verticillium albo-atrum*. Okužba se v nasadu in tudi v druga hmeljišča hitro širi. V nasadu se širi v smeri obdelave in tudi v sosednje vrste. Doslej smo ugotovili osem žarišč. Okuženih pa je 22 ha hmeljišč.

Na podlagi znamenj obolenja, ki ustrezajo opisu Keywortha za letalno obliko, po tem, da izhaja okužba iz enega žarišča, da ni možnosti, da bi se ta soj prenesel od drugod ter, da je dokazano na primeru *Verticillium albo-atrum* s hmelja, da lahko nastanejo novi, bolj patogeni soji z rekombinacijo genov s pomočjo paraseksualnega ciklusa v rastlini iz blagih, domnevam, da gre za nov, bolj patogen soj. Kako patogen je soj, pa na podlagi dveletnih izkušenj še ne moremo reči. Za ugotovitev patogenosti soja so nujno potrebne posebne raziskave, s katerimi se tudi ugotovi, ali gre za nov soj.

Proti letalni obliki hmeljave uvelosti so uspešni le tolerantni kultivarji ob spremenjenem načinu pridelovanja hmelja na kmetijah, kjer se je pojavila hmeljeva uvelost in dosledno upoštevanje higienskih mer, posebno v času obiranja hmelja.

Ker je povzročitelj bolezni na listi karantenskih škodljivih organizmov, je bilo storjeno vse, da se bolezen ne bo še bolj razširila. Nevarnost je toliko večja zaradi velike koncentracije hmeljišč v Savinjski dolini.

Verticillium wilt on hops (*Verticillium albo-atrum* Reinke at Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn) in Slovenia

ABSTRACT

Mild form of *Verticillium* wilt had been detected for the first time in Slovenia in 1974. Fungi *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae* were identified as pathogens. In 1997 more pathogen, lethal form of *verticillium* wilt was found in Gomilsko, caused by *Verticillium albo-atrum*. 22 ha of hop gardens were found infected in Slovenia. The symptoms of lethal strain were observed and they correspond to the description of progressive form of wilt in England. Mild (fluctuating) and severe (lethal) form can be distinguished first of all by dieing of affected plants at lethal form. Lethal form has ability to spread intensively through the field and to the other hop gardens. Since are fungi *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae* on hops on the Slovenian and EPPO A2 list of quarantine organisms and they endanger Slovenian hop growing all necessary measures were performed to prevent spreading of the disease.

Key words: Hops, *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, symptoms, Aggressiveness

Der Welkeerreger (*Verticillium albo-atrum* Reinke at Berthold und *Verticillium dahliae* Klebahn) auf dem Hopfen in Slowenien

KURZFASSUNG

In Slowenien wurde die Hopfenwelke 1974 auf der Sorte Aurora zum erstenmal festgestellt. Als Krankheitserregern wurden *Verticillium albo-atrum* und *Verticillium dahliae* identifiziert. Die Symptome waren schwach ausgeprägt und entsprachen der Beschreibung von Harvis (1927) für milde Form der Welke. In der Umgebung von Gomilsko (Savinjatal) wurde 1997 eine

agressivere *Verticillium albo-atrum*-Population auf den Sorten Bobek, Aurora und Celea entdeckt. Die Pflanzen starben ab. Die Krankheit breitete sich in der Anlage, so wie in andere Hopfengärten schnell aus. Die Symptome der Erkrankung entsprachen der Beschreibung von Keyworth (1942) für progressive Form der Hopfenwelke. *Verticillium dahliae* und *Verticillium albo-atrum* sind in der A2 Liste der Quarantaenische Organismen. Es wurden alle Massnahmen unternommen, damit sich die Krankheit nicht weiter verbreiten sollte.

Stichwörter: Hopfen, *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, Symptome der Erkrankung, Aggressivität.

Viri:

Clarkson, J.M.; Heale, J.B. (1985b): *Heterokaryon compatibility and genetic recombination within a host plant between hop wilt isolates of Verticillium albo-atrum*. *Plant Pathology*, 34 129-138.

Clarkson, J. M.; 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.

Dolar, M. (1975, 1976): *Hmeljeva uvelost (Verticillium albo-atrum in Verticillium dahliae)*. *Poročila za Sklad B.K. IHP Žalec, Inv. št 18 in 46*.

Dolar, M. (1974): *Pojav ovelosti hmelja v Sloveniji*. *Priloga Hmeljarja*, 8,26.

Griffen A.M.; Bainbridge B.W.; Heale J. B. (1997): *Ribosomal, mitochondrial and amplified DNA polymorphisms in Verticillium albo-atrum pathogenic to hops, lucerne and other plants*. *Mycol. Res.* 101, (9) 1085- 1091.

Harris, R.V. (1927): *A wilt disease of hops*. *Rep. E. Malling Res. Stn. for 1925, II Supplement*, 92-93.

Jary, C.L. (1961): *A summary of the present position*. *Ass. Growers New Varieties of Hops. Annu. Booklet*, p.11.

Keyworth, W.G. (1942): *Verticillium wilt of the hop (Humulus lupulus)*. *Ann. appl. Biol.*, 29, 346-357.

Nazar, R.N., et al (1991): *Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of Verticillium wilt pathogens*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 1-11.

Sewell, G.W.F.; Wilson, J.F. (1974): *Hop Wilt, Soil Temperature and Nitrogen*. *Rep. E. Malling Res. Stn. For 1973*, 203-204.

Sewell, G.W.F.; 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. (1967): *A concept of the host-parasite relationship in Verticillium wilt disease*. *Nature, Lond.*, 202, 361-364.

Zattler, F. (1960b): *Bericht über die Welke-, Nematoden- und Virus-Forschung im Hopfenbau in den Jahren 1958 und 1959*. *Brauwissenschaft*, 13, 159-161.

Zinkernagel V. (1981): *Some aspects concerning the susceptibility and tolerance of hop varieties against Verticillium wilt*. 3rd *International Verticillium Symposium*. (Abstr.) Bari, Italy 67 pp.

Zinkernagel, V. (1982): *Zur Entwicklung von Verticillium spp. In anfälligen und toleranten Hopfensorten nach natürlicher und künstlicher Infektion*. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 89, 4, 205-218.



Foto: M. Žolnir

Hmeljevino iz okuženih hmeljišč so v letu 1998 hmeljarji kompostirali na domačih površinah, nato pa so jo organizirano in pod nadzorom inšpekcije prepeljali na komunalno deponijo.

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA POVZROČITELJIC HMELJEVE UVELOSTI (*Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn)

Andreja ČERENAK¹, Marta DOLINAR², Magda RAK³

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* pogoje 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 pogoje, 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-ih 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 zaenkrat ugotovili le *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold.

1 UVOD

Verticillium albo-atrum Reinke & Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn (razred Ascomycetes), vretenasti talni glivi, sta povzročiteljici hmeljeve uvelosti (uvrščeni na seznam karantenskih škodljivih organizmov). V uravnoteženih pogojih in na drugih rastlinah gostiteljicah nista nevarni, s spremenjenimi ekološkimi pogoji 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 pogojih 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 trt od korenike navzgor, rastlina pa prične naslednje leto z normalnim razvojem. Pri bolj virulentni obliki so znaki obolenja

podobni (prisotni ves čas vegetacije), le da okužena rastlina popolnoma propade. Zgolj vizualni znaki (zvijanje listov navzgor, rumenenje in rjavenje listnih robov, odpadanje le-teh) niso zanesljivi, saj sovpadajo s fiziološkimi motnjami rastline. Bolezen je zelo nevarna, zlasti pri hmelju, ki je večletna rastlina. Glivici namreč napadeta še druge gojene 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 uvelosti. 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 *in vitro* pogoje. 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 značilne znake uvelosti hmelja. Vzorce smo nabrali na območju Gomilskega in Šentruperta v Savinjski dolini ter Šmartnega pri Slovenj Gradcu.

Uporabili smo tehniki prenosa glive v sterilno okolje. Trte, 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 najprimernejša dvodnevna inkubacija. Podaljševanje časa inkubacije se odraža z večjo navzočnostjo drugih, neželenih organizmov (saprofitov)

¹ dipl.biol., ² mag., ³ univ.dipl.inž.agr. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Zalec



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)

na vzorcih trt. Za tehniko prenosa glive v sterilne pogoje 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 smo 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 in *Verticillium dahliae* Klebahn in ju po 20-ih 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 mm) 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 trtah, nabranih na območju Gomilskega, kjer se pojavlja letalna (virulentna) oblika hmeljeve uvelosti, smo zaenkrat ugotovili le *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold.

Čista kultura patogena, prenešana v *in vitro* pogoje, je izrednega pomena za nadaljnje proučevanje virulentnosti glive ter določitve seva oz. sevov, prisotnih v slovenskih hmeljiščih. Zaenkrat 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 prioriteten nalog slovenskih žlahtniteljev hmelja.

4 ZAKLJUČKI

Na podlagi opravljenega poskusa lahko zaključimo:

- S primerjavo različne dolžine trajanja inkubacije smo ugotovili, da je najprimernejša dvodnevna inkubacija.
- Za tehniko prenosa glive v sterilne pogoje 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 trtah, nabranih na območju Gomilskega, kjer se pojavlja letalna oblika hmeljeve uvelosti, smo zaenkrat 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, prisotnih v slovenskih hmeljiščih.

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC AGENTS OF VERTICILLUM WILT (*Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold and *Verticillium dahliae* Klebahn)

Fungi *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold in *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 pri Slovenj Gradcu 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

5 LITERATURA

Data Sheets on Quarantine Pests. *Verticillium* spp. on hops.- Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003.

Dolar, M. (1975): Uvelost hmelja (*Verticillium albo-atrum* in *dahliae*).- Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, poročilo za leto 1975, 12 s.

Dolar, 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.

UKREPI V ZVEZI S HMELJEVO UVELOSTJO V SLOVENIJI V LETIH 1998 IN 1999

Andrej SIMONČIČ¹, Marta DOLINAR²

1 UVOD

V prispevku je predstavljen potek pojava in širjenja hmeljeve uvelosti, ki jo povzročata glivi *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae*, od začetka avgusta 1997 dalje, ko smo dobili prve informacije o sušenju posameznih hmeljnih rastlin v hmeljišču na območju Gomilskega.

V prispevku bomo predstavili aktivnosti, ki jih nameravamo s pridelovalci hmelja ter s fitosanitarno inšpekcijsko službo izvajati v letošnjem letu z namenom pravočasnega odkrivanja okuženih rastlin in hkrati ukrepanja, da se bolezen ne bi širila. Aktivnosti bodo potekale vzporedno na dveh nivojih. Prvi del bo vključeval predvsem strokovno-svetovalno delo, medtem ko bo drugi del aktivnosti povezan z raziskovalnim delom.

V zadnjem delu prispevka pa smo dali poudarek posameznim dejavnikom in agrotehničnim ukrepom, s katerimi lahko preprečujemo ali po drugi strani pospešujemo nastanek in tudi širjenje omenjene bolezni.

2 AKTIVNOSTI V LETU 1998

Letalna (progresivna) oblika bolezni uvelosti hmelja se je v preteklosti v nemških in angleških hmeljiščih že izkazala kot zelo nevarna. V sedemdesetih letih je v Nemčiji uničila okoli 800 ha hmeljišč, v Angliji sicer manj, vendar je ravno tako v veliki meri prizadela hmeljarje v več predelih Anglije. Nevarna je posebej zato, ker na svetovnem tržišču ni kemičnega pripravka, s katerim bi jo bilo mogoče preprečevati, in pa zaradi dejstva, da lahko živi kot parazit ali saprofit na številnih drugih gojenih rastlinah pa tudi na plevelih. Infekcijski pritisk v tleh hmeljišča namreč počasi pada in je zato potrebno kar nekaj let (tudi do 7 let), da se infekcijski pritisk omenjenih povzročiteljev zmanjša do te mere, da je varno ponovno pridelovanje hmelja.

Ker gre za povzročitelja bolezni, ki je tako na slovenski kot na evropski in EPPO listi karantenskih škodljivih organizmov, smo takoj pričeli z aktivnostmi, ki naj bi potrdile sum glede navzočnosti omenjenih povzročiteljev hmeljeve uvelosti, saj bi lahko naredili ogromno škodo tudi slovenskemu hmeljarstvu.

Začetek aktivnosti sega v 5. avgust 1997, ko je pridelovalec z Gomilskega obvestil Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec o propadanju posameznih rastlin v štiriletnem hmeljišču bobka (lokacija Klinca 2). Pri pregledu je bilo ugotovljeno, da so podobne znake opazili tudi v sosednjem hmeljišču drugega lastnika (Lokacija Betonka). Mikroskopski

pregled obolelih rastlin z omenjenih hmeljišč je potrdil sum, da gre za hmeljevo uvelost, vendar simptomi v hmeljišču niso bili povsem identični tistim, ki jih povzroča nam že znana blaga oblika hmeljeve uvelosti. Ker se je vse to dogajalo tako rekoč že v času obiranja, smo sklenili, da bomo v naslednji sezoni pozorno spremljali zdravstveno stanje omenjenih hmeljišč.

V začetku aprila 1998 smo v omenjenih dveh hmeljiščih na Gomilskem zopet opazili propadanje hmeljnih rastlin, katerih znake smo pripisovali posledicam obolezni hmelja s hmeljevo uvelostjo. Ker sta glivi povzročiteljici *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae* na hmelju v Sloveniji uvrščeni na seznam karantenskih škodljivih organizmov, smo sum prisotnosti hmeljeve uvelosti takoj, to je 7. aprila 1998, javili kmetijski inšpekcijski službi v Žalcu. Vsi nadaljnji ukrepi in priporočila pridelovalcem v zvezi s hmeljevo uvelostjo so bili nato koordinirani z Inšpektoratom RS za kmetijstvo, lov in ribištvo v Ljubljani in v Žalcu ter s Službo za varstvo rastlin pri Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP).

Od tega trenutka dalje smo na inštitutu takoj prešli na tako imenovano "izredno stanje". Za hmeljišča s posameznimi obolelimi rastlinami smo odredili karanteno. Od maja dalje smo vsakodnevno opravljali zdravstvene preglede hmeljišč. Ko pa smo opazili, da se znaki uvelosti hmelja kažejo tudi širše, izven prvih dveh nahajališč, smo obseg in natančnost pregledov še povečali in sicer na vse nasade v bližini okuženih hmeljišč, kot tudi na vsa hmeljišča, ki jih obdelujejo lastniki okuženih hmeljišč. Hkrati pa smo pričeli intenzivno pregledovati vsa matična hmeljišča pri nas, saj so le-ta lahko pomemben vir okužbe.

Med letom 1998 smo odkrili povzročitelja hmeljeve uvelosti še dodatno na drugih njivah izven omenjenih kompleksov Klinca 2 in Betonka. Simptome smo našli še v hmeljišču v kompleksu Klinca 1, vendar zaenkrat le na posameznih obolelih oziroma propadlih rastlinah. Kasneje smo hmeljevo uvelost dodatno ugotovili še na nasprotni strani ceste kompleksa Klinca 1 in 2, na lokaciji med avtocesto in reko Bolsko, v Šentrupertu, v bližini bencinskega servisa, v drugi polovici avgusta pa še v bližnji Orli vasi, kjer je bilo v nasadu savinjskega goldinga večje število okuženih rastlin. Glede na občutljivost posameznih hmeljnih kultivarjev lahko na podlagi dosedanjih pregledov ugotovimo, da hmeljeva uvelost ni posebej izbirala kultivarjev, saj smo jo našli na vseh najpogosteje zastopanih kultivarjih pri nas.

Ob koncu hmeljne sezone smo tako od začetnih nekaj obolelih rastlin zabeležili skupno prek 21 ha hmeljišč z večjim številom okuženih rastlin ter dve hmeljišči z eno oziroma z dvema okuženima rastlinama.

^{1,2} mag. agr. zn., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec

Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec smo takoj, ko smo našli prva hmeljišča s propadlimi in propadajočimi rastlinami hmelja, pripravili Navodila o ukrepih za preprečevanje širjenja hmeljeve uvelosti na območju Gomilskega (28. apr. 1998). O omenjeni glivični bolezni smo razpravljali tako na rednih tehnoloških sestankih hmeljarjev in tudi pisali v strokovni reviji Hmeljar in v Hmeljarskih informacijah.

Med rastno dobo smo v okuženih hmeljiščih odvzeli precej vzorcev, ki smo jih mikroskopsko pregledali in ugotovili, da gre za glivo *Verticillium* spp. Dokončno pa smo glivo s postopkom izolacije determinirali ter o tem obvestili MKGP in Inšpektorat 1. oktobra 1998, ko je bilo ugotovljeno, da so pregledani vzorci okuženi le z glivo *Verticillium albo-atrum*. Hkrati smo vzorce hmelja poslali na analizo v Anglijo, od koder pa še nismo dobili odgovora, ki bi dokončno potrdil naše rezultate.

Konec julija in v avgustu smo obiskali vse pridelovalce z okuženimi hmeljišči in se z njimi dogovorili za pravilno ravnanje s hmeljevino z okuženih hmeljišč, predvsem za njeno deponiranje in termično obdelavo. Istočasno smo obiskali tudi vse pridelovalce hmelja, ki obirajo hmelj na skupnem obiralnem stroju v Gomilskem, da bi tudi njih seznanili z nevarnostmi prenosa bolezni z okuženo hmeljevino. S tem v zvezi smo pripravili "Strokovna navodila za pravilno ravnanje s hmeljevino ob okužbi hmeljišč z verticilijem" (18.08.1998) ter "Mnenje o primernosti lokacij za deponiranje in termično obdelavo hmeljevine, okužene z verticilijem" (18.08.1998). Na podlagi teh mnenj so pridelovalci kasneje od inšpekcijske službe prejeli odločbe o izvajanju omenjenih ukrepov.

Pridelovalci z okuženimi hmeljišči so priporočila upoštevali, skrbno so izvedli spravilo hmelja in deponirali oziroma odstranili hmeljevino na dogovorjen način.

Konec leta 1998 pa je večina pridelovalcev, pri katerih smo v hmeljiščih našli večje število okuženih in odmrlih rastlin, hmeljne rastline v skladu z odločbo inšpekcijske službe uničila s herbicidom in pozneje izorala. Pridelovalci, ki jih je jeseni prehitel sneg, pa so ukrep uničenja in izoravanja hmelja opravili v letošnjem letu. Tu gre skupno za že prej omenjenih 21 ha hmeljišč.

Pri dveh pridelovalcih, kjer smo našli v hmeljiščih le po eno oziroma dve okuženi rastlini, pa so le-ti morali uničiti posamične okužene rastline ter hmeljne rastline v neposredni bližini zaradi suma, da so obobile, čeprav simptomov niso kazale. Ta hmeljišča in tudi posamezna očiščena mesta bomo v letu 1999 še posebej natančno pregledovali in spremljali.

3 AKTIVNOSTI V LETU 1999

Po končani lanski rastni dobi smo na inštitutu s Službo za varstvo rastlin pri MKGP pričeli pripravljati strategijo reševanja problematike pojava progresivne oblike hmeljeve uvelosti. V letošnjem letu nameravamo na inštitutu s pridelovalci v še večjem obsegu izvajati različne ukrepe z namenom preprečevanja in širjenja bolezni, med katerimi bodo najpomembnejši:

1. Redno in sistematično bomo spremljali karantenski škodljivi organizem v okviru preverjanja zdravstvenega stanja rastlin. To je zaradi preprečevanja vnosa in širjenja karantenskega škodljivega organizma, pravočasnega izvajanja ukrepov in za njegovo zatiranje izrednega pomena. Pri tem bodo posebne pozornosti deležna matična hmeljišča, iz katerih nabiramo sadilni material. Tudi v tem primeru je potrebno poudariti, da je zelo pomembno tesno sodelovanje s hmeljarji, saj so le ti tisti, ki so v sezoni vsakodnevno v svojih hmeljiščih in so s tem prvi, ki lahko opazijo kakršnekoli nepravilnosti v rasti in razvoju hmelja.

2. Spremljali bomo infekcijski pritisk bolezni s posaditvijo kontrolnih hmeljnih rastlin v hmeljiščih, ki so izorana in so v premeni.

3. Podrobneje bomo pripravili navodila in predlagali ukrepe glede upoštevanja higienskih mer ali standardov (razkuževanje in čiščenje strojev in opreme).

4. Preverjali bomo možnosti uvajanja spremenjenih oziroma prilagojenih tehnologij pridelave hmelja, ki zmanjšujejo, če že ne preprečujejo pojav in širjenje bolezni (odoravanje, rez, gnojenje, kultiviranje, uničevanje odvečnih poganjkov, vsejavanje podorin, uničevanje plevelov in mulčenje...)

5. Preverjanje različnih možnosti glede ravnanja s hmeljevino z okuženih hmeljišč (prevozi, deponiranje, kompostiranje), pri čemer velja posebna pozornost predvsem pravilu hmelja z obiralnimi stroji, ki so v skupni rabi, ter iskanju primernih mest za deponiranje in kompostiranje hmeljevine.

6. Redno bomo obveščali fitosanitarno inšpekcijsko službo ter Službo za varstvo rastlin in vsestransko sodelovali z njima pri pripravi predlogov administrativnih ukrepov kot tudi strokovnih podlag za eradikacijo bolezni pri pridelovalcih z okuženimi hmeljišči ter pri varovanju sosednjih, še neokuženih hmeljišč, da se bolezen ne bi širila.

Ob omenjenih strokovno svetovalnih aktivnostih bo potrebno pričeti tudi z obsežnejšimi raziskavami na področju ugotavljanja patogenosti našega soja povzročitelja hmeljeve uvelosti in določiti občutljivost naših hmeljnih kultivarjev na povzročitelja hmeljeve uvelosti. Hkrati nas čakajo raziskave na področju žlahtnjenja oziroma vzgoje kultivarjev, ki so na hmeljevo uvelost tolerantni ali vsaj manj občutljivi, kar je eden naših glavnih ciljev.

Strategija pristopa reševanja obolezlosti hmelja z letalno obliko hmeljeve uvelosti je po strokovni plati sicer jasna, vendar pa je samo ukrepanje odvisno od različnih dejavnikov. Precej aktivnosti je časovno omejenih in bi jih morali pričeti kot tudi dokončati v kar najkrajšem času. Kot običajno pa je večina potrebnih aktivnosti povezanih z veliko dela in denarja. Še posebej zadnji del, v katerem bo potrebno opravljati raziskave na področju žlahtnjenja ter ugotavljanja občutljivosti hmeljnih kultivarjev v kontroliranih pogojih, bo zahteval precej vloženega časa in primerne opreme. Zato upamo, da bomo pri reševanju omenjenih težav naleteli na pozitiven odziv na ustreznih ministrstvih.

4 PRIPOROČILA ZA PRIDELOVALCE NA OGROŽENIH OBMOČJIH (VELJA TUDI ZA VSE OSTALE)

V zadnjem delu bi vas radi opozorili na nekatere ukrepe, ki niso stvar raziskav, temveč so dejavniki, za katere vemo, da so v tesni povezavi s hmeljevo uvelostjo in bi jih bilo zaradi tega potrebno upoštevati. Omenjena priporočila sicer veljajo predvsem za lastnike okuženih hmeljišč, bilo bi pa zeželeno, da bi jih v glavnem upoštevali tudi pridelovalci v sosesčini oziroma vsi ostali hmeljarji.

Opozorili bi vas radi predvsem na naslednje ukrepe:

4.1 Higienški ukrepi pri oskrbovanju hmeljišč in obiranju hmelja

Pri tem je zelo pomembno razkuževanje strojev in opreme ter vrstni red oskrbovanja hmeljišč, pri čemer najprej oskrbimo zdrava oziroma najmanj rizična hmeljišča. Večini hmeljarjev so te ali podobne zahteve že znane iz priporočil ukrepov glede preprečevanja širjenja povzročiteljev virusnih obolenj (slika 1).

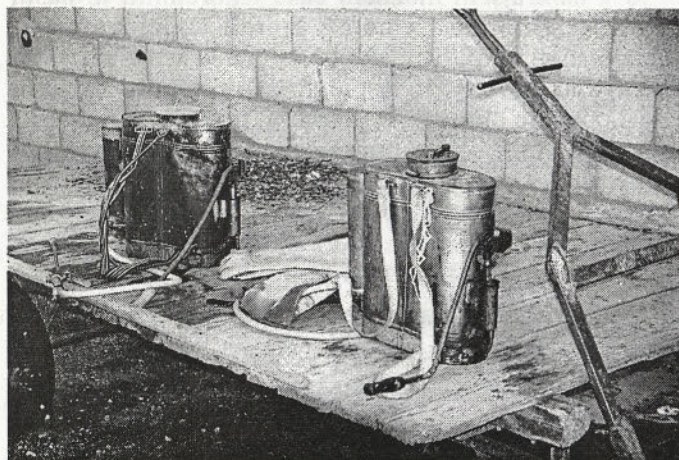


Foto: A. Simončič

Slika 1: Razkuževanje orodja, strojev in pranje traktorskih ter drugih koles je nujen ukrep po obdelavi okuženih hmeljišč.

4.2 Redni pregledi hmeljišč in javljanje vseh nepravilnosti v hmeljiščih,

ki bi lahko bile povezane z omenjeno boleznijo. Na oddelku za varstvo rastlin in na inštitutu namreč brez vaše pomoči ne bomo mogli pravočasno izslediti vsakega novega izbruha bolezni in tako kar najhitreje ukrepati, kar je pri tej bolezni najpomembnejše. Sprotno in pravočasno odstranjevanje obolelih rastlin lahko namreč v veliki meri reši hmeljišče pred celotnim uničenjem.

4.3 Upoštevanje navodil svetovalne in strokovne službe

na inštitutu glede tehnologije pridelovanja in obiranja hmelja kot tudi deponiranja in kompostiranja ostankov hmelja (slika 2).

4.4 Priporočila v zvezi s tehnologijo pridelave:

- **gnojenje:** Znano je, da dušik kot tudi druga mikro in makro hranila za normalne pridelke potrebujemo v

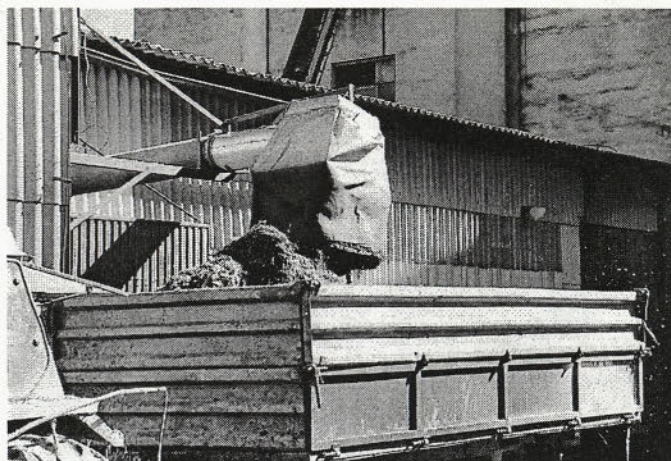


Foto: A. Simončič

Slika 2: Pri obiranju okuženih hmeljišč moramo poskrbeti, da vse ostanke (hmeljevino) brez trošenja deponiramo na za to določenem mestu.

količinah, ki so znane kot odvoz rastlin. Hkrati pa je iz raziskav o hmeljevi uvelosti znano, da zmanjšani odmerki dušika zmanjšajo odstotek obolelih in propadlih rastlin. Zato je najmanj, kar lahko pridelovalci v tem primeru naredite, da redno spremljate založenost tal ter strogo upoštevate gnojilne norme. Za vse, ki pa iz analiz tal vedo, da so njihova tla prekomerno založena, kar je v hmeljarstvu zelo pogost pojav, pa velja priporočilo, da se posvetujete o možnostih uporabe manjših odmerkov od splošno predpisanih. Za vse pa velja priporočilo, da ne uporabljate več kot 180 kg dušika na ha, kar je za marsikoga še vedno ustaljena praksa.

- **Obdelava tal** zelo ugodno vpliva na širjenje bolezni, saj omogoči glavni prenos povzročiteljev bolezni ravno uporaba traktorjev in različnih orodij, ki mešajo in prenašajo zemljo in rastlinske ostanke. Z minimalno obdelavo bi zato lahko v največji meri preprečevali oziroma upočasnili širjenje bolezni. S tem v zvezi je zato priporočljivo, da vse ukrepe v hmeljiščih opravljate skladno s priporočili, pravočasno in v času, ko so tla primerna za posamezne tehnološke postopke obdelave.

- **Pri kemičnem čiščenju** odvečnih hmeljnih poganjkov se moramo odreči uporabi *amonsulfata* oziroma UANa, ki še dodatno povečujeta skupno količino dušika. V ta namen bi bilo potrebno zopet razmišljati o uporabi herbicidov, kot je npr. dikvat (reglone 14), ki je tudi v Nemčiji zopet namensko dovoljen za uporabo predvsem zato, da bi zmanjšali porabo dušika. Na žalost moramo v tej situaciji izbirati med dvema neželenima ukrepoma: med herbicidi in med dušičnimi gnojili. Tudi herbicidi namreč pri hmeljarski pridelavi niso želeni in je njihovo uporabo brez resnično pomembnih vzrokov izredno težko opravičiti. Vendar v primeru pojava hmeljeve uvelosti mislimo, da bi bilo smiselno vsaj v hmeljiščih, ki jih škropimo po nemškem škropilnem programu, pridobiti dovoljenje za uporabo dikvata, ki bi kemično čistil odvečne poganjke.

- **Zatiranje plevelov** bi morali izvajati tako, da z obdelavo tal ne bi širili bolezni, torej bi bili za takšne razmere najugodnejši herbicidi, ki pa pri nas zaenkrat niso dovoljeni. Tudi v tem primeru bi bili herbicidi (lahko tudi foliarni, kratkoobstojni in zato okolju in hmelju



Foto: A. Simončič

Slika 3: Širokolistni pleveli pomagajo preživeti glivicam iz rodu *Verticillium* spp., zato jih je potrebno zatirati.

povsem nenevarni) v veliko pomoč pri preprečevanju širjenja bolezni. Ne glede na to pa bo potrebno herbicide na podlagi glifosata uporabiti v hmeljiščih pri posamičnem uničevanju obolelih rastlin in na mestih, kjer smo uničili in odstranili posamezne obolele in odmrle rastline, saj bo v naslednjih štirih letih obvezne premene potrebno vzdrževati površino brez širokolistnih plevelov.

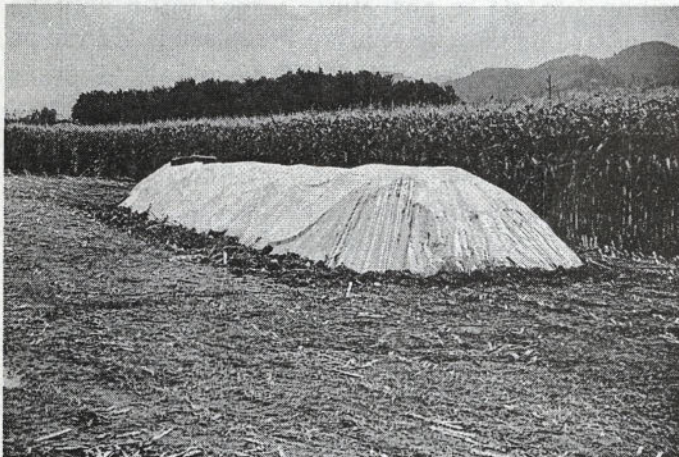


Foto: A. Simončič

Slika 4: Hmeljevino na deponiranem mestu prekrijemo s folijo, da dosežemo pregrevanje in s tem uničenje glivic.

- **Kompostiranje** hmeljevine bo potrebno izvajati povsod in to na način, ki bo zagotovil uničenje povzročiteljev hmeljeve uvelosti ter s tem preprečil ponovni vnos okužene hmeljevine v hmeljišča. Kljub vsemu pa se moramo tudi v tem primeru ponovno vprašati, če je neobdelano hmeljevino (tudi tisto, ki z verticilijem ni okužena) smiselno vračati v hmeljišča, saj se s tem tveganje za neugodne učinke na zdrav nasad veča.

5 ZAKLJUČEK

Pri aktivnostih v zvezi s hmeljevo uvelostjo je bilo zaradi obsežnosti dela že do sedaj vključenih precej ljudi. Zato se želimo ob tej priložnosti zahvaliti vsem sodelavcem. Hkrati se zahvaljujem tudi Službi za varstvo rastlin pri MKGP, ki nam je zagotovilo sredstva in na podlagi sprejete strokovne naloge pomagala pri izvajanju nalog monitoringa in diagnosticiranja hmeljeve uvelosti v Sloveniji leta 1998. Zahvala gre tudi Inšpektoratu za kmetijstvo, lov in ribištvo, s katerim smo vso sezono sodelovali in usklajevali naše aktivnosti. Upamo, da bomo uspeli s skupnimi močmi in naporu hmeljevo uvelost v kar največji meri zadržati v obstoječem obsegu in jo v najkrajšem možnem času izkoreniniti iz naših hmeljišč. Pri tem pa bomo morali sodelovati vsi: pridelovalci, strokovne službe kot tudi Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano s svojimi službami. Kajti, če kje, potem v primeru hmeljeve uvelosti zagotovo velja, da je preprečevati bistveno lažje kot zdraviti.

Measures concerning *Verticillium* wilt in Slovenia in 1998 and eradication program in 1999

Abstract

All the activities connected with outbreak of *Verticillium* wilt in Slovenia in 1998 are described in the paper. In 1998 over 21 ha of hop were identified to be infested. Until now only the *Verticillium albo-atrum* has been identified after isolation from suspect plant tissue. Besides the control and preventive measures which were applied last year as well as the activities which will have to be done this year to prevent the spread of disease are discussed in the paper.



Foto: V. Knapič

Slike 1 - 3:

V nekaj nasadih hmelja smo v letih 1996, 1997 in 1998 opazili simptome zaostajanja v rasti v juniju, deformacije polnorazvitih listov, odklanjanje rastnih vršičkov od opore in razbarvanje mlajših listov. Simptomatične rastline so rastle v skupinah. Tako širjenje okužbe je značilno za povzročitelje, ki se širijo z obdelavo (talne glive, virusi, viroidi).

VIROIDI V SLOVENSKEM HMELJU

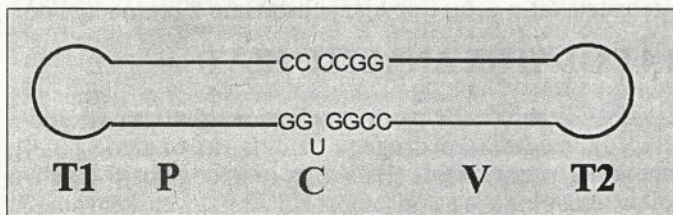
Vlasta KNAPIČ¹, Branka JAVORNIK²

Viroidi so najmanjši rastlinski patogeni, ki so se sposobni v rastlinski celici sami razmnoževati. Pri tem uporabljajo mehanizme in gradnike rastlinske celice in podobno kot virusi slabijo rastline na celičnem nivoju. Do sedaj so odkrili 26 vrst viroidov, ki okužujejo različne vrste rastlin. V slovenskih kultivarjih hmelja smo z metodo povratne elektroforeze na poliakrilamidnem gelu (R-PAGE) dokazali okuženost vseh vzorcev s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd), medtem ko drugega viroida, ki okužuje hmelj, hmeljevega stunt viroida (HSVd), nismo mogli najti. Pregledali smo vzorce cv. savinjski golding, cv. aurora in cv. apolon, ki so slovenskega porekla ter cv. magnum, ki je k nam introducirana iz Nemčije. Analizo istih vzorcev na prisotnost HSVd v slovenskem hmelju so opravili na Univerzi Hiroasaki na Japonskem. Uporabili so različne metode elektroforeze na poliakrilamidnem gelu in metode hibridizacije. Vse metode določevanja so pokazale, da slovenski kultivarji hmelja niso okuženi s HSVd, ki je na Japonskem karantenski organizem.

1 UVOD

Rastlinske bolezni povzročajo različni organizmi kot so: glive, nematode, pajkovi, žuželke pa tudi enostavnejše oblike kot so bakterije, fitoplazme, riketsije, virusi in organizmi, ki so manjši od virusov. Bakterije so najmanjši enocelični organizmi, saj virusi in manjši mikroorganizmi nimajo celične membrane, citoplazme ali celičnega jedra. Viruse sestavlja nukleinska kislina in proteinski plašč. Subviralni patogeni, ki pa še proteinskega plašča nimajo, so: viroidi, sateliti in majhne RNK. Viroidi so najmanjši rastlinski patogeni, ki se lahko samostojno razmnožujejo. Njihov RNK genom je dolg le 246 - 375 nukleotidov. Lahko povzročijo resne simptome na rastlinah in zmanjšajo pridelek. V naših razmerah lahko okužujejo hmelj, krompir, paradižnik in sadne vrste.

Viroidi so premajhni, da bi jih zaznali z elektronsko mikroskopijo in ker nimajo beljakovin, jih tudi s serološkimi testi (kot je ELISA) ne moremo zaznati in so molekularne metode edini mogoči način detekcije. Molekularne tehnike za določanje subviralnih patogenov, ki jih v Sloveniji uvajamo, so: povratna elektroforeza na poliakrilamidnem gelu (R-PAGE), hibridizacijska metoda z obeleženo sondo in verižna polimerazna reakcija (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR).



Slika 4: Shema zgradbe viroida. Viroid je enolinijska ribonukleinska kislina, kjer se baze med seboj privalčijo in tvorijo navidezne pare. T1, T2- prva in druga terminalna cona, na katerih se viroidi spajajo z drugimi molekulami; P- cona patogenosti, ki določa gostitelja; C- konservirani center, ki je pri sorodnih viroidih zelo podobno sestavljen; V-cona variabilnosti, v kateri nastaja največ sprememb v zaporedju baz (po Keese in Symonsu cit. v Hanold, 1993).

¹univ.dipl.inž.agr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, ² prof.dr., Biotehniška fakulteta, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Ljubljana

Evropski hmelj je vesplošno okužen s Hop latent viroidom - HLVd, ki povzroča latentno bolezen hmelja in simptomov ne kaže, slabi pa rastline na celični ravni in s tem vpliva na pridelek alfa kislin in eteričnih olj. V Angliji so v primerjavi z viroidi okuženih in neokuženih rastlin ugotovili pri različnih kultivarjih od 20 do 50% znižanje pridelka alfa kislin in imajo utečeno pridelavo brezvirusnih in brezviroidnih sadik hmelja (Morton *et al.*, 1993). Predhodna testiranja, ki so jih opravili na hmeljarskem inštitutu v Huellu in na Max-Planck inštitutu za biokemijo v Nemčiji (Dolinar, 1993) so pokazala, da je tudi slovenski hmelj okužen s hmeljevim latentnim viroidom.

V nekaj nasadih hmelja pa smo v letih 1996, 1997 in 1998 opazili simptome zaostajanja v rasti v juniju (aurora), deformacije polnorazvitih listov (aurora, magnum), odklanjanje rastnih vršičkov od opore (apolon, aurora) in razbarvanje mlajših listov (aurora). Simptomatične rastline so rastle v skupinah v vrstah ali v krogih, imele so močno znižan pridelek, simptomi pa so se pojavili v stresnih razmerah (suša, nihanje temperature, pregloboka rez korenike). Opisani simptomi ustrezajo tistim, ki jih povzroča hmeljev stunt viroid (HSVd), ki je karantenski organizem na Japonskem (slike 1-3 na strani 42).

S povratno elektroforezo viroidne RNK na poliakrilamidnem gelu (R-PAGE - return polyacrylamid gel electrophoresis), je mogoče ločiti ribonukleinske kisline obeh viroidov od rastlinske RNK in DNK. Ker je R-PAGE metoda dovolj zanesljiva za določanje viroidov, primerna tudi za serijsko testiranje in hkrati najcenejša molekularna metoda, smo jo prilagodili in z njo preverili zastopanost HLVd in HSVd v slovenskih kultivarjih hmelja.

2 MATERIALI IN METODE

Z metodo povratne elektroforeze na poliakrilamidnem gelu (R-PAGE) smo analizirali vzorce cv. savinjski golding, cv. aurora in cv. apolon, ki so slovenskega porekla ter cv. magnum, ki je k nam introducirana iz Nemčije. Junija 1997 smo nabrali mlade, polnorazvite liste z listnimi peclji in avgusta še dozorele storžke posameznih kultivarjev. Polovico vsakega rastlinskega vzorca smo posušili na 60°C, drugo polovico pa zamrznili na -20°C. Vzorce smo ponovili v letu 1998.

Spomladi se zaradi prenizkih temperatur viroidi slabše izrazijo, čeprav so jih dokazali že v mladih poganjkih hmelja v maju (Matoušek, 1994). V Angliji se je pokazalo najuspešnejše nabiranje v juniju, ko hmelj doseže vsaj 2 tretjini končne višine (Adams, 1992).

Za en vzorec smo nabrali do 10 g suhega rastlinskega tkiva. Liste ali sveže storžke je potrebno nabirati v PVC vrečke debelejše stene, da se ne izsušijo in jih takoj porabiti. V hladilniku jih lahko hranimo dva dni, dlje časa pa jih hranimo na -20°C. Viroidi se ohranijo tudi v posušeni storžkih v temnem prostoru na sobni temperaturi. V letu 1997 smo nabrali 19 svežih vzorcev mladih listov v juniju in 176 vzorcev posušeni zrelih storžkov, ki smo jih odbrali iz arhivskih vzorcev pri prevzemu hmelja za prodajo. V zmrzovalnik na -20°C smo shranili naključno izbrane vzorce glavnih kultivarjev hmelja, ki jih pridelujemo v Sloveniji in sicer: 34 vzorcev savinjskega goldinga, 106 vzorcev aurore, 23 vzorcev bobka, 8 vzorcev celeje in 5 vzorcev magnuma. V letu 1998 smo nabrali 14 svežih vzorcev v juniju in 171 vzorcev storžkov.

Ekstrakcija in določanje viroidne RNK je težavno, saj je v rastlinskem materialu v nizkih koncentracijah in je je v primerjavi z rastlinsko RNK neprimerno manj, zlahka pa se tudi kontaminira z ribonuleazami (RNAze), ki jo razgradijo. Zato moramo posebej razkuževati delovne površine, steklovino, uporabljati "RNAse free" reagente in nositi rokavice. Vse postopke hladimo, vso vodo za reagente pa tretiramo z dietil pirokarbonatom (DEPC), terilnice temeljito operemo in namočimo za 10 min v 10 % KOH ali NaOCl (5 g/600 ml), splaknemo z DEPC tretirano vodo in posušimo v sušilniku. Elektroforetske posode napolnimo s 3% H₂O₂ in jih po 10 minutah splaknemo z avtoklavirano DEPC vodo. Zaradi rabe organskih topil in hlajenja delamo ekstrakcijo v digestoriju.

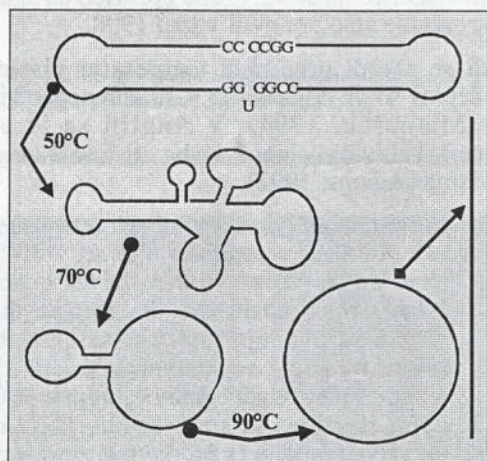
2.1 EKSTRAKCIJA CELOKUPNIH NUKLEINSKIH KISLIN

Za ekstrakcijo viroidne RNK iz hmelja smo uporabili modificiran postopek, ki ga opisuje *ta Sano* in *Shikata* (1988). Preizkusili smo več načinov čiščenja nizkomolekularnih RNK, kot predlagajo avtorji *Schumacher* (1986), *Puchta* (1988), *Schroedter* (1989), *Hataya* (1992) ter *Wah* in *Yang* (1996).

Preizkušali smo ekstrakcijo iz različne količine izhodiščnega rastlinskega materiala. Zatehte rastlinskega tkiva (posušenih zrelih celih storžkov in listov) so bile: 0,3 g, 0,5 g, 1,0 g in 1,5 g. Proporcionalno zatehti smo izbirali tudi centrifugirke (1,5 ml, 2,5 ml in 30 ml) in količino dodanega ekstrakcijskega pufra (0,5 ml, 1 ml in 10 ml). V postopku ekstrakcije, ki za en vzorec traja dva dni, smo dobili v vodi ali TE pufu raztopljene nukleinske kisline, med katerimi so bile tudi viroidne. Te raztopine smo analizirali v postopku povratne elektroforeze, kjer se molekule razporedijo pod vplivom električnega toka po njihovi teži. Ker je viroidna RNK zelo majhna, potuje hitro skozi gel, zato jo lahko prepoznamo.

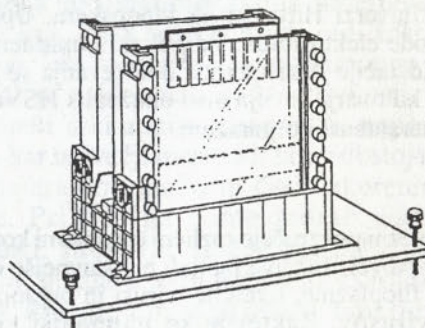
2.2 ELEKTROFOREZA NA POLIAKRILAMIDNEM GELU

Za določevanje hmeljevega latentnega viroida (256 nukleotidov) smo uporabili različne koncentracije poliakrilamida (PAA): od 5% (*Singh*, 1994) do 15% (*Shikata*, 1985). Najpogosteje smo uporabili nenedenaturacijski 6% in 7% PAA gel (AA:bisAA=30:0,75), v katerem se uspešno ločijo nukleinske kisline s 75 do 470 baznimi pari (*Sambrook*, 1989).



Slika 5: R-PAGE izkorišča sekundarno strukturo viroida, ki je v naravnem stanju paličaste oblike, v denaturacijskih razmerah (kot je npr. segrevanje) pa se vezi med komplementarnimi baznimi pari pretrgajo in nastane krožna molekula RNK (*Morris* in *Wright*, 1975). Ta v gelu potuje počasneje od ostalih ravnih rastlinskih RNK in DNK molekul in se na ta način od njih loči.

Vzorcem je potrebno pred nanašanjem dodati barvilo in glicerol, ki omogoči usedenje vzorca na dno žepka v gelu in s tem enakomeren začetek potovanja. Električni tok steče skozi gel s pomočjo pufru, ki ga obdaja. Elektroforeza je potekala prvo smer (od - k +; negativno nabite nukleinske kisline potujejo navzdol) v pufu s 5% razt. koncentrirane TBE (TRIS-trizma base, borova kislina - H₃BO₃ in 0,5 M EDTA pH 8) ob hlajenju pri konstantnem toku 88 - 91 mA za dve vertikalni plošči velikosti 15 x 16 cm in 15 mm debel gel. Na vsak gel lahko nanesemo 14 ali 22 vzorcev. Pri tem 15 l vzorca redčimo s 15 l nanšalnega pufra (glicerol, ksilencianol, bromfenol modro in TBE). Ko barvilo bromfenol modro pripotuje do roba plošče, ustvarimo denaturacijske pogoje s segrevanjem gela. Za povratno elektroforezo obrnemo električni tok, gel pa vstavimo v puf z 1,25% raztopino 10x koncentrirane TBE, segret na 95 °C. Povratna elektroforeza je potekala pri 68 °C polovični čas prve elektroforeze.



Slika 6: Poliakrilamidni gel vlijemo med stekleni plošči, zvrha vstavimo glavnik, ki oblikuje žepke, v katere kasneje, ko je gel polimeriziran (strjen), nanesemo vzorce z raztopljenimi nukleinskimi kislinami. Elektroforeza lahko hkrati poteka z dvema, štirimi ali šestimi geli, vsak ima po 14 ali 20 vzorcev.

2.3 BARVANJE GELOV

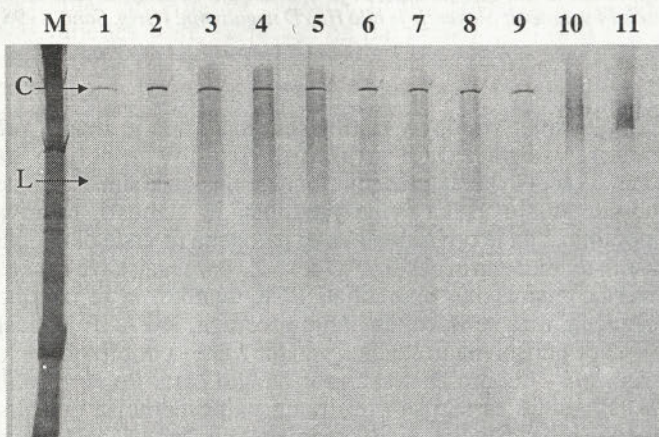
V prozornem gelu razvrščene nukleinske kisline postanejo vidne šele po barvanju. Pasove nukleinskih kislin smo pobarvali s srebrom in ob presvetlevanju slikali elektroforegram. Barvanje s srebrom je modificiran *Promega* protokol (*Promega Silver Sequence*): fiksiranje gela s 7,5% ledeno hladno očetno kislino za 2 minuti, čemur sledi trikratno spiranje gela z destilirano vodo in nato 30 min barvanje s srebrom (5 ml 20 % AgNO₃ in 1,5 ml 37 % formaldehida na liter raztopine). Razvijanje gela poteka v ohlajeni raztopini natrijevega karbonata (dodamo 0,15% raztopino 37% formaldehida in 2 mg/l Na tiosulfata) dokler ne dobimo zelene intenzitete črt v gelu. Razvijanje ustavimo z očetno kislino.

2.4 DODATNE ANALIZE HSVd

Z R-PAGE smo našli pas s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd), medtem ko drugega viroida, ki okužuje hmelj, hmeljevega stunt viroida (HSVd), nismo mogli najti. Analizo istih vzorcev hmelja na prisotnost HSVd v slovenskem hmelju so opravili na Univerzi *Hirosaki* na Japonskem. Za vzorce iz hmeljišč, ki so kazali simptome, podobne stunt viroidu, so uporabili tri metode elektroforeze na poliakrilamidnem gelu (povratno - R-PAGE, sekvenčno - S-PAGE in dvodimenzionalno - 2D-PAGE), kontrolno Northern hibridizacijo in še dot-blot hibridizacijo s cRNA sondo, označeno z dioksigeninom.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

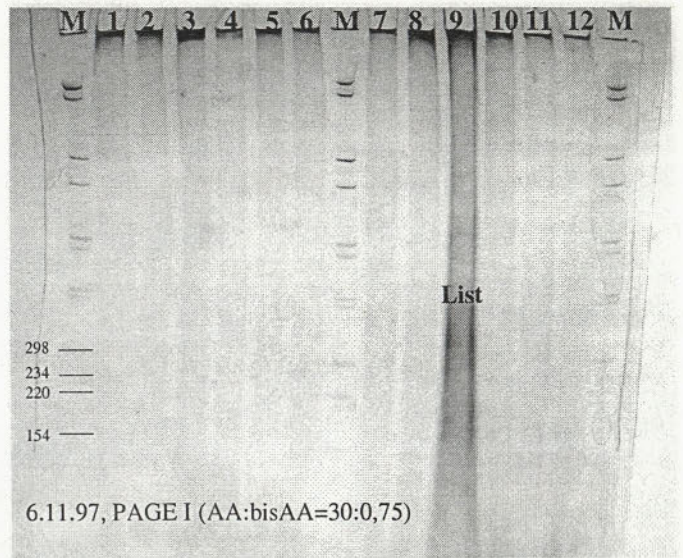
Prva diagnostika viroidov je temeljila na simptomih gostiteljskih in testnih rastlin ter na analizi primarnih metabolitov gostiteljskih rastlin. Oboje je pri HLVd nezanesljivo, saj značilnih vidnih simptomov v običajnih rastnih razmerah ne povzročata. Nato so poskusili izolirati povzročitelja z ekstrakcijo s fenolom in različnimi pufrji ter s sedimentacijo (Shikata, 1985), kar je podlaga določanja še sedaj. Pri ekstrakciji je ključni korak odstranitev beljakovin in inaktivacija encimov, kar dosežemo z ekstrakcijo vodne raztopine nukleinskih kislin z organskimi topili (fenol : kloroform : izoamilalkohol). Vendar pa fenolna ekstrakcija ne zadošča za odstranitev encimov ribonukleaz (RNAaze), ki lahko hitro razgradijo viroidno ssRNA. Ribonukleaze lahko obnovijo aktivnost po mnogih oblikah tretiranja (kot je npr. kuhanje). Reducent kot je beta-merkaptetanol jih inaktivira, pomaga razbiti celico, hkrati je antioksidant, ki prepreči oskidanje fenolov in s tem rjaveneje vzorcev. Dodatek natrijevega dodecyl sulfata (SDS - sodium dodecyl sulfat) služi za separacijo lipidov in proteinov, hkrati je tudi reverzibilni inhibitor ribonukleaz.



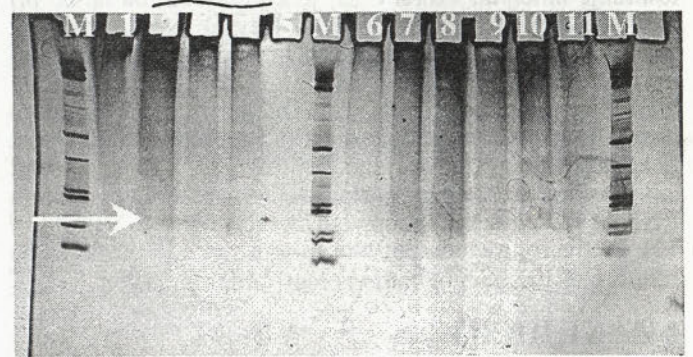
Slika 7: Pri dobro čiščenih vzorcih lahko vidimo tako krožno obliko viroida (C-cirkularno), kot linearno obliko (L), ki v gelu pripotuje dlje. 1 - Marker; 2 - aurora '93 list; 3 - brezvirusna aurora '96/list; 4 - 7 aurora 89/storžki; 8 - savinjski golding; 9 - apolon '93; 13, 14 - magnum 97. magnum ima v primerjavi z ostalimi kultivarji tudi veliko sekundarnih metabolitov, ki motijo detekcijo viroida - tako krožno kot linearno obliko zaznamo kot enoten pas (Sano, 1998).

Viroidna RNA je v rastlinskem materialu v zelo nizkih koncentracijah, zato je razvoj učinkovite metode ekstrakcije viroidne RNK bistvenega pomena za njihovo nadaljnje določevanje. Na Češkem je bila koncentracija HLVd 4,3 pg/mg lista hmelja iz nasada in 25 pg/mg lista iz meristema vzgojene rastline v rastlinjaku (Matoušek, 1994). Ker je viroidna RNK v rastlinskem materialu v zelo nizkih koncentracijah, je tudi po ekstrakciji dobimo v majhnih količinah. Pri metodi, kot je R-PAGE pa je od količine viroidne RNK odvisna intenzivnost pasu v gelu - več ko je viroida, lažje ga zaznamo kot viroidno črto v gelu. Delno lahko rešimo ta problem s povečevanjem začetne količine vzorca. V prvih objavah o določanju hmeljevega stunta viroida so ekstrakcijo opravili iz 200 g zmrznjenih hmeljevih listov (Shikata, 1985), danes pa jo delamo iz 0,5 g do 1,5 g vzorca. Velika začetna količina vzorca namreč zahteva velike epruvete, ki jih je po uporabi potrebno prati, in veliko porabo hlapljivih organskih topil, ki so zdravju zelo škodljiva. Da se temu izognemo opravljamo fenolno ekstrakcijo v mikrocentrifugirkih za enkratno uporabo, ki vsaka sprejme le 0,15 -0,3 g vzorca.

Ekstrakcija RNK iz tkiva hmelja ali vinske trte, ki je bogato s polifenoli in polisaharidi, je še težja, saj vzorci ob oksidaciji



Slika 8: Čiščenje rastlinskih vzorcev je pri ekstrakciji izredno pomembno. Vsi vzorci so zreli hmeljni storžki, razen št. 9, ki je list - listi imajo veliko večjo vsebnost sekundarnih metabolitov, ki motijo vidnost pasov nukleinskih kislin in jih težko očistimo. Poleg vzorcev nanašamo marker (M), v katerem so nukleinske kisline z znano dolžino oziroma molekulsko težo. Viroidni pas v vzorcih primerjamo z zadnjimi štirimi pasovi markerja. Čiščenje ekstrahiranih nukleinskih kislin iz hmelja je bilo tu uspešno, vendar se je precej viroidne RNK v povečanem številu korakov razgradilo.

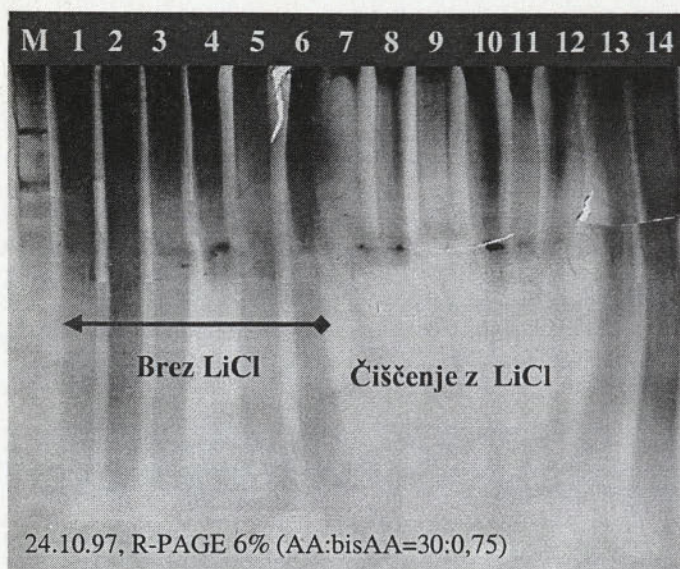


Slika 9: Isti vzorci, kot na sliki 8 po povratni elektroforezi. Puščica označuje šibke viroidne psove v vzorcih hmelja: 1 japonski hmelj *H. japonicus*; 2 Aurora Log; 3 japonski hmelj *H. japonicus*; 4 Apolon Koroška s simptomi; 5 Savinjski golding št. 332 brez LiCl; 6 Magnum s simptomi; 7 Savinjski golding št. 332 z LiCl; 8 Magnum s simptomi z LiCl; 9 - 11 PL pozitivna kontrola; M - marker. ta slika ne more potrditi pozitivnih vzorcev.

porjavijo in to se kasneje opazi tudi na gelih. Moteče spojine med barvanjem še potemnjajo in zakrijejo pasove nukleinskih kislin, ki jih v gelu določamo vizualno. Vzorce je s ponavljanjem korakov čiščenja in precipitacije sicer mogoče očistiti, vendar pri tem večamo možnost, da se vzorci kontaminirajo z RNAzami in se količina RNK spet zmanjša (Sliki 8 in 9).

Modificirali smo tudi skrajšan postopek čiščenja po Schroedterju (1989), ki ne daje čistih vzorcev in lepih slik, vendar so viroidni pasovi še jasno vidni. Pri ekstrakciji viroidne RNA nastopi tudi ta težava, da po precipitaciji z LiCl analiziramo supernatant - tisti del, ki ga drugi raziskovalci običajno zavržejo in obdržijo čist skupek visokomolekularnih nukleinskih kislin.

Postopek hitre ekstrakcije (traja 6 ur) kot jo opisuje Schroedter za viroid vretenatosti iz krompirjevih gomoljev za hmelj ni uporaben, ker vzorce premalo očisti. Običajna ekstrakcija iz



#1 x 1	#2 x 1	#3 x 1	#4 x 1	#5 x 1	#6 x 1	#7 x 1	#8 x 1	#9 x 1	#10 x 1
#1 x10	#2 x10	#3 x10	#4 x10	#5 x10	#6 x10	#7 x10	#8 x10	#9 x10	#10 x10
#11 x 1	#12 x 1	#13 x 1	#14 x 1	HSV x 1	HSV x 1				
#11 x10	#12 x10	#13 x10	#14 x10	HSV x10	HSV x10				

x 1: original solution, x 10: 10-times diluted solution

HSV: 2M LiCl soluble nucleic acids extracted from HSVd infected hop

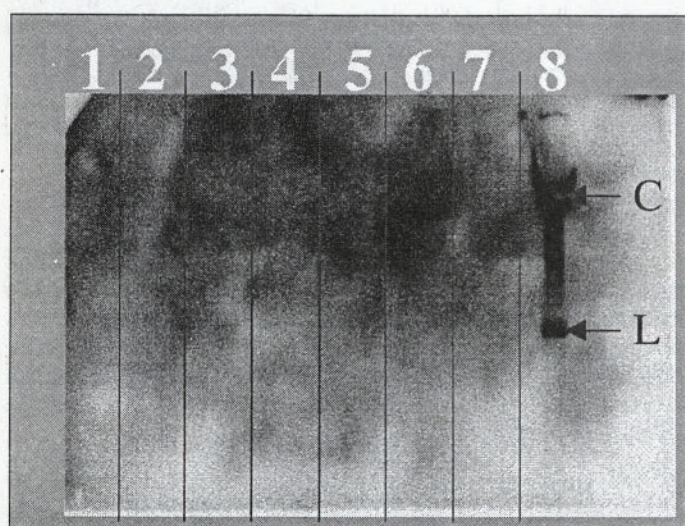


Slika 12: Vzorce hmeljja, ki so kazali simptome, kot bi jih povzročal stunt viroid, so analizirali tudi na Univerzi Hiroshaki na Japonskem. Uporabili so dot-blot metodo, ki jo uporabljajo za serijsko testiranje: vseh 14 vzorcev iz Slovenije je bilo HSVd negativnih. (Orig. Sano, 1998)

Slika 10: Hitra ekstrakcija nukleinskih kislin iz hmeljja, prirejena iz originalne ekstrakcije iz krompirjevih gomoljev po Schroedterju ne daje lepe in jasne slike, daje pa dokaj zanesljivo viden viroidni pas.

hmeljja traja skupno 30 ur (delo 12-15 ur in precipitacija preko noči). To dejstvo govori proti uporabi R-PAGE za rutinsko testiranje hmeljnih vzorcev, saj je kljub temu, da lahko pri elektroforezi analiziramo veliko število vzorcev hkrati, postopek priprave teh vzorcev preveč zamuden. Manj natančno ekstrakcijo in čiščenje zahtevajo metode hibridizacije, pri katerih za vizualizacijo vzorca z viroidom poskrbijo označene sonde (sonda je zaporedje nukleotidov, ki kot ključ prepozna viroidno "ključavnico"), ki med vsemi nukleinskimi kislinami poiščejo značilna zaporedja v viroidnih RNK in vzorec se s pomočjo označevalca obarva (Sliki 11 in 12). Predvsem metoda dot-blot hibridizacije je primerna za rutinsko testiranje hmeljnih vzorcev (Adams, 1995).

4 ZAKLJUČKI



Slika 11: Vzorce hmeljja, ki so kazali simptome, kot bi jih povzročal stunt viroid, so analizirali tudi na Univerzi Hiroshaki na Japonskem. 1, 2, 3 - AURORA - 89; 4, 5 - APOLON - 93, 6, 7 - MAGNUM - 97; 8 - HSVd pozitivno. Uporabili so t.i. Northern blot metodo, kjer po končani elektroforezi prenesejo nukleinske kisline na nylon membrano, značilno zaporedje viroida pa prepozna (DIG) označena sonda, kar izboljša natančnost detekcije. V primerjavi s HSVd pozitivno japonsko kontrolo na naših vzorcih niso zaznali stunt viroida.

Za določanje viroidov v rastlinskem materialu je znanih več metod, vse pa zaradi strukture viroidov temeljijo na identifikaciji in karakterizaciji ribonukleinskih kislin. Različne metode imajo vsaka svoje prednosti in slabosti, njihova uporabnost pa je odvisna od vrste patogena in vrste okuženih rastlin ter namena in obsežnosti dela. Za prve raziskave nekega viroida je smiselno uporabljati PCR tehniko, ki je izredno natančna, a za serijsko testiranje predraga. R-PAGE je sicer na videz enostavna in cenena, vendar zahteva dobro pripravo materiala - dobro ekstrakcijo in veliko časa. Po evropskih izkušnjah je za serijsko testiranje najprimernejša dot-blot metoda hibridizacije, ki je sorazmerno enostavna, ne zahteva čiste ekstrakcije, hkrati pa sonda, ki prepozna določeno zaporedje v viroidni RNK dovolj zanesljivo najde viroidno RNK. Če pri tem uporabljamo neradioaktivne obeleževalce sond (kot je dioksigenin), je uporaba toliko bolj prijazna.

Za analizo na R-PAGE smo uporabljali fenolno ekstrakcijo celokupnih RNK, ki so primerne za metodo dot blot hibridizacije in R-PAGE. Opravili smo tudi dodatno čiščenje z LiCl, ki odstrani visokomolekularne RNA. Predvsem zaradi velike aktivnosti ribonukleaz, ki se sprostijo pri razgradnji celice in ki so vsepovsod v okolici ter lahko kontaminirajo vzorce, je ekstrakcija RNK mnogo težja kot DNK. Skrbeti moramo za čim bolj sterilno, hladno okolje in uporabljati inhibitorje ribonukleaz.

Ugotovili smo, da so za analizo najprimernejši posušeni celi, zreli storžki hmeljja. Listi vsebujejo namreč preveč sekundarnih metabolitov, ki motijo detekcijo viroidne RNK. Teh je v listnih pecljih sicer manj, vendar je vsebnost viroidov v njih nestabilna in manjša kot v listih in storžkih (Solarska, 1997).

Pri povratni elektroforezi na poliakrilamidnem gelu je primerna 7% koncentracija gela z razmerjem akrilamid: bisakrilamid = 30 : 0,75, da še dovolj dobro in hitro ločimo viroidno RNA od rastlinskih. S hmeljevim latentnim viroidom so okuženi pregledani kultivarji: aurora, apolon, savinjski golding in magnum.

Različne elektroforetske metode so ovrgle sum, da je hmelj okužen s HSVd. Pravilno določitev sta potrdili Northern-blot in dot blot metoda hibridizacije, ki so jih opravili na Univerzi Hiroshaki na Japonskem. Pregledani kultivarji, ki so kazali

simptome zakrnele rasti, vendar niso okuženi s HSVd ali z drugimi znanimi subviralnimi povzročitelji: so aurora, apolon in magnum. Vsi ti vzorci pa so bili okuženi s HLVd.

Zastavlja se nam torej vprašanje, ali hmeljev latentni viroid vendarle povzroča tudi vidne simptome, če so hmeljne rastline v stresu?

Viroids in Slovenian hop varieties (*Humulus lupulus* L.)

ABSTRACT

Viroids - the smallest infectious agents which could replicate itself - are capable to cause serious damage in different plants and yield loose. Viroids have very small RNA genomes which are 246 -375 nucleotides in length. Their secondary structure looks like single stranded covalent rod-like shape with intramolecular base pairing. They are too small to be visible by electron microscopy. They do not encode any proteins, so serological tests are not useful, as well. Therefore using molecular methods is the only way to detect viroid in plant. Knowledge of the complete sequence of the viroids genome enables designing different probes and primers used at molecular detecting of viroids. In our research Slovenian hop varieties were examined on the presence of Hop latent viroid (HLVD), which has been detected as widely spread pathogen in European hops. We tested our varieties on the presence of Hop stunt viroid (HSVD) as well, although it had been proven only in Asian hops. HLVD has only 1 sequence and infects only hops. HSVD has 32 variants, causes 18 plant diseases and it has been found in European countries in grapevine, citrus, cucumber, plum, peach, and other Prunus species. HLVD was detected after specific extraction of 2M LiCl soluble nucleic acids from dried or frozen hop leaves or cones by return polyacrylamid gel electrophoresis (R-PAGE). Hop varieties Aurora, Apolon, Savinjski Golding and Magnum were HLVD positive and HSVD negative. Further tests (sequential PAGE, 2D-PAGE, Northern blot and dot-blot with DIG labelled HSVd cRNA probe) on presence of HSVd and other viroid like RNAs of hop samples which showed symptoms of stunting and curling were done at the Hiroshaki University in Japan. HSVd and other viroid-like RNAs were not detected but all samples were HLVD positive. It seems that HLVD can cause symptoms as leaf curling, stunting and yellowing in stress conditions as strict cutting of root-stock in April, draught and high temperatures in spring.

5 LITERATURA

- Adams, A.N., A. Morton, D.J. Barbara, M.S. Ridout (1992). **The distribution and spread of hop latent viroid within two commercial plantings of hop (*Humulus lupulus*).** - *Ann-Appl-Biol.* 121 (1992)3, p. 585-592.
- Adams, A.N., D.J. Barbara, A. Morton, P. Darby, C. P. Green (1995). **The control of hop latent viroid in UK hops.** - *Acta Horticulturae* 385 (1995) p. 91-97.
- Dolinar, M. (1993). **Virusi in viroidi.** - Poročilo o delu, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, s. 18.
- Hanold, D. (1993). **Diagnostic methods applicable to viroids.** - in *Diagnosis of plant virus diseases* (ed. R. E. F. Matthews), CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, (1993), p. 295-314.
- Hataya, T., H. Katsuyuki, N. Suda, T. Nagata, L. Shifang, Y. Itoga, T. Tanikoshi, E. Shikata (1992). **Detection of Hop latent viroid (HLVD) using Reverse Transcription and Polymerase chain Reaction (RT-PCR).** - *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58 (1992), s. 677-684.
- Solarska, E. (1997). **The detection of hop latent viroid in hops by dot-blot hybridisation.** - *Proceedings of the Scientific Commission Interantional Hop growers' Convention of the XLVth International Hop Congress, 29th July - 1st August 1997, Žatec, p. 47-48.*
- Matoušek, J., L. Trnena, P. Svoboda, A. Ružkova (1994). **Analysis of hop latent viroid (HLVD) in commercial hop clones in the Czech Republic.** - *Rostlinna. Vyroba* 40 (1994)10, p. 973-893.
- Puchta, H., K. Ramm, H. L. Saenger (1988). **The molecular structure of hop latent viroid (HLVD), a new viroid occurring worldwide in hops.** - *Nucleic acids Research* 16(1988)10, s. 149-158.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989). **Molecular cloning. - A laboratory manual, second edition, Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989, s. 5.33-5.87, 6.3-6.48, 7.30-7.87**
- Sano, T., E. Shikata (1988). **Hop stunt viroid disease.** - *Proceedings Int. Workshop on Hop Virus Diseases Rauschholzhausen 1988, A. Eppler Edt., Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, (1989), p. 159-164.*
- Schroeder, M., H. L. Weidemann (1989). **Simplified application of return gel electrophoresis for the routine detection of potato spindle tuber viroid.** - *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 19(1989), p. 661-665.
- Schumacher, J., N. Meyer, D. Riesner, H. L. Weidemann (1986). **Diagnostic Procedure for Detection of Viroids and Viruses with Circular RNAs by return-Gel Electrophoresis.** - *J. Phytopathology* 155(1986) p. 332-343.
- Shikata, E. (1985). **Hop stunt viroid and hop viroid disease.** - in *Subiral pathogens of Plants and Animals, viroids and prions, Academic Press, Inc. (1985) p. 101-121.*
- Singh, R. P., M. Singh (1994). **Polyacrylamid Gel Electrophoresis and Mechanism of Viroid Strain Separation.** - *Virology in the Tropics, Malhotra Publishing House, New Delhi (1994) p. 186-198.*
- Wah, Y.F.W.C., R.H. Symons (1997). **A High-Sensitivity RT-PCR Assay for the Diagnosis of Grapevine Viroids in-Field and Tissue-Culture Samples.** - *Journal of Virological Methods* 63(1997)1-2, pp 57-69



Simptomi na hmelju, ki jih povzroča hmeljev stunt viroid: zakrnela rast, odklanjanje vršičkov in krempljasto zvijanje listov (Orig. v Shikata, 1985).

Ugodno prodamo dobro ohranjen obiralni stroj ALLAEYS 2

tel.: 063 702309

Zaradi prenehanja proizvodnje ugodno prodamo:

- trgalnik za hmelj SIP l. 93
- rezalnik za hmelj 2 kom
- 16 m² sušilnica Wolf, komplet z lesami, pečjo, gorilcem in cisternami za 2000 l
- pršilnik Mayers 1500 l
- preša za hmelj 2 kom
- samonakladalka NSP 28 - 24 silažna
- ogrodnik - hmeljski

Vse informacije na telefon 063 / 885-129 ali 0609 / 649516

LETALNA OBLIKA HMELJEVE UV 70/1999 (*Verticillium spp.*)



Tipični simptomi letalne oblike *V. albo-atrum* na primarnih listih: rumenenje, nekroze ob robovih in med žilami. Uvelo listje odpada.

Že v maju okužene rastline slabo odganjajo in kažejo znake odmiranja.



Simptomi so najbolj zaznavni od druge polovice julija dalje. Podobno kot pri blagi obliki se rastline sušijo.



Pri letalni obliki uvelosti rastline prek zime odmro. Okužba se širi vzdolž vrste na sosednje rastline.