

TAKSONOMIJA IN VARIABILNOST FITOPATOGENIH VRST GLIV IZ RODU *VERTICILLIUM*

Sebastjan RADIŠEK¹⁵, Branka Javornik¹⁶

UDC / UDK 561.28:575.2(045)

pregledni znanstveni članek / review scientific article

prispelo / received: 11. 10. 2011

sprejeto / accepted: 01. 12. 2011

Izvleček

Rod *Verticillium* zaradi svoje heterogenosti in ne odkritih teleomorfnih (spolnih) oblik še vedno predstavlja enega od izzivov mikološke taksonomije. V fitopatologiji ta rod povezujemo s fitopatogenimi vrstami talnih gliv, ki povzročajo vaskularna obolenja in uvelosti mnogih kmetijskih rastlin. Proučevanja variabilnosti predstavljajo pomemben segment pri razumevanju izvora, širjenja in mehanizmov nastanka patogenosti ter prilagajanja različnim okoljem. Prispevek tako predstavlja retrospektivo razvoja taksonomske klasifikacije in proučevanja fiziološke specializacije fitopatogenih gliv iz rodu *Verticillium*, ki se vsakoletno nadgrajuje in revidira z razvojem novih znanstveno raziskovalnih pristopov.

Ključne besede: glive, taksonomija, *Verticillium* spp.

TAXONOMY AND VARIABILITY OF PHYTOPATHOGENIC *VERTICILLIUM* SPECIES

Abstract

Because of its heterogeneity and its lack of teleomorph forms, genus *Verticillium* still presents one of the important challenges in fungal taxonomy. In phytopathology, the genus is described as a group of plant pathogenic soil fungi, which are causing vascular diseases and wilting in many cultural plants. Variability studies present an important segment in understanding the origin and spreading of the fungus, as well as the mechanisms that contribute to the development of

¹⁵ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec,
e-pošta: sebastjan.radisek@ihps.si

¹⁶ Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana,
e-pošta: branka.javornik@bf.uni-lj.si

pathogenicity and adaptation to different substrates. The manuscript presents a historical retrospective of *Verticillium* taxonomy and studies of physiological specialisation, which have been upgraded annually to reflect the development of new scientific and research approaches.

Key words: fungi, taxonomy, *Verticillium* spp.

1 UVOD

Rod *Verticillium* povezujemo z obsežno in heterogeno skupino askomicetnih gliv, ki lahko parazitirajo ogorčice, žuželke, rastline in glive. V mednarodni mikološki bazi Index Fungorum tako najdemo več kot 50 različnih vrst in skupno 260 zadetkov, ki opisujejo različne vrste, podvrste, različice in sinonime rodu *Verticillium*. Med vrstami pomembno vlogo zasedajo fitopatogene glive, ki so specializirane parazitiranju prevodnega tkiva rastlin in povzročajo uvelosti ter odmiranje velikega števila rastlinskih vrst predvsem iz skupine dvokaličnic. Do sedaj so okužbe zaznali na več kot 400 rastlinskih vrstah iz 80 rodov, število pa vsakoletno narašča, saj so samo v zadnjem desetletju potrdili več ko 60 novih gostiteljskih rastlin (Peeg in Brady, 2002). Letne ocene gospodarske škode na kmetijskih površinah in v proizvodnji okrasnih rastlin globalno presegajo več milijard dolarjev. Izgube pridelka se v povprečju gibljejo med 10-15 %, v primeru nekaterih rastlin kot so krompir, solata, paprika pa zlahka presegajo 50 %. Veliko škode nastaja pri pridelavi trajnic, kot so oljke, hmelj, okrasno drevje, jagodičevje in nekatere sadne rastline, kjer okužbe vodijo v propadanje nasadov (Klosterman, 2009). Ker gre za glive talnega habitata s sposobnostjo tvorbe trajnih organov (mikrosklerociji in melaniziran trajni micelij), ki več let preživijo v tleh, predstavljajo na okuženih površinah kroničen in ponavljajoč gospodarski problem.

Proučevanja variabilnosti predstavljajo pomemben segment pri razumevanju izvora, širjenja in mehanizmov nastanka patogenosti ter prilagajanja različnim substratom. Prispevek predstavlja retrospektivo razvoja taksonomske klasifikacije in proučevanja fiziološke specializacije fitopatogenih gliv iz rodu *Verticillium*, ki se vsakoletno nadgrajuje z razvojem novih znanstveno raziskovalnih pristopov.

2 TAKSONOMIJA IN NOMENKLATURA

Rod *Verticillium* je prvi opisal leta 1816 nemški mikolog Nees von Esenbeck, ki je zaradi značilnih vretenastih konidioforov ime rodu izpeljal iz latinske besede *verticillius* ali vretence. Kot tipične značilnosti rodu je določil enocelične hialine konidije in vretenaste konidifore z mezotono in akrotono lego fialid. Izolat glive, ki

ga je proučeval, je poimenoval *V. tenerum*. V prvi polovici 19. stoletja se je za morfološko podobne glive prvič pojavilo tudi ime *Acrostalagmus* kot povsem ločen rod (Corda, 1838), kar pa je bilo kasneje s konsenzom določeno, da gre za eno samo skupino gliv pod imenom *Verticillium* (Hoffman, 1854). Kljub temu v literaturi še vedno srečamo ime *Acrostalagmus*, ki predstavlja sinonim rodu *Verticillium*. Nadaljnja taksonomska proučevanja so pokazala, da rod *Verticillium* predstavlja izrazito polifiletično skupino nespolnih gliv, pri katerem so nekatere vrste povezane s skupino zaprtotrošnic Ascomycota, predvsem z družinami Clavicipitae, Hypocreaceae, Nectriaceae in Phyllachoraceae (Gams in Van Zaayen 1982). Ker pri večini vrst ni bilo odkritih teleomorfni oz. spolnih oblik je bil rod na osnovi morfoloških lastnosti taksonomsko uvrščen v ne-filogenetsko urejeno skupino Deuteromycota, nižje v razred Hyphomycetes, red Hyphomycetales in družino Moniliaceae. Izrazita heterogenost vrst rodu *Verticillium* je prispevala še nadaljnji morfološki razdelitvi na 4 sekcije (Gams, 1988; Gams in Van Zaayen, 1982). Za sekcijo *Prostrata* so značilni manj razviti konidiofori in vključuje predvsem saprofitske, nematopatogene in entomopatogene vrste kot so *V. chlamydosporium*, *V. balanoides*, *V. fungicola* in *V. lecanii*. Sekcija *Albo-erecta* je dobila ime po močno razvitih konidoforih, katere tipični predstavnik je vrsta *V. rexianum*. Za sekcijo *Verticillium* je značilna oranžno rjava obarvanost micelija in vključuje samo vrsto *V. tenerum*, ki je bila tudi prva opisana leta 1816. Naslednja sekcija *Nigrescentia* za katero so značilne vrste s temnimi trajnimi organi pa vključuje šest fitopatogenih vrst *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus*, *V. nigrescens*, *V. nubilum* in *V. theobromae* od katerih prvi dve povzročata visoko gospodarsko škodo v kmetijstvu, medtem ko ostale vrste spadajo med manj pomembne patogene, ki le redko povzročijo bolezensko stanje. V tej skupini je zgodovinsko zanimiva taksonomska razprava, ki je obravnavala *V. albo-atrum* in *V. dahliae* in trajala skoraj pol stoletja. Nemška znanstvenika Reinke in Berthold sta leta 1879 prvič opisala glivo *V. albo-atrum*, ki sta jo izolirala iz uvelih rastlin krompirja. Razprava pa se prične z objavo opisa vrste izolirane iz obolelih dalij, ki jo je Klebahn (1913) poimenoval *V. dahliae* in ki se po tvorbi mikrosklerocijev razlikuje od *V. albo-atrum*. Zaradi mnogih skupnih gostiteljskih rastlin, izgube sposobnosti tvorbe trajnih organov in pigmenta v procesu umetnega vzdrževanja so mnogi raziskovalci priznavali samo vrsto *V. albo-atrum*. Tako je nastalo več različnih taksonomskih opisov gliv med katerimi sta dobro znana *V. albo-atrum* var. *dahliae*, *V. albo-atrum* var. *menthae*, za katere je sedaj jasno da spadajo v vrsto *V. dahliae*. Šele obsežnejša raziskava izolatov iz različnih gostiteljskih rastlin, ki jo je leta 1949 objavil Isaac, je na osnovi morfoloških, fizioloških in patoloških značilnosti predstavila jasne dokaze o ločitvi vrst *V. albo-atrum* in *V. dahliae*.

Popolno revizijo taksonomije nespolnih gliv je pred desetletjem omogočil razvoj molekularnih tehnik, kjer je bilo veliko raziskav usmerjenih predvsem v analizo

specifičnih lokusov ali posameznih delov genoma, kot so analize ribosomske DNA (rDNA) in ponovljivih DNA zaporedij. Tako novejša klasifikacija, ki na osnovi molekularnih analiz omogoča združevanje gliv s spolnim ciklom z nespolnimi glivami v enoten sistem, uvršča rod *Verticillium* v družino Plectosphaerellaceae, podrazred Hypocreomycetidae, razred Sordariomycetes, poddeblo Pezizomycotina in deblo Ascomycota (IndexFungorum, 2011).

Prvotna oz. *senzo lato* skupina gliv rodu *Verticillium* pa se je nadalje razdelila na še 4 nove rodove *Pochonia*, *Lecanicillum*, *Haptocillium* in *Simplicillum* (Zare, 2003). Tako prvotno ime *Verticillium* sedaj določajo le še fitopatogene vrste, katerih variabilnost je predstavljena v nadaljevanju prispevka na primeru najbolj proučenih vrst *V. albo-atrum* in *V. dahliae*.

3 FIZIOLOŠKA SPECIALIZACIJA

Pri glivah *V. albo-atrum* in *V. dahliae* ne poznamo fiziološko specializiranih skupin, ki bi bile strogo vezane na samo določene gostiteljske rastline, kot lahko to srečamo npr. pri glivah iz rodu *Fusarium*, kjer imamo več gostiteljsko specializiranih form (*formae specialis*) in naprej fizioloških ras. Izolati gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* se razlikujejo v patogenosti na različnih gostiteljskih rastlinah, vendar so na splošno bolezenska znamenja na primarnih gostiteljih bolj izrazita (Bhat in Subbarao, 1999). Kljub temu pa je znanih nekaj primerov nastanka fiziološke specializacije, npr. pri glivi *V. albo-atrum* izolati iz lucerne ali hmelja in pri *V. dahliae* izolati iz bombaža, mete in paradižnika (Sewell in Wilson, 1984; Schnathorst, 1971). Vzrok za tako nizko stopnjo fiziološke specializacije ostaja še nepojasnen predvsem zaradi kompleksnosti narave interakcije rastlina-parazit, saj je do sedaj odkrit le en specifičen gen za odpornost (*Ve* gen pri paradižniku), medtem ko večina rastlin izraža toleranco (Rowe, 1995).

Na hmelju so v Angliji identificirali štiri različno virulentne patotipe glive *V. albo-atrum*, ki v odvisnosti od kultivarja povzročajo blago ali letalno obliko hmeljeve uvelosti. Po prvem odkritju blage oblike bolezni leta 1924 je na začetku leta 1933 sledil izbruh letalne oblike, ki se je hitro razširil in povzročil visoko gospodarsko škodo. Isaac in Keyworth (1948) sta s patogenimi testi dokazala, da je vzrok različnih oblik obolenja v pojavu dveh patotipov od katerih M (mild) povzroča blago obliko, letalna oblika pa je posledica okužb z virulentnejšem patotipom PV1 (progressive virulent). Sledilo je obsežno sajenje tolerantnih kultivarjev, na katerih so se v začetku sedemdesetih let prejšnjega stoletja pričeli novi izbruhi hmeljeve uvelosti. Sewell in Wilson (1984) sta s patogenimi testi na različnih kultivarjih hmelja ponovno ovrednotila populacijo hmeljnih izolatov *V. albo-atrum* in pri tem identificirala še dva nova patotipa PV2 in PV3, od katerih slednji lahko povzročijo

obolenje tudi na visoko tolerantnem kultivarju Wye Target. Letalna oblika hmeljeve uvelosti in pojav virulentnih patotipov glive *V. albo-atrum* so do nedavnega bili opisani samo v Angliji, leta 1997 pa je prišlo do izbruha letalne oblike tudi v Sloveniji. Na osnovi bolezenskih znamenj, odkritja primarnega žarišča in rezultatov patogenih testov ter molekularnih analiz je bil kot povzročitelj letalne oblike potrjen nov virulentnejši patotip glive *V. albo-atrum* (Radišek in sod., 2003). O pojavu zelo virulentnih izolatov *V. albo-atrum* od leta 2005 poročajo tudi iz Nemčije, kjer je letalna oblika bolezni močno prizadela hmeljišča na območju regije Hallertau na Bavarskem (Seefelder in sod., 2009).

Visoko stopnjo fiziološke specializacije izražajo izolati *V. albo-atrum*, ki so bili prvič opisani leta 1918 na Švedskem in povzročajo uvelost lucerne (Hedlund, 1923). Bolezen se je s semenom hitro razširila najprej v Nemčijo, leta 1953 o njej poročajo v Veliki Britaniji, 1962 v nekdanjih republikah Sovjetske zveze, 1964 v Kanadi, 1976 v ZDA in tako je v 58 letih okužila večino svetovnih pridelovalnih območij lucerne (Pegg, 1984). Raziskave s patogenimi testi so pokazale, da so izolati iz lucerne patogeni samo lucerni in v večini primerov ne povzročajo bolezenskih znamenj na ostalih gostiteljskih rastlinah glive *V. albo-atrum* in obratno, izolati iz ostalih gostiteljskih rastlin ne povzročajo uvelosti lucerne (Heale, 1985). Prav tako je pomembno dejstvo, da kljub veliki razširjenosti do sedaj med izolati iz lucerne še ni bilo odkrite variabilnosti, kar nakazuje, da gre za genetsko homogeno klonsko populacijo s skupnim izvorom (Correll in sod., 1988; Busch in Smith, 1982).

V primerjavi z glivo *V. albo-atrum* najdemo pri *V. dahliae* več fiziološko specializiranih skupin izolatov od katerih je zelo razširjena skupina, ki parazitira bombaž. Schnathors (1971) je v populaciji izolatov iz ZDA identificiral dva različno virulentna patotipa P1 in P2, ki podobno kot patotipi *V. albo-atrum* na hmelju povzročata blago in letalno obliko obolenja. Virulentnejši P1 se je s semenom hitro razširil in je sedaj prisoten v Španiji, Mehiki, Kitajski in Peruju (Pegg in Brady, 2002). Kljub visoki specializiranosti izolatov na bombaž je znana navzkrižna patogenost na oljko, kjer omenjena patotipa inducirata podobna bolezenska znamenja (Schnathors in Sibbett, 1971). Tako je v Španiji, kjer se prekrivata območja gojenja bombaža in oljk, virulentnejši patotip povzročil visoko ekonomsko škodo na obeh gostiteljskih (Perez-Artes in sod., 2000).

Vpliv monokultur na fiziološko specializacijo je opazen tudi pri izolatih *V. dahliae* iz mete, ki se je v ZDA na začetku prejšnjega stoletja veliko let pridelovala na istih površinah. Izolati iz mete povzročajo bolezenska znamenja samo rastlinam iz rodu *Mentha* in so v 40 letih od prvega izbruha leta 1926 skoraj popolnoma uničili proizvodnjo poprove in zelene mete v nekaterih ameriških državah kot je Michigan (Pegg in Brady, 2002). Nelson (1950) navaja, da izolati iz ostalih gostiteljskih

rastlin niso patogeni rastlinam iz rodu *Mentha*, kar je po specializaciji primerljivo z izolati *V. albo-atrum* iz lucerne.

Pomembno fiziološko specializirano skupino predstavljajo izolati *V. dahliae*, ki parazitirajo večino rastlin iz družine križnic (Brassicaceae). Stark (1961) je prvi identificiral to skupino v obolelem hrenu in jo zaradi značilno večjih konidijev poimenoval *V. dahliae* var. *longisporium*. Raziskave so pokazale, da je vsebnost DNA v konidijih teh izolatov 1.75 krat večja kot pri ostalih izolatih *V. dahliae*, zato te izolate opisujemo kot amfihaploide (Collins in sod., 2003). Ta skupina izolatov je sedaj v Evropi zelo razširjena na oljni repici, v ZDA na cvetači in hrenu ter na Japonskem na različnih križnicah. Na osnovi morfoloških lastnosti, patogenih testov in molekularnih analiz so Karapapa in sod. (1997) predlagali to skupino kot novo vrsto *V. longisporium*, vendar odkritje nekaterih drugih različic kaže, da ti izolati verjetno predstavljajo medvrstne hibride in ne povsem nove vrste (Collins in sod., 2003). Dokončna potrditev še vedno ostaja predmet nadaljnjih raziskav. Kljub prilagoditvi te skupine pa je znano, da križnice lahko parazitirajo tudi drugi haploidni izolati te vrste.

Edini znani specifičen odnos med gostiteljsko rastlino in parazitom pri fitopatogenih vrstah *Verticillium* spp. velja med izolati rase 1 *V. dahliae* in *Ve* genom, ki je bil odkrit v divji vrsti paradižnika *Lycopersicon pimpinellifolium* iz Peruja in sedaj predstavlja vir odpornosti v večini komercialnih kultivarjev paradižnika (Pegg in Brady, 2002). Izolati rase 1 so fiziološko specializirani na družino razhudnikov in lahko poleg paradižnika prizadenejo tudi papriko, krompir in jajčevce. Deset let po pridelovanju odpornih kultivarjev se je pojavila rasa 2, ki presega odpornost *Ve* gena in se sedaj pojavlja na večini večjih pridelovalnih območij Francije, Italije, Grčije in ZDA. Dokazano je, da so izolati uvrščeni v raso 2 genetsko različni, kar nakazuje, da imajo več izvorov nastanka (Dobinson in sod., 1998).

Zadnji dve različno virulentni rasi glive *V. dahliae* sta opisani na solati v Kaliforniji, kjer od leta 1995 prihaja zaradi pojava rase 2 do množične izgube pridelka in velike gospodarske škode. Genetsko variabilnost obeh ras (1 in 2) so potrdili na osnovi primerjav ITS sekvenc ribosomalnih genov in patogenih testov na različnih sortah solat (Qin in sod., 2006). Podobno kot pri paradižniku so v solati potrdili vir odpornosti na raso 1, medtem ko vir odpornosti na raso 2 še ni znan in se intenzivno išče v genskih virih.

4 MOLEKULARNA VARIABILNOST

Angleška raziskovalca Carder in Barbara (1991) sta med prvimi uporabila molekularne tehnike pri določanju genetske variabilnosti med različnimi izolati vrst *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus*, *V. nubilum*, *V. nigrescens* in *V. lecanii*. Glavno odkritje te raziskave predstavljajo rezultati RFLP analize z genomskimi sondami, s katerimi sta pri vrsti *V. albo-atrum* ugotovila razlike med izolati iz lucerne (skupina L) in izolati iz ostalih gostiteljskih rastlin (skupina NL), kar je potrjevalo predhodne analize o fiziološki specializaciji izolatov iz lucerne (Heale, 1985). Genomske sonde so prav tako jasno določile razlike med vsemi proučevanimi vrstami. Barbara in njegova skupina so nadaljevali raziskavo z RFLP metodo v smeri določanja genetskih razlik med izolati glive *V. dahliae*. Pri tem so v analizo vključili širok spekter izolatov, ki je vključeval tudi fiziološko specializirane izolate iz mete in amfihaploidne izolate *V. dahliae* var. *longisporium*, ki večinoma parazitirajo križnice. Rezultati analize so potrdili specifičnost izolatov iz mete (skupina M) in amfihaploidni izolatov (skupina D). Ostali izolati *V. dahliae* so se razvrstili v dve osnovni skupini A in B ter v vmesno skupino I (intermediate), ki pa se za razliko od skupin M niso D ujemale s patogenostjo izolatov, njihovim geografskim izvorom in ostalimi lastnostmi (Okoli in sod., 1993; 1994).

Pri določanju genetske variabilnosti je bilo veliko analiz usmerjenih k proučevanju nekodogenih variabilnih regij med rDNA geni. Tako so Nazar in sod. (1991) z določitvijo nukleotidnega zaporedja ITS regij med izolatom *V. albo-atrum* iz lucerne in izolatom *V. dahliae* iz sončnic odkrili nehomologijo v ITS 1 in ITS 2 regijah. Na osnovi razlik so nato razvili specifični hibridizacijski sonde in PCR začetne oligonukleotide, ki se uporabljajo v diagnostiki obeh vrst. Ista skupina raziskovalcev je uporabila specifične začetne oligonukleotide pri testiranju kanadskih izolatov gliv *V. albo-atrum*, *V. dahliae* in *V. tricorpus* iz krompirja. Pri tem so odkrili izolat *V. albo-atrum*, ki ni dal pozitivnega signala po PCR reakciji. Omenjenemu izolatu so določili nukleotidno zaporedje ITS regij in ugotovili razliko v 17 baznih parih v primerjavi z ostalimi izolati *V. albo-atrum*. Na osnovi teh razlik so nato razvili specifične začetne oligonukleotide in testirali še izolate *V. albo-atrum* iz Anglije in Nizozemske. Tudi med temi izolati so našli dve skupini izolatov *V. albo-atrum* iz krompirja, kar je dokazovalo odkritje nove podskupine te glive, ki se sedaj pojavlja pod oznako Grp2¹⁷, medtem ko skupino Grp1 predstavljajo izolati ostalih gostiteljskih rastlin (Robb in sod., 1993).

Obsežnejšo raziskavo Grp2 skupine sta opravila Mahuku in Platt (2002), ki sta z RAPD metodo in razrezom IGS regije (IGS-RFLP) analizirala 21 izolatov *V.*

¹⁷ Grp: kratica angleške besede group (skupina)

tricornis in 64 različnih izolatov *V. albo-atrum*, od katerih jih je 21 predstavljalo skupino Grp2. RAPD analiza je jasno določila razlike med vsemi tremi skupinami izolatov in določitvijo 34 % povprečnega koeficienta sorodnosti med Grp2 in *V. tricornis* ter 35 % med Grp2 in ostalimi izolati *V. albo-atrum* (Grp1). Variabilnost je izrazila tudi analiza IGS regije, ki je prav tako jasno določila razlike med omenjenimi skupinami. Raziskovalca na osnovi rezultatov navajata na možnost potrditve Grp2 skupine kot nove vrste rodu *Verticillium*, ki je najverjetneje nastala z hibridizacijo izolata *V. albo-atrum* iz skupine Grp1 in *V. tricornis*.

Skoraj istočasno so Collins in sod. (2003) objavili podobno raziskavo, kjer so z AFLP metodo in analizo ITS regij proučevali izolate *V. dahliae*, ki parazitirajo križnice. Rezultati so določili dve podskupini izolatov *V. dahliae* var. *longisporium*, od katerih jih večina predstavlja skupino imenovano α , ostali izolati pa skupino β . Določeni skupini nimata povezave s patogenostjo ali geografskim izvorom. Molekularna analiza je prav tako ločila haploidne izolate *V. dahliae* iz križnic od izolatov ostalih gostiteljskih rastlin, kar skupaj kaže na tri skupine izolatov, ki so prilagojeni parazitiranju križnic. Avtorji navajajo, da zaradi visoke variabilnosti skupin α in β izolatov *V. dahliae* var. *longisporium* predlagano ime za vse izolate *V. longisporium* ni primerno.

Molekularni markerji so se izkazali tudi pri določanju razlik med različno virulentnimi izolati, ki so največkrat produkt vpliva monokulturnega gojenja poljščin. Tako so španski raziskovalci z RAPD metodo ugotovili razlike med bolj (*D*) in manj (*ND*) virulentnima patotipoma glive *V. dahliae*, ki parazitirata bombaž in oljke. Identificiranim specifičnim markerjem so določili nukleotidno zaporedje na osnovi katerega so razvili za vsak patotip specifične začetne oligonukleotide (SCAR), s katerimi so nato analizirali več izolatov iz različnih geografskih območij. Analiza s SCAR markerji je identificirala virulentne izolate iz Kalifornije in Kitajske, kar potrjuje hipotezo, da je bil patotip *D* v Španijo prenesen najverjetneje iz ene od teh dveh držav (Perez-Artes in sod., 2000).

Z dosedanjimi raziskavami so raziskovalci določili razlike med fitopatogenimi vrstami gliv iz rodu *Verticillium* in razlike med nekaterimi izolati iz različnih gostiteljev. Na osnovi opisanih raziskav z molekularnimi metodami se tako pri *V. albo-atrum* priznavata dve osnovni skupini:

- Grp1, ki vključuje podskupino L (izolati iz lucerne) in NL (izolate ostalih gostiteljskih rastlin, kamor uvrščamo tudi izolate iz hmelja) in
- Grp2, ki predstavlja posebno skupino izolatov iz krompirja.

Izolati glive *V. dahliae* kažejo višji nivo variabilnosti, ki pa razen anfigaploidnih izolatov *V. dahliae* var. *longisporium* in haploidnih izolatov iz mete, bombaža, paradižnika in solate ne kažejo jasnih fizioloških skupin oz. prilagoditve na določeno skupino gostiteljskih rastlin.

5 GENOM IN GENETSKI MEHANIZMI NASTANKA VARIABILNOSTI

5.1 Genom

Večina izolatov *Verticillium* spp. je haploidna, kljub temu pa so v naravi in v laboratorijskih kulturah pogosti tudi homozigotni diploidni konidiji, ki so genetsko nestabilni in so posledica napak pri deljenju celic. Typas in Heale (1980) sta ugotovila, da je v naravi pogostnost nastanka homozigotnih diploidnih konidijev 10^{-3} do 10^{-4} , ki pa se z višanjem temperature povečuje. Vsebnost DNA v nekalečem haploidnem konidiju glive *V. albo-atrum* znaša od 0,025 – 0,030 pg, kar ustreza približno $2,8 \times 10^7$ baznih parov (Typas in Heale, 1980). Colins in sod., (2003) so s pomočjo pulzne elektroforeze oz. kariotipizacije potrdili 7 kromosomov pri *V. albo-atrum* in določili velikost genoma med 28-30 Mb, v primeru *V. dahliae* pa le 6 kromosomov z oceno velikosti genoma 28-29 Mb. Podobno kariotipizacijo na *V. dahliae* so opravili tudi Pantou in Typas, (2005), vendar so zraven vključili tudi gensko mapiranje s katerim so potrdili 7 kromosomov velikosti 6.7, 5.6, 4.4, 3.4, 3.1, 3.1 in 2.4 Mb (milijon baznih parov). Zadnji podatki, ki jih navaja Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, ZDA o velikosti genoma in so pridobljeni na osnovi sekvenciranja znašajo 32 Mb pri *V. albo-atrum* in 33 Mb pri *V. dahliae*.

Typas in Heale (1980) sta proučevala tudi celični cikel ter v raziskavo zajela populacijo več kot 500 konidijev, hif in trajnih organov izolatov *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. Pri tem so konidiji po 6-10 urah inkubacije pri sobni temperaturi prišli v fazo S (DNA podvojevanje) in po 30-90 minutah preko faze G2 do celične delitve (faza M). Pred naslednjim ciklom je faza G1 (faza med delitvijo in ponovnem začetku podvojevanja DNA) trajala približno 3 ure. V raziskavi sta potrdila haploidnost in enojedrnost celic hif in trajnih organov, ki pa so v primerjavi s konidiji le redke pričele s fazo S.

5.2 Genetski mehanizmi nastanka variabilnosti

Pri fitopatogenih glivah iz rodu *Verticillium* spolni stadij še ni bil odkrit, zato lahko kot o viru variabilnosti govorimo samo o mutacijah in genetskih rekombinacijah (Heale, 2000). Obseg s katerim mutacije vplivajo na variabilnost v populaciji je določen z dedovanjem deležem mutacij, stopnjo ploidnosti, obsegom populacije in

lastnostim mutant. Mutacije lahko zajemajo delecije, insercije, inverzije, translokacije ali v širšem smislu tudi večje spremembe med kromosomi, kot je nastanek aneuploidije (Burtdon in Silk, 1997). Večino mutacij je recesivnih, ki pa se pri haploidnih organizmih kot so bakterije in nekatere glive lahko takoj izrazijo, pri diploidnih organizmih pa šele v homozigotnem stanju (Agrios, 1997).

Na začetku druge polovice prejšnjega stoletja je bila pri proučevanju rodu *Verticillium* v razmahu predvsem biokemična genetika in proučevanje mutantov. Zaradi redkih spontano nastalih genetskih markerjev, ki so bili tudi fenotipsko določljivi, so raziskovalci izvajali inducirane mutacije predvsem z uporabo ultravijoličnih (UV) žarkov in nekaterih visoko mutagenih snovi, kot sta etidijev bromid (EtBr) in barvilo akriflavin (Hastie in Heale, 1984). Odnos med UV obsevanjem in mortaliteto konidijev ter visoka stopnja mutacij pri *V. albo-atrum* in *V. dahliae* je potrdila haploidnost genoma pri večini izolatov, medtem ko so pri diploidnih izolatih *V. dahliae* var. *longisporium* opazili nižji nivo nastanka mutacij (Typas in Heale, 1976). Poleg omenjenega so obsevanja z UV žarki pri *V. albo-atrum* in *V. dahliae* dokazala obstoj še neraziskanega popravljalnega mehanizma, ki se inducira na svetlobi (Puhala, 1976). Kljub relativni preprostosti genoma, raziskave velikega števila izolatov iz rodu *Verticillium* in njihovih biokemičnih ter morfoloških mutantov kažejo genetsko visok nivo stabilnosti (Puhala, 1971).

Raziskave mehanizmov patogenosti in virulence *V. albo-atrum* in *V. dahliae* so vključevale predvsem mutante z motenim izločanjem glikopeptidov in hidrolitičnih encimov, ki so vključeni v proces patogeneze. Na splošno rezultati niso pokazali pozitivne korelacije med mutanti in patogenostjo, kot glavni razlog pa se največkrat navajajo tehnični problemi v smislu pridobitve mutantov z nično aktivnostjo, vplivom večjega števila encimov na patogenezo in encimske regulacije, ki se razlikuje v *in vitro* pogojih od tistih v *in vivo* (Heale, 1988).

Pomemben mehanizem nastanka novih patotipov in variabilnosti anamorfnih gliv imenujemo paraseksualni cikel, ki je bil prvič opisan leta 1953 pri glivi *Aspergillus nidulans* (Pontecorvo in sod., 1953), nekaj let kasneje pa tudi na hmeljnih izolatih *V. albo-atrum* (Hastie, 1964). Paraseksualni cikel je proces, ki je odvisen od nastanka anastomoze ali združitve dveh somatsko kompatibilnih hif z različnim komplementarnim genotipom. Anastomoza omogoča migracijo jeder in nastanek heterokariotskih celic v katerih prihaja do združitve jeder in posledično nastanka heterozigotnega diploidnega jedra. Mitotične delitve takšnih jeder lahko potekajo normalno in producirajo identične hčerinske celice ali pa prihaja do nepravilnosti in posledično genetskih rekombinacij. Sledi proces haploidizacije, kjer diploidna jedra z naslednjimi delitvami izgubljajo kromosome in se pri *Verticillium* spp. po približno 4 tednih inkubacije vrnejo v haploidno obliko (Heale, 1988). Pogostnost nastanka paraseksualnega cikla ni znana, znano pa je, da je pogostnost nastanka

diploidov iz haploidov (približno 10^{-6} na jedrno delitev) veliko manjša od pogostnosti nastanka haploidov iz diploidov (približno 10^{-2} na jedrno delitev) (Hastie in Heale, 1984). V naravi verjetno mesto nastanka hifnih anastomoz in paraseksualnega cikla predstavlja mikrookolje površine koreninskega sistema gostiteljskih rastlin, proces pa je mogoč in tudi dokazan znotraj nekaterih koloniziranih tolerantnih plevelnih vrst (Clarkson in Heale, 1985; Heale, 2000).

McGeary in Hastie (1982) sta s pomočjo paraseksualnega cikla proučevala genetske mehanizme nastanka patogenosti. Pri tem sta hibridizirala izolate *V. albo-atrum* iz paradižnika, ki so nepatogeni lucerni in patogene izolate iz lucerne. Dobljeni rekombinanti so lahko povzročali obolenja tako na paradižniku kot na lucerni, kar navaja k zaključku, da je patogenost najverjetneje kontrolirana z več geni. Poleg hibridizacij med izolati iste vrste je bilo več raziskav uspešnih pri hibridizaciji izolatov vrst *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, kjer so opazili počasnejšo haploidizacijo in nižjo stopnjo genetskih rekombinacij, kar je posledica nehomologije med genomoma (Fordyce in Green, 1964).

Med izolati prihaja tudi do inkompatibilnosti oz. nezmožnosti tvorbe anastomoze in heterokariotskih celic. Testiranja inkompatibilnosti omogočajo ugotavljanje genetskih razlik med izolati ter določanja vegetativno kompatibilnih skupin (VCG), ki si potencialno lahko delijo skupni bazen genov. Tako so pri *V. albo-atrum* na osnovi testiranja velikega števila izolatov iz različnih gostiteljskih rastlin določili dve VCG skupini od katerih prva predstavlja izolate iz lucerne, v drugi pa so izolati iz ostalih gostiteljskih rastlin vključno s hmeljem (Correll in sod., 1988; Rowe, 1995). Proučevanja različno virulentnih hmeljnih izolatov *V. albo-atrum* so pokazala kompatibilnost med vsemi izolati, kljub temu pa je bila opažena večja stopnja kompatibilnosti znotraj posamezne skupine izolatov (Clarkson in Heale, 1985).

Med izolati *V. dahliae* so določene štiri VCG skupine v katerih ni odkritih strogih povezav s patogenostjo ali geografsko lokacijo, kljub temu pa je znano, da skupina VCG4 večinoma predstavlja izolate iz krompirja in VCG1 iz bombaža (Rowe, 1995). Pomembno je omeniti tudi vpliv različnih tehnik in pogojev testiranja na mehanizme kompatibilnosti, kar se pri pregledu zgodnejše literature tovrstnih analiz opazi v obliki nasprotujočih se dejstev. Zaradi tega se za določanje VCG skupin in testiranje izolatov sedaj večinoma uporabljajo tehnike z *nit* (nitratnimi) mutanti, ki kljub mutiranju nimajo posebnega vpliva na kompatibilnost, ob hkratnem testiranju mednarodno referenčnih testnih izolatov (Katan, 2001).

V redkih primerih so obsežna testiranja odkrila tudi izolate, ki so kompatibilni med izolati različnih VCG skupin, kar jim omogoča dostop do širokega vira genov in na nek način biološko predstavljajo mostove med inkompatibilnimi skupinami (Katan,

2001). Obseg izmenjave genov med izolati je torej odvisen od paraseksualnega cikla in mehanizmov inkompatibilnosti, ki pa lahko ob določenih pogojih odpovejo ali celo mutirajo, kar omogoči izmenjavo genov med sicer inkompatibilnimi skupinami ali celo vrstami. Hipotetični dokaz za to predstavlja diploid *V. dahliae* var. *longisporum*, za katerega se domneva, da je nastal najverjetneje s hibridizacijo dveh izolatov *V. albo-atrum* in *V. dahliae* (Heale, 2000; Karapa in sod., 1997).

6 ZAKLJUČEK

Rod *Verticillium* zaradi svoje heterogenosti še vedno predstavlja enega od izzivov mikološke taksonomije, kjer nove molekularno analitične tehnike omogočajo revizije dosedanjih taksonomskih ureditev. Podobne izzive predstavlja tudi na področju fitopatologije, saj verticilijske uvelosti globalno na letni ravni povzročijo za več milijard dolarjev škode in se po pomembnosti uvrščajo takoj za škodami, ki jih povzročajo plesnivke, pepelaste plesni in povzročitelji pegavosti. Proučevanja variabilnosti fitopatogenih vrst in raziskave interakcij z rastlinami vsakoletno prispevajo nova znanja, ki so pomembna za razvoj strategij preprečevanja tako na nacionalni kot globalni ravni. Velik deficit in neraziskanost še vedno predstavlja razjasnitev molekularnih osnov delovanja patogenosti in virulence. Prav tako še vedno niso v celoti pojasnjeni mehanizmi nastanka novih vrst, hibridov, ras in patotipov, ter njihova globalna migracija. Raziskati je potrebno interakcije med geni, ki so nosilci odpornosti in determinantami posameznih patotipov in ras. Vsa ta vprašanja, ki se zastavljajo raziskovalcem že več desetletij se bodo v prihodnjem desetletju zaradi razvoja molekularnih in ostalih biotehnoških tehnik najverjetneje razjasnila in postavila nove temelje v raziskavah gliv iz rodu *Verticillium* in ostalih talnih patogenov.

7 VIRI

- Agrios G. N. *Plant Pathology*. 4th edi. San Diego, Academic press. 1997;635.
- Barbara D.J., Clewes E. Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular Plant Pathology*. 2003; (4):297-305.
- Bhat R.G., Subbarao K.V. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*. 1999; (89): 1218-1225.
- Burton J.J., Silk S. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology*. 1997; (87):664-669.
- Busch L.V., Smith E.A. Reaction of a number of cultivated plants and weed species to an alfalfa isolate of *Verticillium albo-atrum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1982; (4):266-268.

- Carder J.H., Barbara D.J. Molecular variation and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) within and between six species of *Verticillium*. *Mycological Research*. 1991; (8):935-942.
- Clarkson J.M., Heale J.B. Heterokaryon compatibility and genetic recombination within a host plant between hop wilt isolates of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Pathology*. 1985; (34):129-138.
- Collins A., Okoli C.A.N., Morton A., Parry D., Edwards S.G., Barbara D.J. Isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic to crucifers are of at least three distinct molecular types. *Phytopathology*. 2003; (93):364-376.
- Corda A. *Icones fungorum* 2. Prague. Calve J.G.: 1838:15.
- Correll J.C., Gordon T.R., McCain A.H. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*. 1988; (78):1017-1021.
- Dobinson K. F., Patterson N. A., White G. J. DNA fingerprinting and vegetative compatibility analysis indicate multiple origins for *Verticillium dahliae* race 2 tomato isolates from Ontario. *Canada-Mycological Research*. 1998; (102):1089-1095.
- Fordyce C., Green R.J. Mechanisms of variation in *Verticillium albo-atrum*. *Phytopatholog.* 1964; (54):795-798.
- Gams W., A contribution to the knowkege of nematophagous species of *Verticillium*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1988; (94):123-148.
- Gams W., Van Zaayen A. Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species I. Taxonomy. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1982; (88):57-58.
- Hastie A.C., Heale J. B. Genetics of *Verticillium*. *Phytopathologia Mediterranea*. 1984; (23):130-162.
- Hastie A.C. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. *Genetic Research*. 1964; (5):305-315.
- Heale J. B. Diversification and Speciation in *Verticillium*-an Overview. V: *Advances in Verticillium, research and disease management*. Tjamos E. C., Rowe R. C., Heale J. B., Fravel D. R., (eds.). St. Paul, Minnesota, APS Press. 2000:1-14.
- Heale J. B., *Verticillium* spp., The cause of vascular wilts in many species. *Advances in Plant Pathology*. 1988:291-312.
- Heale J.B., *Verticillium* wilt of alfalfa, background and current research. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1985; (7):191-198.
- Hedlund T. Om några ssjukdomar och skador på våra lantbruksväxter, 1922. *Allmän Jordbrukstidskrift*. 1922, (5):166-168.
- Hoffman H. Spermarien beir einem Fadenpilze. *Botanische Zeitung*. 1854, (12):249-254.
- IndexFungorum, The CABI Bioscience and CBS database of fungal names. <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=199278>. (4.11.2011).
- Isaac I., A comparative study of pathogenic isolates of *Verticillium*. *Transactions of the British Mycological Society*. 1949; (32):137-157.
- Isaac I., Keyworth G.W. *Verticillium* wilt of the hop (*Humulus lupulus*) III. A study of the pathogenicity of the isolates from fluctuating and from progressive outbreaks. *Annals of Applied Biology*. 1948; (35):243-249.

- Karapapa V.K., Bainbridge B.W., Heale J.B. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research*. 1997; (101):1281-1294.
- Katan T. Vegetative compatibility in populations of *Verticillium*-an overview. V: *Advances in Verticillium, research and disease management*. Tjamos E. C., Rowe R. C., Heale J. B., Fravel D. R. (ur.). St. Paul, Minnesota, APS Press. 2001:69-86.
- Klosterman S.J., Atallah Z.K., Vallad G.E., Subbarao K.V., Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* species. *Annual Review of Phytopathology*. 2009; (47):39-62.
- Mahuku G.S., Platt H.W., Molecular evidence that *Verticillium albo-atrum* Grp2 isolates are distinct from *V. albo-atrum* Grp1 and *V. tricorpus*. *Molecular Plant Pathology*. 2002; (3):71-79.
- McGeary F. M., Hastie A.C. Hybridisation of *Verticillium albo-atrum* strains from tomato and lucerne. *Physiological Plant Pathology*. 1982; (21):437-444.
- Nazar R.N., Hu. X., Schmidt J., Culham D., Robb J. Potential use of PCR-amplified detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 1991; (39):1-11.
- Nelson R. *Verticillium* wilt of peppermint. *Michigan Agricultural Station Technical Bulletin*. 1950; (221):1-260.
- Okoli C.A.N., Carder J.H., Barbara D.J. Molecular variation and sub-specific groupings within *V. dahliae*. *Mycological Research*. 1993 (97):233-239.
- Okoli C.A.N., Carder J.H., Barbara D.J. Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and the relationships of some host adapted isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology*. 1994; (43):33-40.
- Pantou P.M., Typas M.A. Electrophoretic karyotype and gene mapping of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiological Letters*. 2005; 245(2):213-220.
- Pegg G.F. The impact of *Verticillium* diseases in agriculture. *Phytopathologia Mediterranea*. 1984; (23):176-192.
- Pegg, G.F., Brady B.L. *Verticillium* Wilts. Wallingford, *CABI Publishing*. 2002: 552.
- Perez-Artes E., Garcia-Pedrajas M.D., Bejarano-Alcazar J., Jimenez-Diaz R.M. Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *European Journal of Plant Pathology*. 2000; (106):507-517.
- Pontecorvo G., Roper J.A., Forbes E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*. 1953; (8):198-210.
- Puhalla J.E. Genetics of the fungus. V: *Verticillium* wilt of cotton. Ranney C.D. (eds.). Proceedings of a Work Conference, Texas, National Cotton Pathology Research Laboratory College Station. 1971:39-42.
- Puhalla J.E., Glycerol as a selective agent for auxotrophs of *Verticillium dahliae*. *Journal of General Microbiology*. 1976; (94):409-412.
- Qin Q.M., Vallad G.E., Ming Wu.B., Subbarao K.V. Phylogenetic analyses of phytopathogenic isolates of *Verticillium* spp. *Phytopathology* 2006; (96):582-592.
- Radišek, S., Jakše J., Simončič A., Javornik B. Characterization of *Verticillium albo-atrum* Field Isolates Using Pathogenicity Data and AFLP Analysis. *Plant Disease*. 2003; (87):633-638.

- Robb J., Moukhamedov R., Hu, X., Platt H., Nazar R.N. Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1993; (43):423-436.
- Rowe R.C. Recent progress in understanding relationships between *Verticillium* species and subspecific groups. *Phytoparasitica*. 1995; (23):31-38.
- Schnathorst W.C. Some biological aspects of *Verticillium albo-atrum*: Cotton Disease Research in the San Joachin Valley, California. Research Report 1968-1969. *Division of Agricultural Science*, University of California. 1971:37-41.
- Schnathorst W.C., Sibbett G.S. The relation of strains of *Verticillium albo-atrum* to severity of *Verticillium* wilt in *Gossypium hirsutum* and *Olea europaea* in California. *Plant Disease Reporter*. 1971; (55):780-782.
- Seefelder S., Seigner E., Niedermeier E., Radišek S., Javornik B. Genotyping of verticillium pathotypes in the hallertau. V: SEIGNER, Elisabeth (ur.). *Proceedings of the Scientific Commission IHGC*, León, Spain, 21-25 June 2009:67-69.
- Sewell G.W.F., Wilson J. F. The nature and distribution of *Verticillium albo-atrum* strains highly pathogenic to the hop. *Plant Pathology*. 1984; (33):39-51.
- Stark C. Das Auftreten der *Verticillium*-Tracheomykosen in Hamburger Gartenbau-kulturen. *Gartenbauwissenschaft*. 1961; (26):493-528.
- Typas M.A., Heale J.B. DNA content of germinating spores, individual hypha cells and resting structure cells of *Verticillium* spp. Measured by microdensitometry. *Journal of General Microbiology*. 1980; (121):231-242.
- Typas M.A., Heale J.B. Heterokaryosis and role of cytoplasmic inheritance in dark resting structure formation by *Verticillium* spp. *Molecular and General Genetic*. 1976; (146):17-26.
- Zare R. A. Revision of plant associated *Verticillium* species. *Rostaniha*. 2003; (4):29-54.