

Proučevanja fitopatogenih vrst gliv iz rodu *Verticillium*

Sebastjan Radišek, Branka Javornik

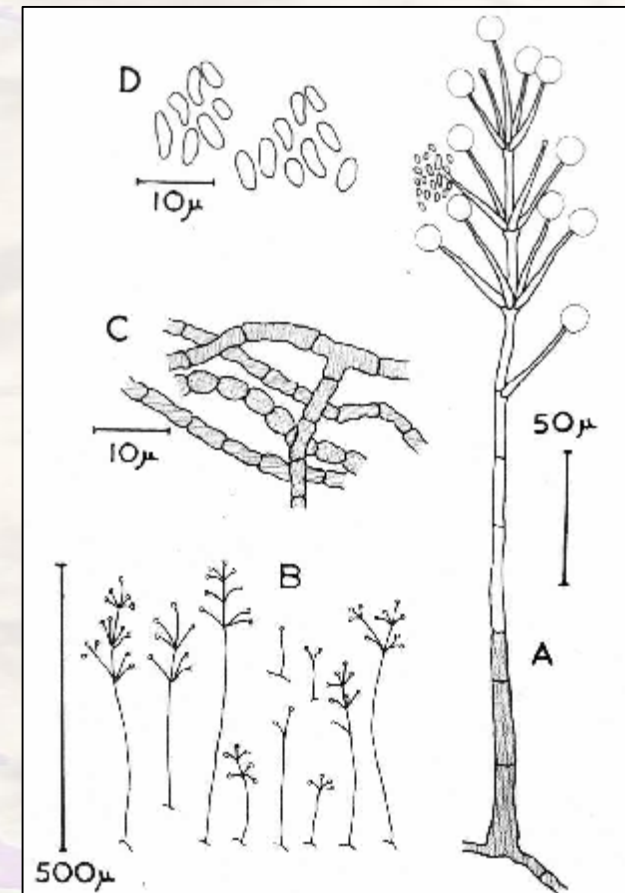
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Katedra za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin,
Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo,

**Društvo za varstvo rastlin
Ljubljana, 11.december 2009**

Verticillium Nees 1817

- Prvi opis leta 1817 Nees von Esenbeck
- Značilni vretenasto razvejani konidiofori s fialidami
- Lat. *verticillus* = sl. vretence
- Rod zajema več kot 50 vrst
(talni organizmi, ki parazitirajo žuželke, nematode, glive, rastline, talni saprofiti)



Taksonomija - *Verticillium*

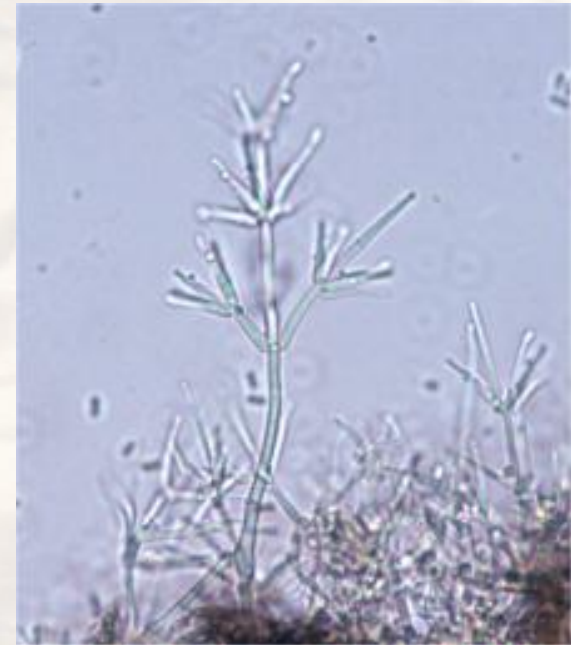
Nespolna skupina gliv

Starejša klasifikacija

Deuteromycota, Hyphomycetes,
Hyphomycetales, Moniliaceae

Novejša klasifikacija (*genetske analize*)

Ascomycota, Ascomycetes, Sordariomycetidae,
Hypocreales, Hypocreaceae





Taksonomija - *Verticillium*



Klasifikacija na sekcije na osnovi morfoloških lastnosti:

1. Sekcija *Prostrata* (manj razviti konidiofori; saprofitske, nematopatogene in entomopatogene vrste):

V. chlamydosporium, V. balanoides, V. fungicola, V. lecani

2. Sekcija *Albo-erecta* (močno razviti konidiofori): *V. rexianum*

3. Sekcija *Verticillium* (oranžno rjava obarvanost micelija): *V. tenerum*

4. Sekcija *Nigrescentia* (vrste s temnimi melaniziranimi trajnimi organi):

V. albo-atrum, V. dahliae, V. tricorpus, V. nigrescens, V. nubilum in
V. theobromae

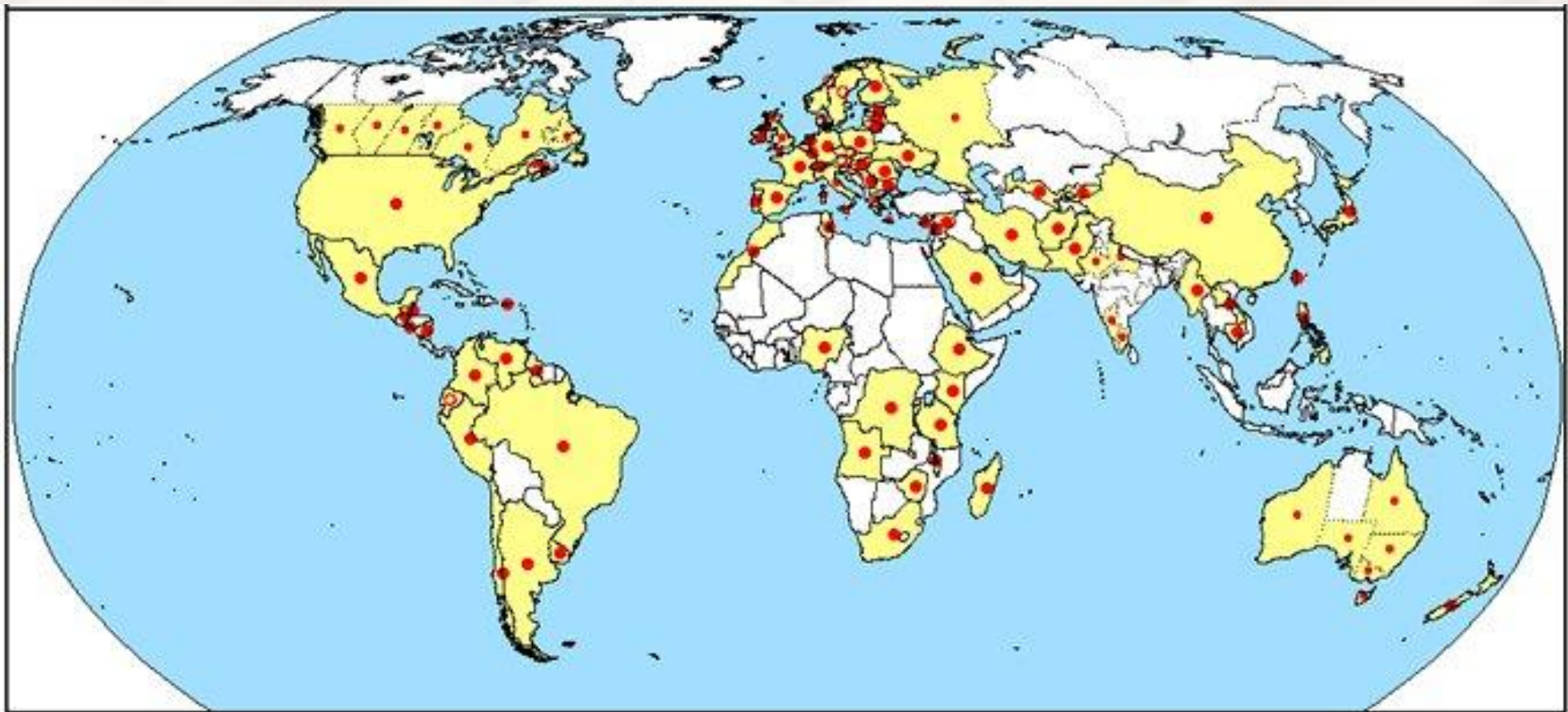


Rastlinski patogeni

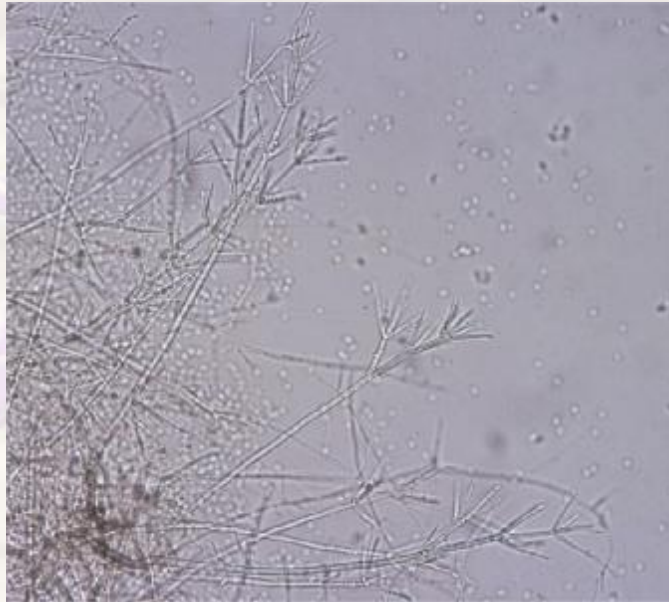
***Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold (1879)**

***Verticillium dahliae* Klebahn (1913)**

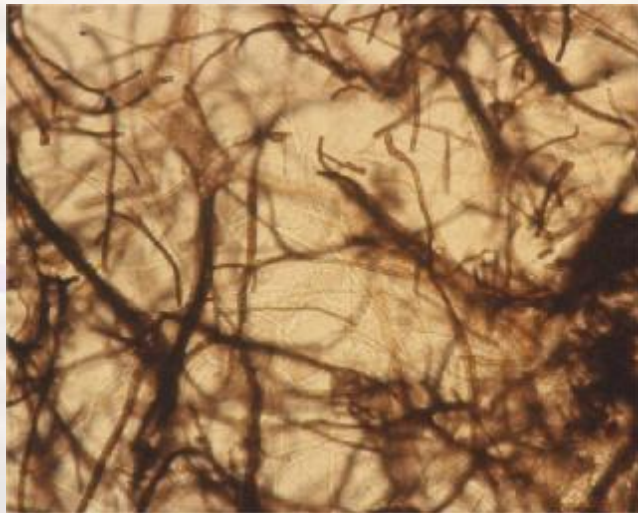
- Parazitirata več kot 300 različnih rastlinskih vrst iz 43 družin (dvokaličnice)
- Povzročata venenje in odmiranje rastlin (talni traheomikotični glivi)
- Razširjeni sta na večini območij zmernega zemeljskega pasu.



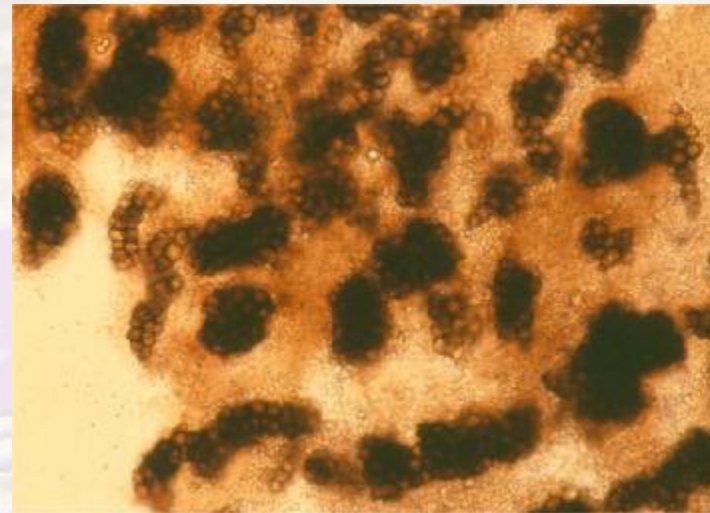
Verticillium albo-atrum,
Verticillium dahliae



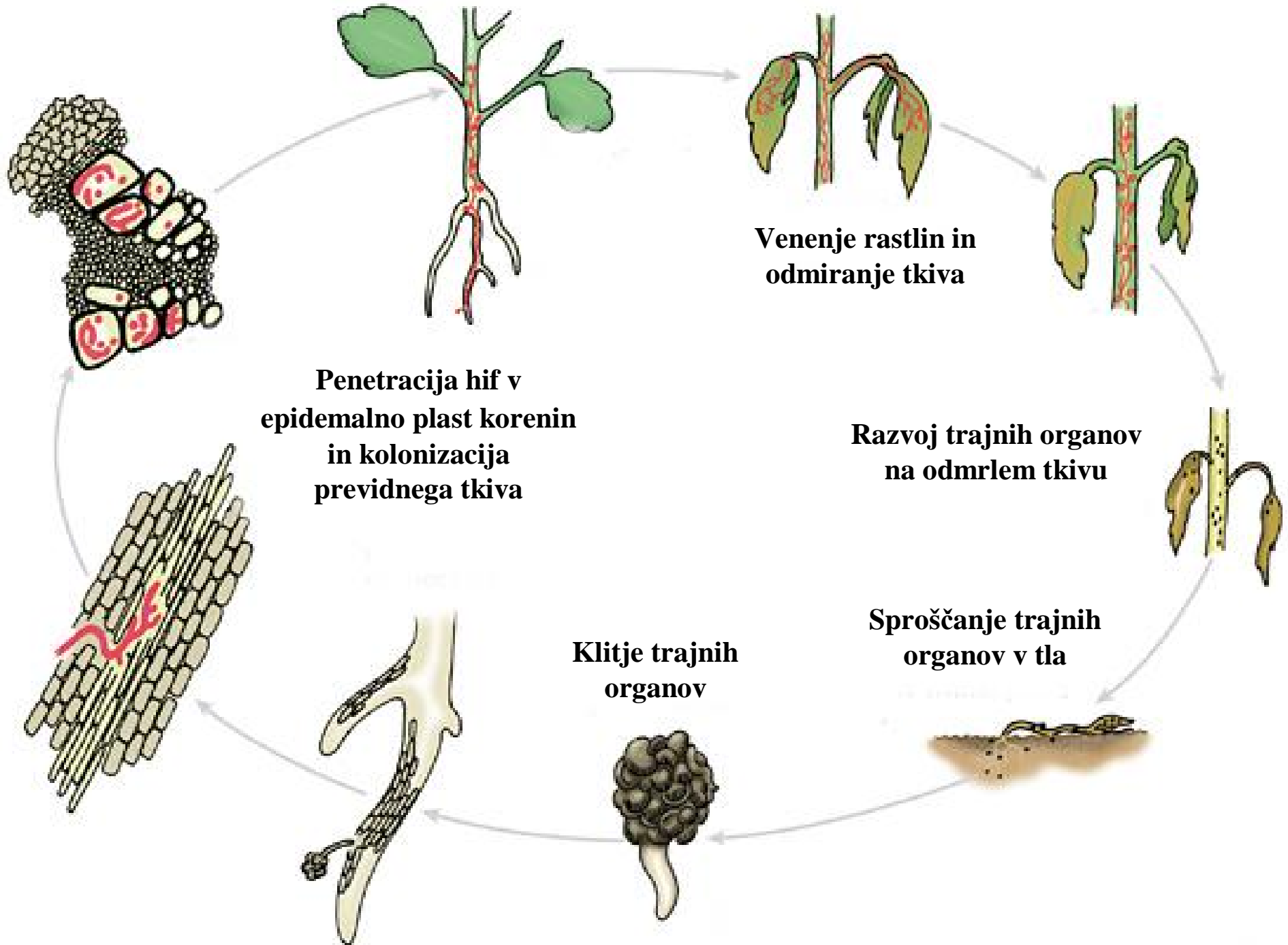
V tleh se ohranjata s trajnimi organi (*V.dahliae* – več kot 10 let)



V. albo-atrum (trajni micelij)



V. dahliae (mikrosklerociji)



Oljke: letalni patotip DF
V.dahliae



Javor (*Acer* spp.)



Jajčevac





Mentha spp.



Paradižnik



Krompir



Jagode

FIZIOLOŠKA SPECIALIZACIJA

Verticillium albo-atrum

F. sp: *Medicago sativa*

Patotipi: *Humulus lupulus*

Verticillium dahliae

F. sp: *Mentha* spp.

F. sp: Brassicaceae

Patotipi: *Gossypium* spp.
Olea europaea

Verticilijska uvelost hmelja



Verticilijska uvelost hmelja:

Council Directive 2000/29/ES quarantine organisms II.A.II. (Hop strains)



Zakaj tako nevarna bolezen?

- Ni učinkovitih FFS za preprečevanje okužb
- Dolgotrajno ohranjaje v tleh in hitro širjenje
- Prenaša se s sadilnim materialom, tlemi, odpadki (hmeljevina), mehanizacijo, pleveli
- Hmelj je trajnica, ki za pridelavo potrebuje obsežen agrotehnični sistem.
- Sajenje odpornih sort, kolobar in fitosanitarni ukrepi so edini uspešen način preprečevanja

Verticilijska uvelost hmelja

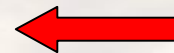
Bolezensko stanje je odvisno od virulence povzročitelja, odpornosti kultivarjev in abiotskih dejavnikov



RASTLINA-PATOGEN interakcije:

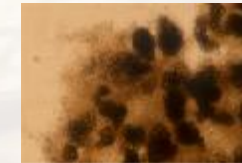
Blaga oblika:

- Občutljive sorte in avirulentni izolati
- Odporne sorte in virulentni izolati



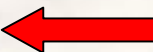
Verticillium dahliae

Verticillium albo-atrum



Letalna oblika:

- Občutljive sorte in virulentni izolati
- Občutljive sorte in avirulentni izolati (redok pojav)
- Odporne sorte in virulentni izolati (redok pojav)



Verticillium albo-atrum



Letalna oblika *V. albo-atrum*







**Porjavelo prevodno tkivo
obolelih rastlin**



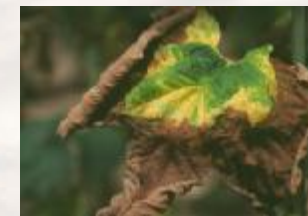
Neokužena rastlina



Odmrle in rastline



Pregled izbruhov verticilijske uvelosti hmelja



Anglija:

- *1924 blaga oblika*
- *1933 letalna oblika (~ 2000 ha)*

***V. albo-atrum* patotipi: M, PV1, PV2, PV3**

Nemčija:

- *1952 blaga oblika: (~ 800 ha)*

Slovenija:

- *1974 blaga oblika: (~ 60 ha)*
- *1997 letalna oblika: (~ 180 ha)*

***V. albo-atrum* patotipi: PG1 (blag) , PG2 (letalen)**

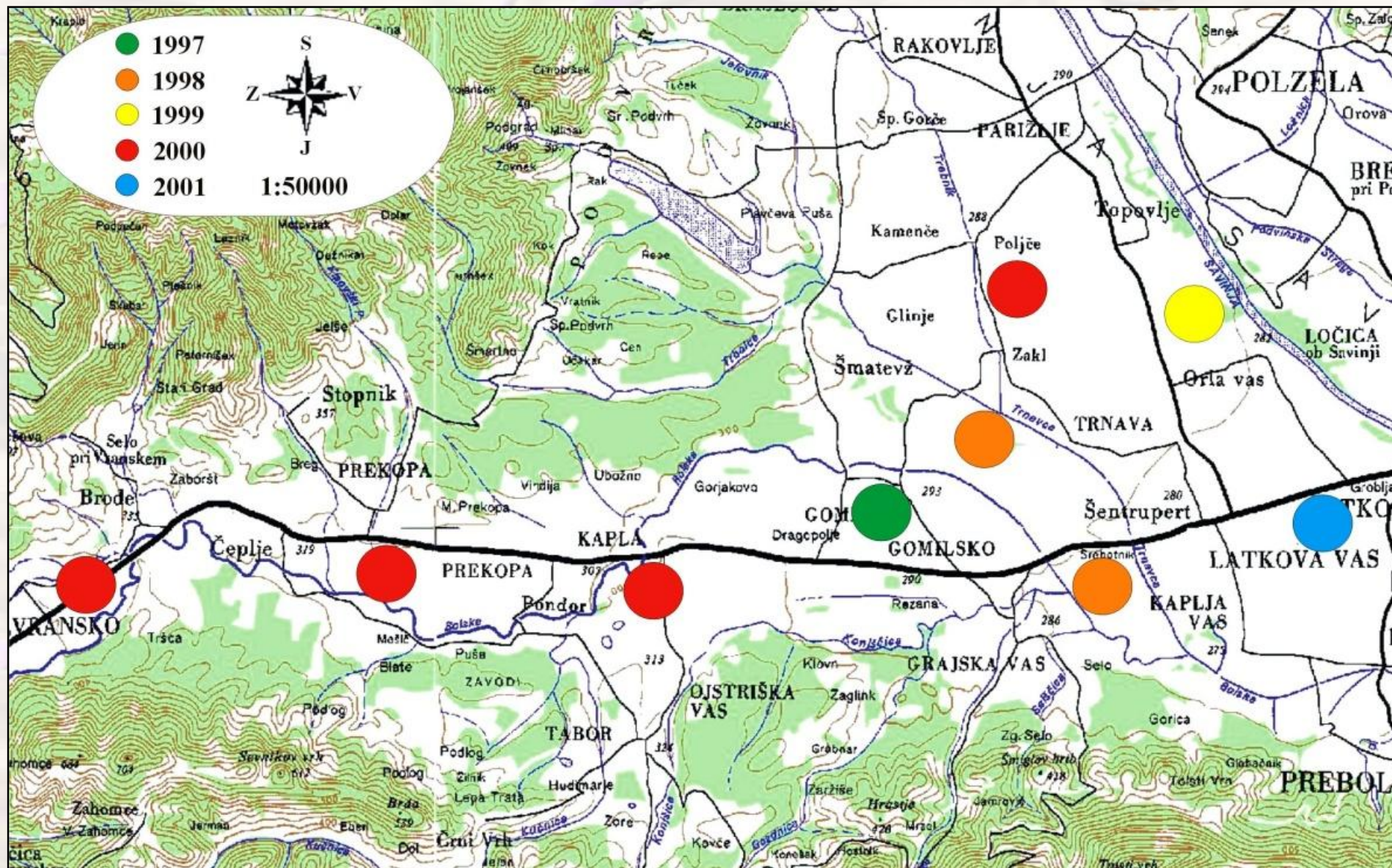
Belgija, Bolgarija, Češka Republika, Francija, Poljska, Tasmanija, Nova Zelandija in ZDA (*blaga oblika*)

Verticilijska uvelost hmelja v Sloveniji



- Prvič potrjena leta 1974, kot posledica okužb z *V. albo-atrum* in *V. dahliae* (*Dolinar M., 1975, Hmeljar*)
- V naslednjih letih opažen samo sporadičen pojav v nekaterih hmeljiščih.
- Leta 1997, je prišlo do odkritja prvega žarišča letalne oblike na območju zahodnega dela Savinjske doline. Kot povzročitelj identificirana gliva *V. albo-atrum*.
- V naslednjih 4 letih beležimo zelo hitro širjenje, ki je zajelo več kot 180 ha hmeljišč, od katerih jih je bilo potrebno več kot polovico uničiti (*nepravilna tehnologija pridelave*).
- Izkazalo se je, da so vse gojene sorte zelo občutljive !!!

Kronološki pregled širjenja okužb letalne oblike hmeljev uvelosti v Sloveniji



Ali imamo v Sloveniji dva hmeljna patotipa glive *V. albo-atrum* ?!



Zbiranje izolatov

- Območje zahodnega dela Savinjske doline (LETALNA OBLIKA)
- Pridelovalna območja Koroške, Podravja, Savinjske doline (BLAGA OBLIKA)



Testiranje virulence (umetne okužbe testnih kultivarjev)

Molekularna analiza AFLP

Rezultati testiranja virulence hmeljnih izolatov glive *V. albo-atrum* iz različnih žarišč

Izolate	Cultivar					Pathotype/ Virulence ^b
	W. Target	W. Chall.	Fuggle	Celeia	Mean ^a	
Led	0,5	1,7	38,1	33,8	18,5 a	PG2
Or99	0,7	1,8	41,5	35,1	19,8 a	PG2
Vran01	0,8	2,3	42,4	32,4	19,5 a	PG2
Jer	0,7	2,1	40,5	37,8	20,3 a	PG2
Rov	1,2	2,1	39,7	35,4	19,6 a	PG2
Rot	1,0	1,9	47,1	34,2	21,1 a	PG2
T2	1,0	2,1	39,7	36,2	19,7 a	PG2
Pov	1,2	2,7	39,8	35	19,7 a	PG2
Ocer	0	0	3,8	4,7	2,1 b	PG1
Kres99	0	0	4,5	5,1	2,4 b	PG1
Zup	0	0	3,5	4,2	1,9 b	PG1
Rec	0	0	3,9	4,8	2,2 b	PG1

PG2 (Letalni)

PG1 (Blagi)

^a Means with the same letter do not differ significantly at the 5 % level (Duncan Multiple Range Test).

^bPG2- isolates causing lethal form of hop wilt, PG1- isolates causing mild form of hop wilt

PG1 (blagi)



PG2 (letalni)

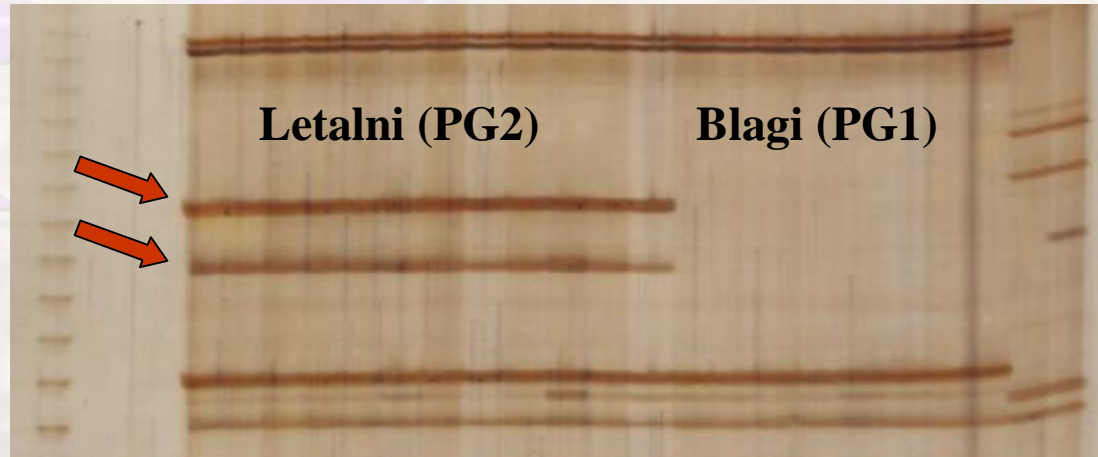


AFLP analiza

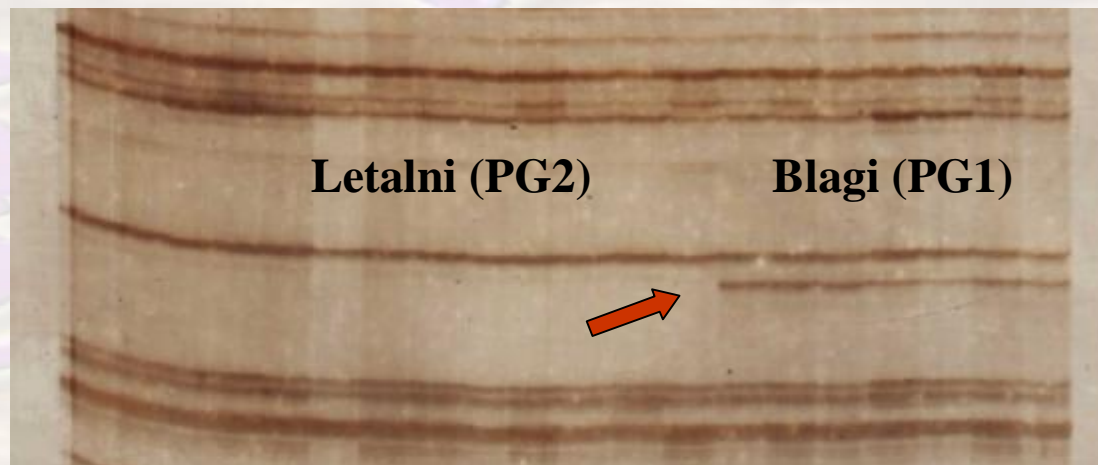
(optimizirana za analizo gliv)

V. albo-atrum

V. dahliae

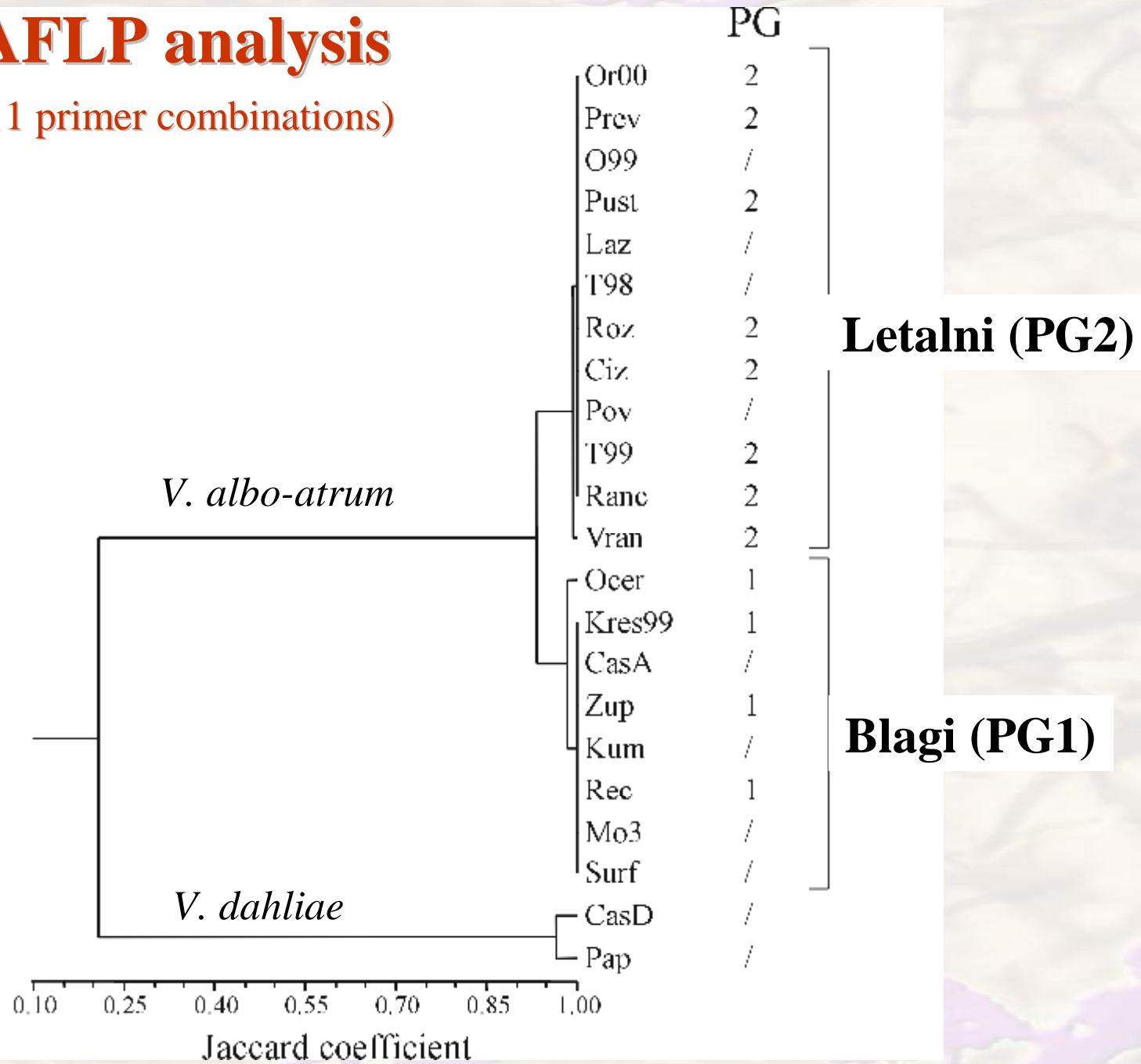


V. albo-atrum



AFLP analysis

(11 primer combinations)



**Vzrok letalne oblike:
V. albo-atrum pathotype PG2**

Characterization of *Verticillium albo-atrum* Field Isolates Using Pathogenicity Data and AFLP Analysis

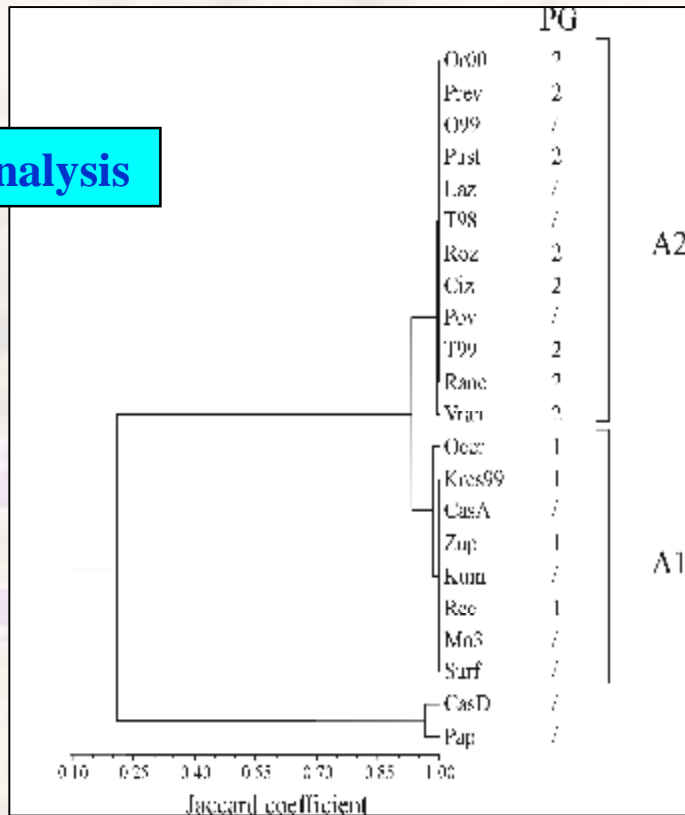
Sebastjan Radišek, Plant Protection Department, Institute of Hop Research and Brewing Žalec, Cesta Žalskega lahora 2, 3310 Žalec, Slovenia; Jernej Jakše, Centre for Plant Biotechnology and Breeding, Biotechnical Faculty, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia; Andrej Simončič, Plant Protection Department, Institute of Hop Research and Brewing Žalec; and Branka Javornik, Centre for Plant Biotechnology and Breeding, Biotechnical Faculty

ABSTRACT

Radišek, S., Jakše, J., Simončič, A., and Javornik, B. 2003. Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. Plant Dis. 87:633-638.

transcribed spacer (ITS) of nuclear rDNA (3,18,19), and random amplified polymorphic DNA (RAPD; 15,22). These studies have demonstrated the genetic variation

AFLP analysis



Virulence testing



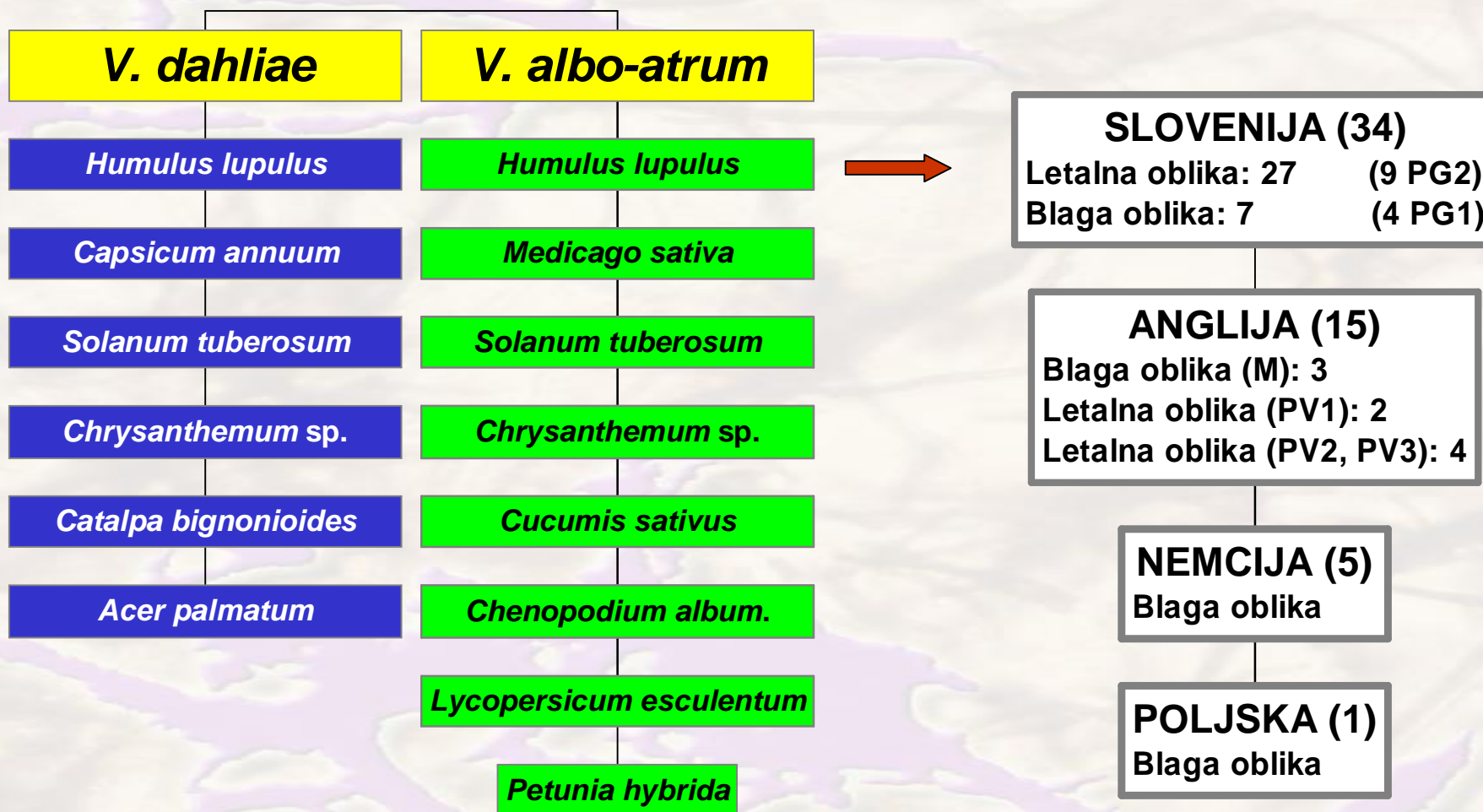
Ali je letalni patotip PG2 nastal *de novo* ali pa je prenešen iz Anglije ?

Kakšna je sorodnost izolatov, ki parazitirajo hmelj z izolati iz ostalih rastlin ?



- Primerjava virulence hmeljnih izolatov glive *V. albo-atrum* iz Slovenije in Anglije
- Določitev genetske variabilnosti med izolati iz različnih gostiteljskih rastlin in izolati, ki parazitirajo hmelj.

I. Material – izolati gliv



Skupno analiziranih 88 izolatov

I. Določanje virulence



Ugotovili enako stopnjo virulence pri slovenskem letalnem patotipu PG2 in angleškem PV1 glive *V. albo-atrum*. Podobni rezultati tudi v primeru blagih izolatov PG1 in M !!!

PG2 (SLO) = PV1 (GB)



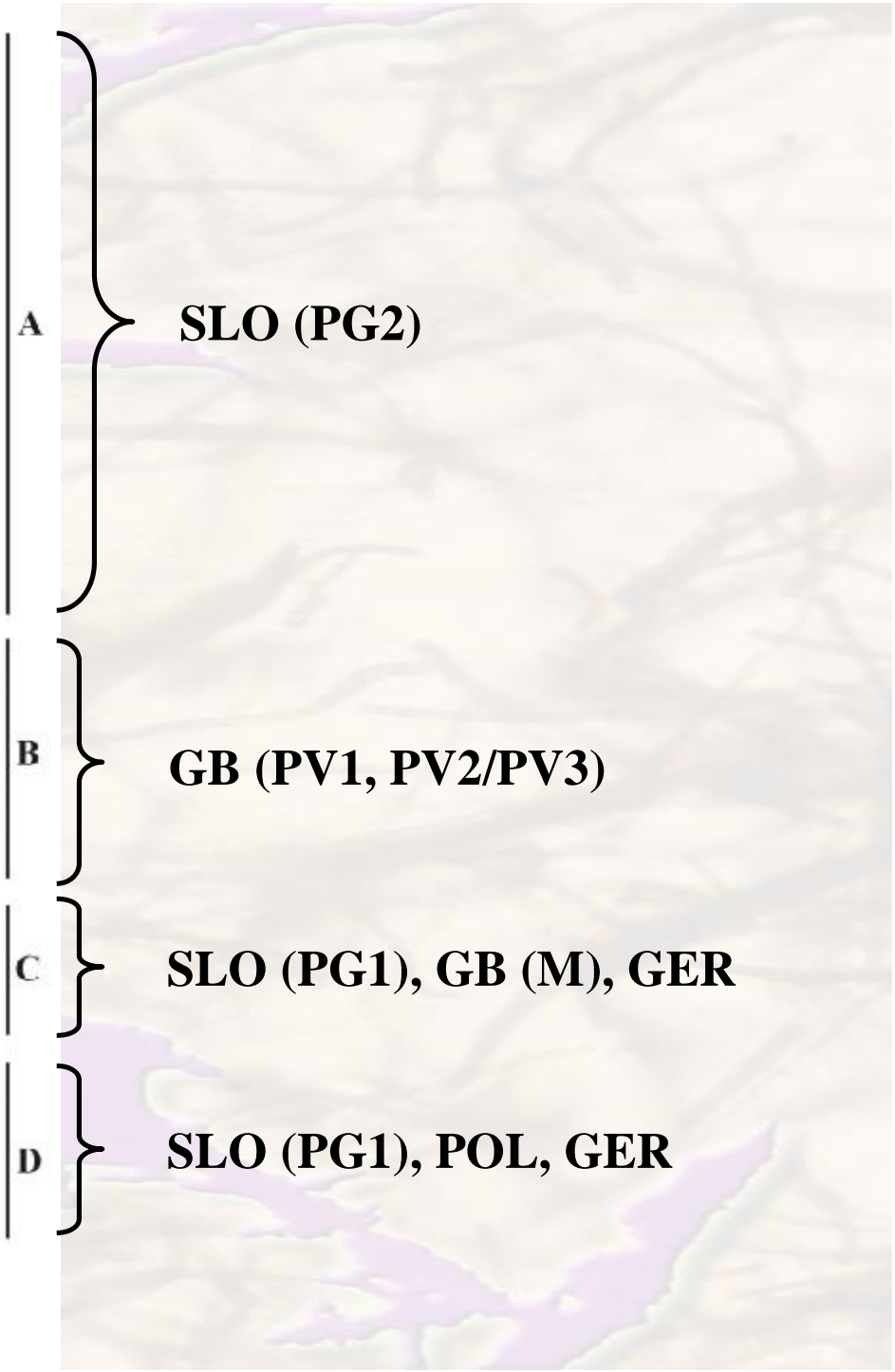
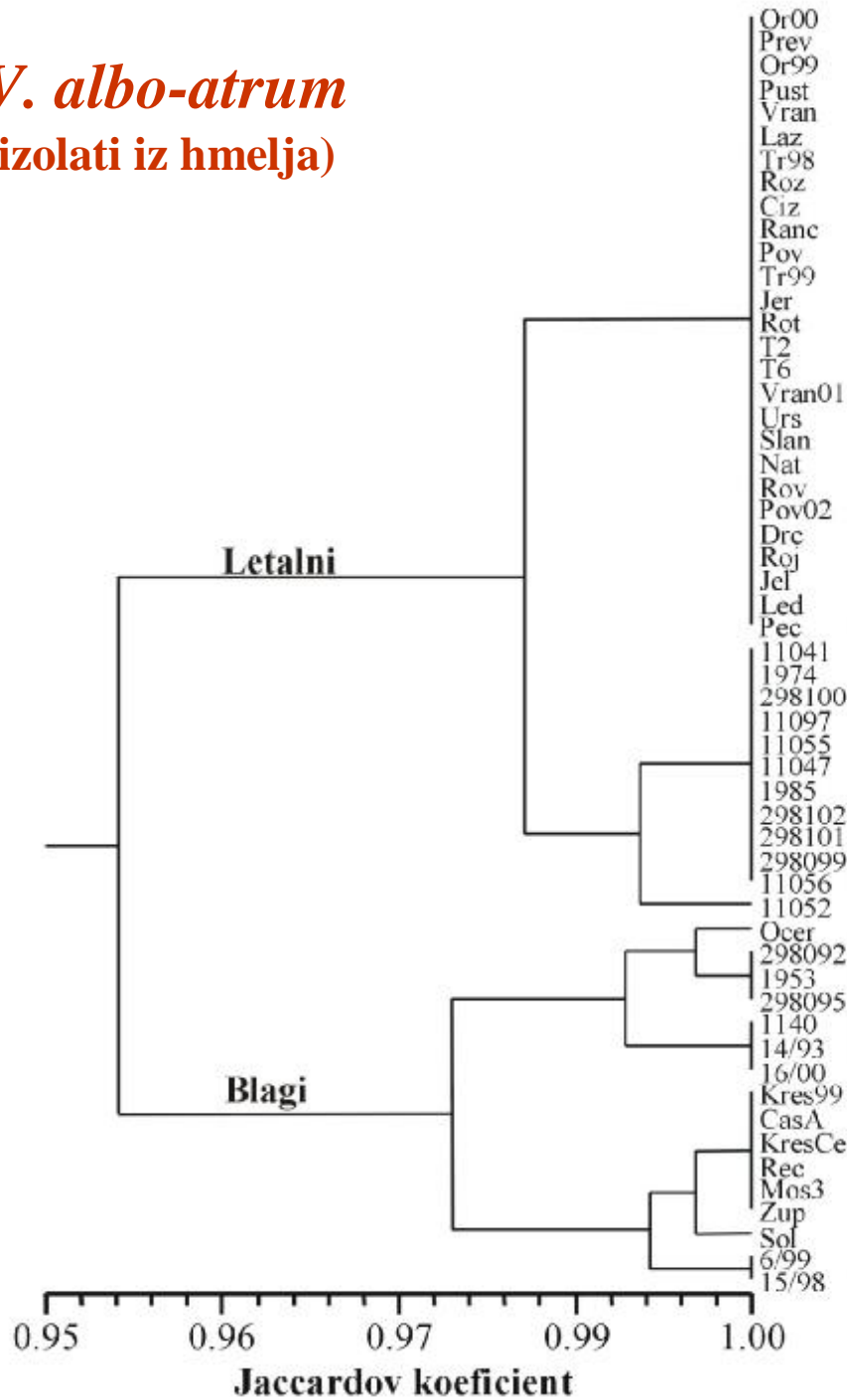
PG1 (SLO) = M (GB)





Sadilni material !!!

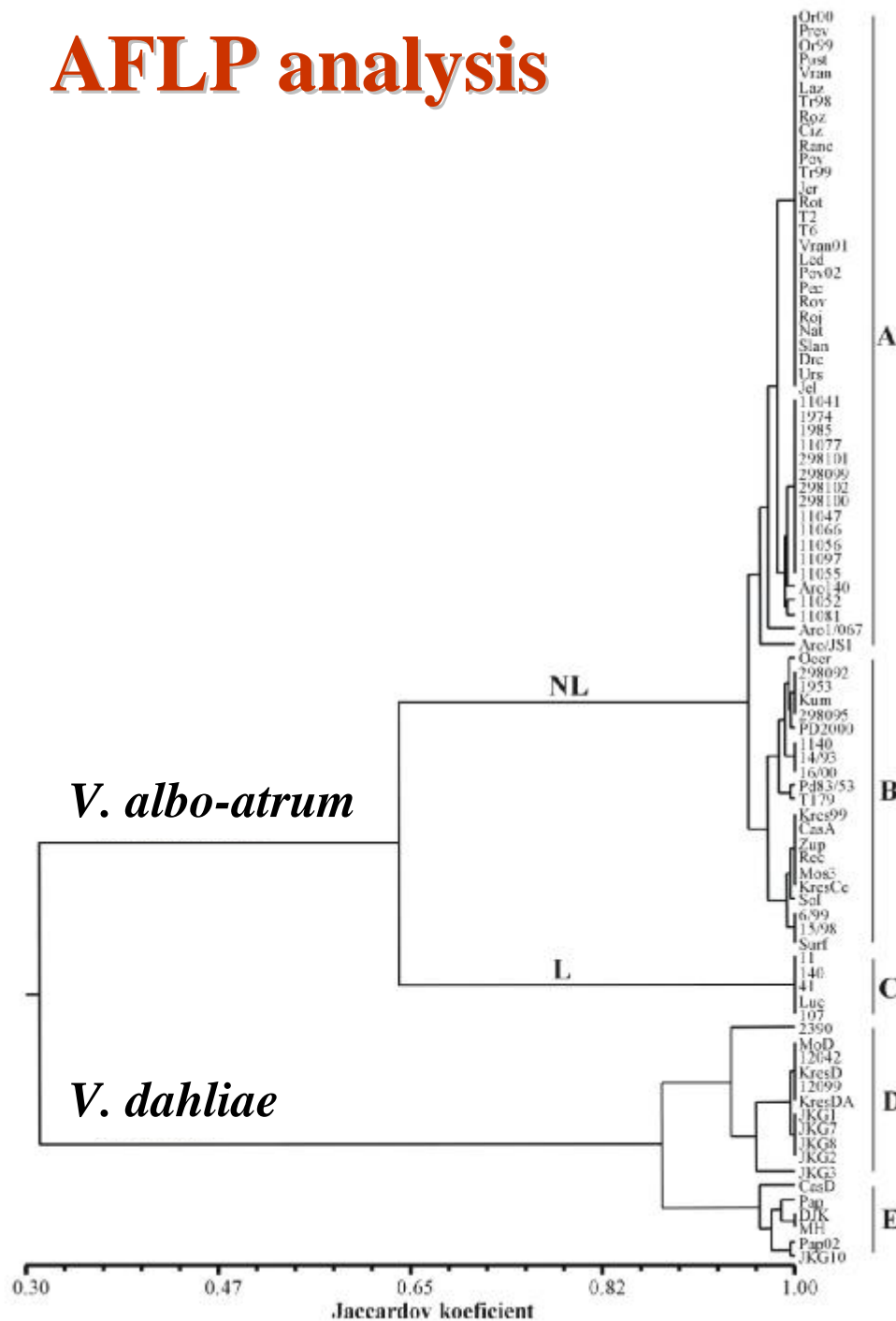
V. albo-atrum
(izolati iz hmelja)



**LETALNO OBLIKO NA HMELJU V
SLOVENIJI POVZROČA PATOTIP PV1;
genotip PG2 glive *V. albo-atrum***



AFLP analysis



Virulentni izolati iz hmelja in
paradižnika (SLO, GB).

Izolati iz krompirja, bele metlike in
krizantem (GB).

Manj virulentni izolati iz hmelja (SLO,
GB, GER in POL) in paradižnika (GB,NL)
Izolati iz kumar in petunij (SLO).

Izolati iz lucerne (GB, CAN, USA).

Izolati iz hmelja (SLO, GB, GER)
krompirja (NL) in drevesnih vrst (NL)

Izolati iz krompirja, hmelja, paprike in
krizantem (SLO, NL).

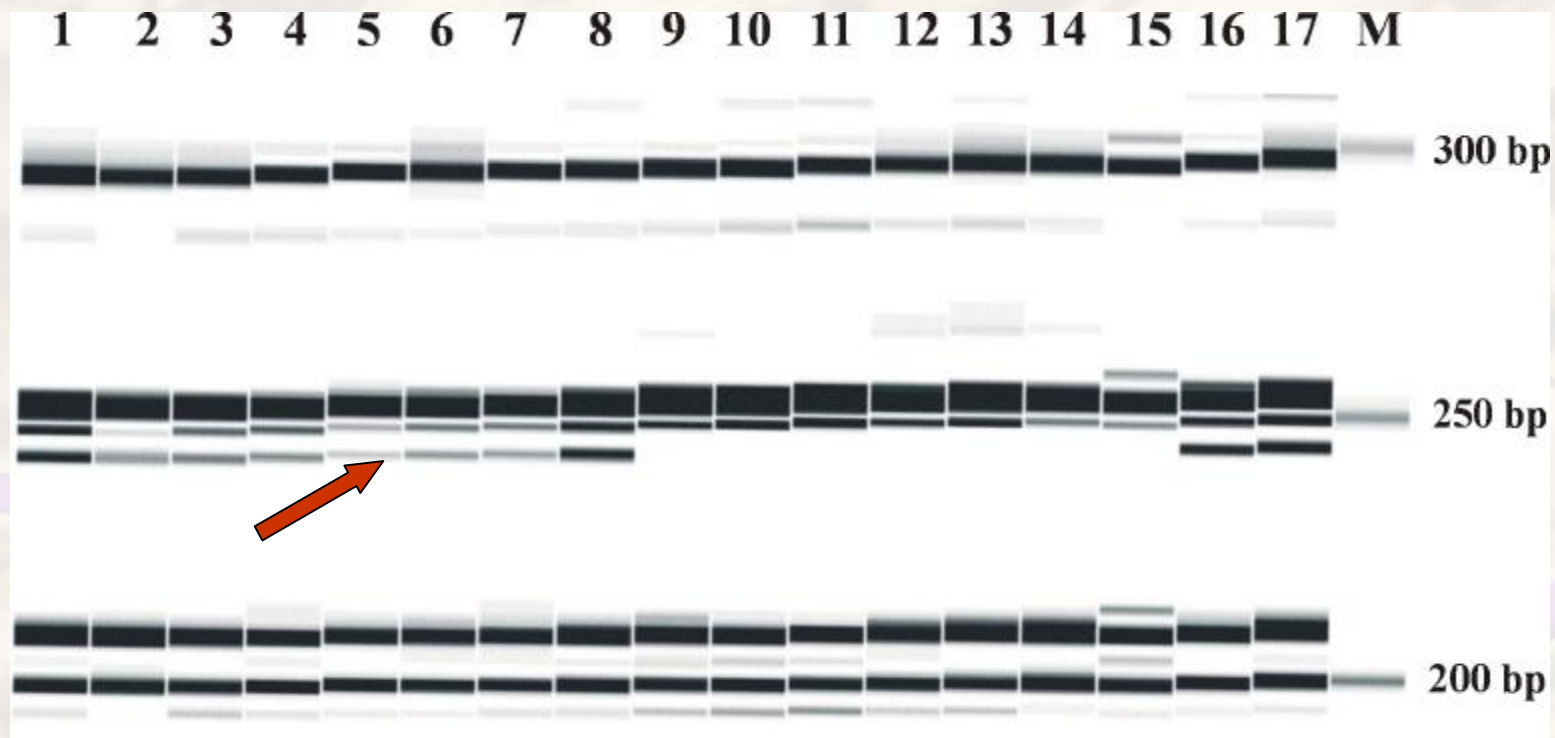


Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop

Sebastjan Radišek¹, Jernej Jakše², and Branka Javornik^{2,*}

¹Plant Protection Department, Slovenian Institute for Hop Research and Brewing, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310, Žalec, Slovenia; ²University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Jamnikarjeva 101, SI-1000, Ljubljana, Slovenia; *Author for Correspondence (Fax: +386-1-423-1088; E-mail: branka.javornik@bf.uni-lj.si)

Odkrit DNA fragment, ki je prisoten pri zelo virulentnih izolatih iz hmelja, lucerne in paradižnika



Zakaj so letalni patotipi *V. albo-atrum* bolj škodljivi rastlinam ???



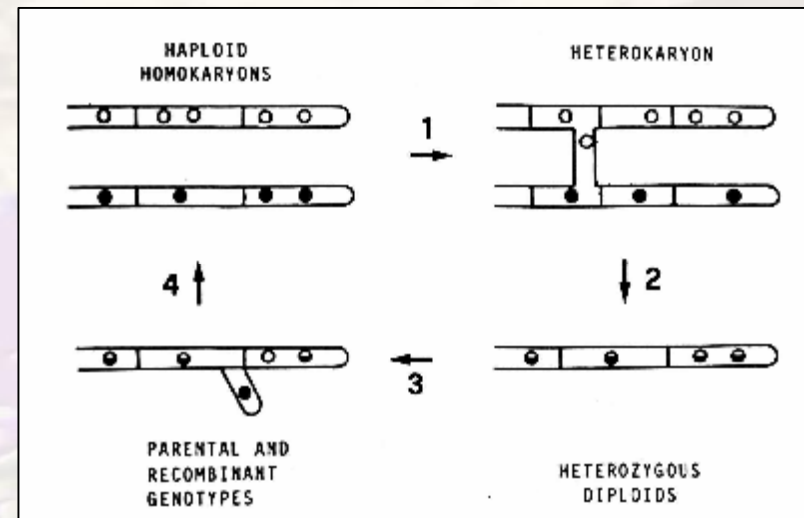
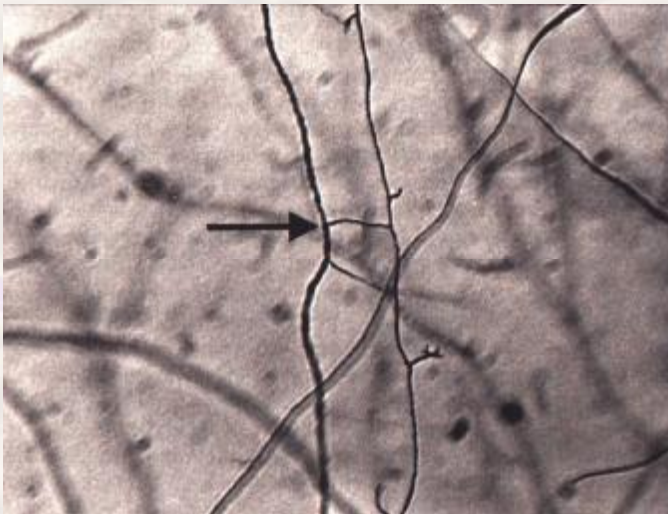
PG2 (SLO) = PV1 (GB)



PG1 (SLO) = M (GB)

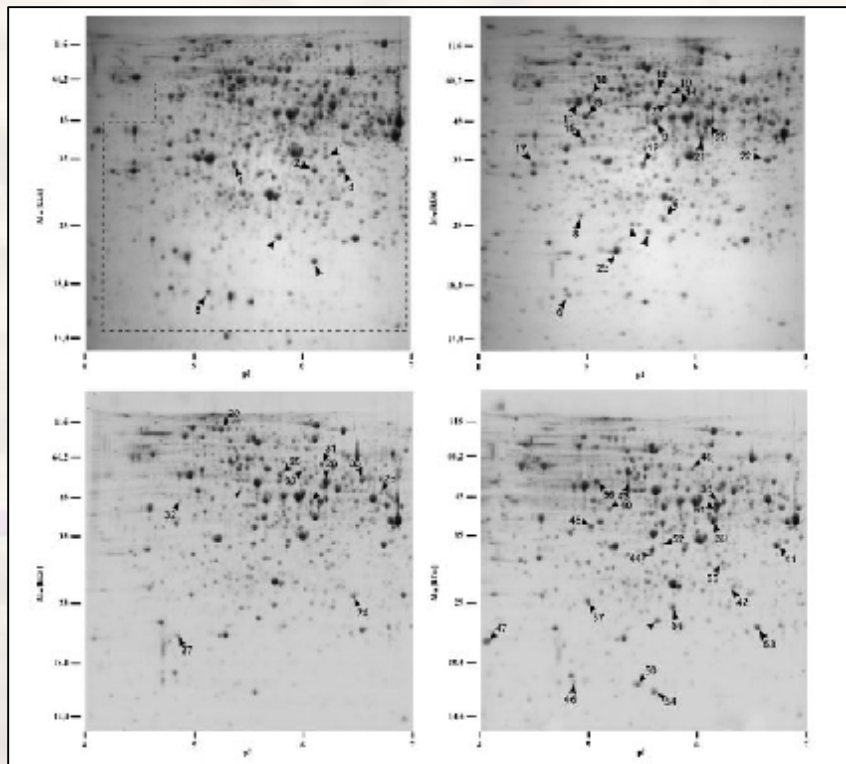
Mehanizmi nastanka novih patotipov, različic, ras...pri nespolnih glivah:

- **Mutacije (delecije, insercije, inverzije, translokacije):**
Večina teh je recesivnih, se pa lahko v haploidnih organizmih (bakterije, glive) takoj izrazijo, pri diploidnih organizmih pa šele v homozigotnem stanju
- **Genetske rekombinacije (paraseksualni cikel)**

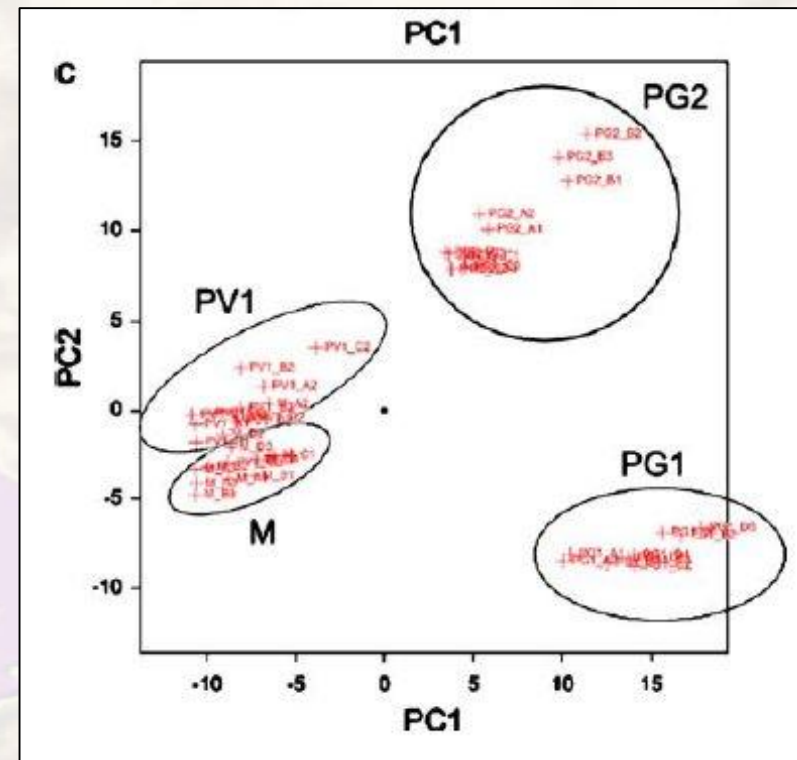


Proučevanje izražanja proteinov različno virulentnih patotipov

- **Letalni** (PV1 Anglija, PG2 Slovenija)
- **Blagi** (M Anglija, PG1 Slovenija)



2-DE PAGE geli



Proučevanje izražanja proteinov različno virulentnih patotipov

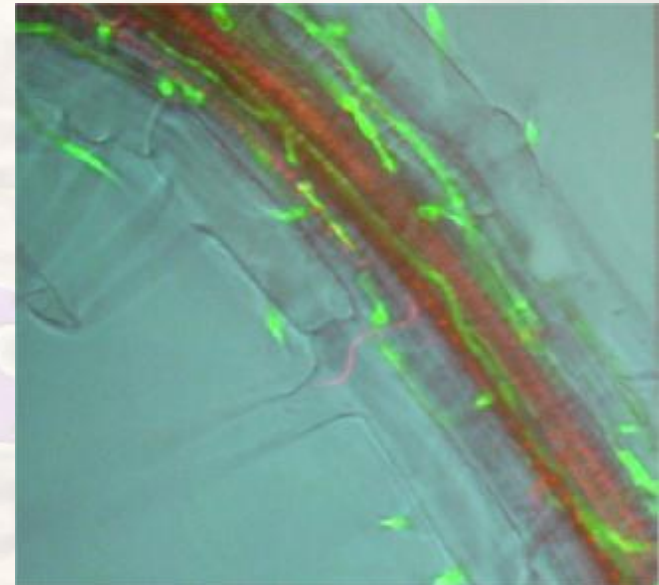
Eur J Plant Pathol
DOI 10.1007/s10658-009-9467-6

Comparison of mycelial proteomes of two
Verticillium albo-atrum pathotypes from hop

Stanislav Mandelc • Sebastjan Radisek •
Polona Jamnik • Branka Javornik

Letalni oz. bolj virulentni izolati izražajo:

- povečano ekspresijo peroksidaz
- višji nivo proteinov, ki so povezani s citoskeletom
- višji nivo proteinske sinteze
- višji nivo energetskega metabolizma



II. RAZVOJ DIAGNOSTIKE



Raziskave oz. odkritje razlik med patotipi omogočile razvoj aplikativne in rutinske diagnostike

Kombinacija začetnih oligonukleotidov	AFLP marker	Specifičnost
<i>EcoRI-GA/MspI-AT</i>	AFLP-1	PG1
<i>EcoRI-GA/MspI-TA</i>	AFLP-2	PG1
<i>EcoRI-GA/MspI-AG</i>	AFLP-3	PG1
<i>EcoRI-GA/MspI-CG</i>	AFLP-4	PG2
<i>EcoRI-GA/MspI-GT</i>	AFLP-5-1	PG2
	AFLP-5-2	PG2
<i>EcoRI-GT/MspI-GA</i>	AFLP-6-1	PG1
	AFLP-6-2	PG2
<i>EcoRI-GT/MspI-CG</i>	AFLP-7-1	PG2
	AFLP-7-2	PG2
<i>EcoRI-AC/MspI-TC</i>	AFLP-8-1	PG2
	AFLP-8-2	PG1
<i>EcoRI-AC/MspI-TA</i>	AFLP-9-1	PG2
	AFLP-9-2	PG2
<i>EcoRI-AC/MspI-GT</i>	AFLP-10-1	PG1
	AFLP-10-2	PG2
<i>EcoRI-TC/MspI-TA</i>	AFLP-11-1	PG2

17 specifičnih AFLP fragmentov: 6 PG1 in 11 PG2

Razvoj patotipsko specifičnih SCAR markerjev

- Identifikacija patotipov
- Analiza tal, rastlin, substratov

Development of Pathotype-Specific SCAR Markers for Detection of *Verticillium albo-atrum* Isolates from Hop

Sebastjan Radšček, Plant Protection Department, Slovenian Institute of Hop Research and Brewing, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenia; and Jernej Jakše and Branka Javornik, Centre for Plant Biotechnology and Breeding, Agronomy Department, Biotechnical Faculty, Jamnikarjeva 101, Ljubljana 1000, Slovenia

ABSTRACT

Radšček, S., Jakše, J., and Javornik, B. 2006. Development of pathotype specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. Plant Dis. 88:1115-1122.

unity of hop gardens to each other in all production areas and the prevalence of susceptible hop cultivars.

The identification and rapid detection of

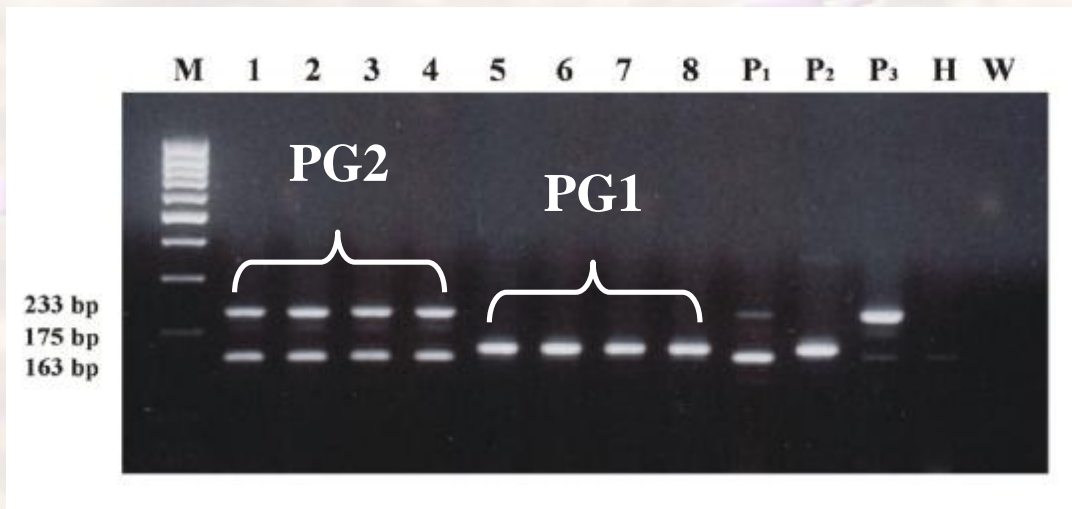
European and Mediterranean Plant Protection Organization
Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

PM 7/78 (1)

Diagnostics
Diagnostic

Verticillium albo-atrum and *V. dahliae* on hop

PCR (analiza v 3 dneh)



Patogeni testi 4-6 tednov

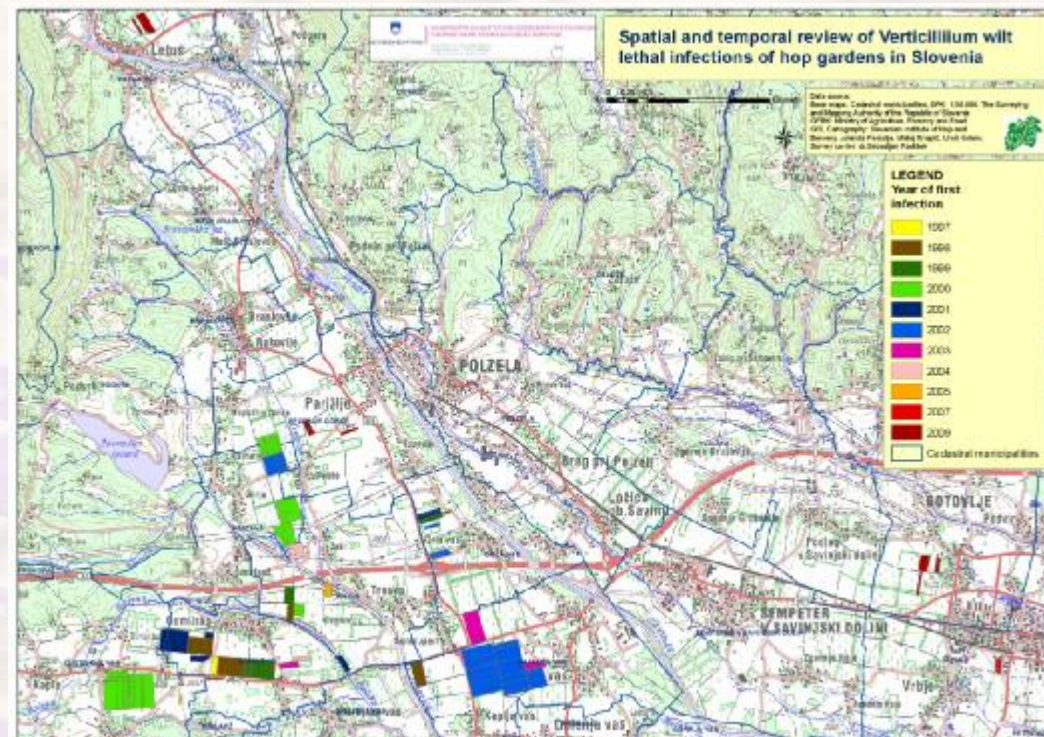
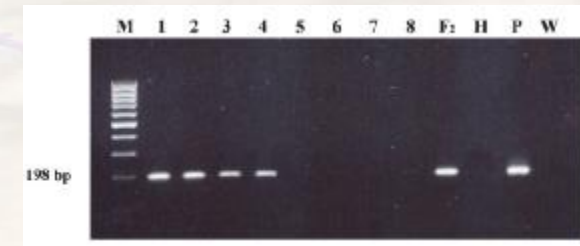


III. Strategija preprečevanja *Verticillijske* uvelosti hmelja



I. SISTEMATIČNI NADZOR (IHPS; FSI; FURS)

- Vizualni pregledi okuženih območij (GIS)
- Vzorčenje in laboratorijske analize
- Nadzor nad izvajanjem ukrepov

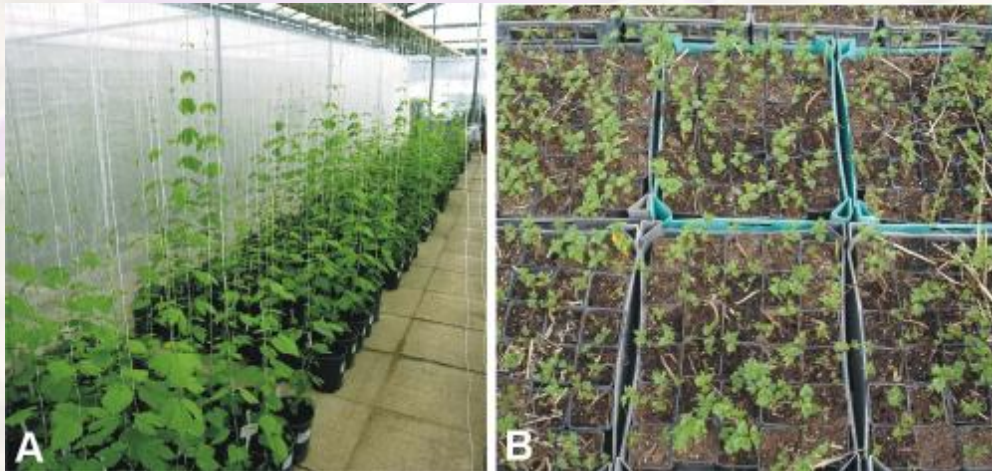


II. FITOSANITARNI UKREPI *(Official Gazette RS. No. 45/01 and 117/02).*

- Uničevanje obolelih rastlin
- Zažig in termično kompostiranje hmeljevine
- Razkuževanje opreme
- Karantenska premena (4 leta)



III. CERTIFICIRAN SADILNI MATERIAL



Matične rastline
(Certifikat A)



Matični nasadi –
varovalni pasovi
(Certifikat B)

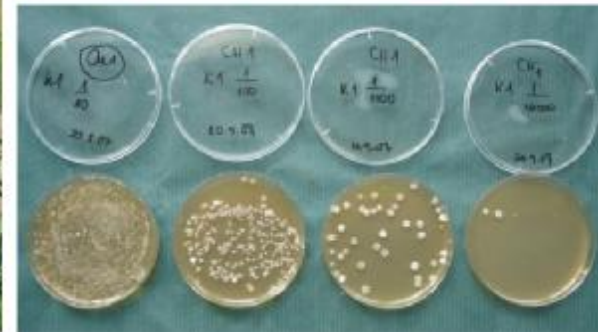
IV. ŽLAHTNENJE ODPORNIH SORT

- *Selekcije genotipov*



V. Uničevanje talnega infekcijskega potenciala

- solarizacija, rastline s fungistatičnim vplivom (glukozinulati...)





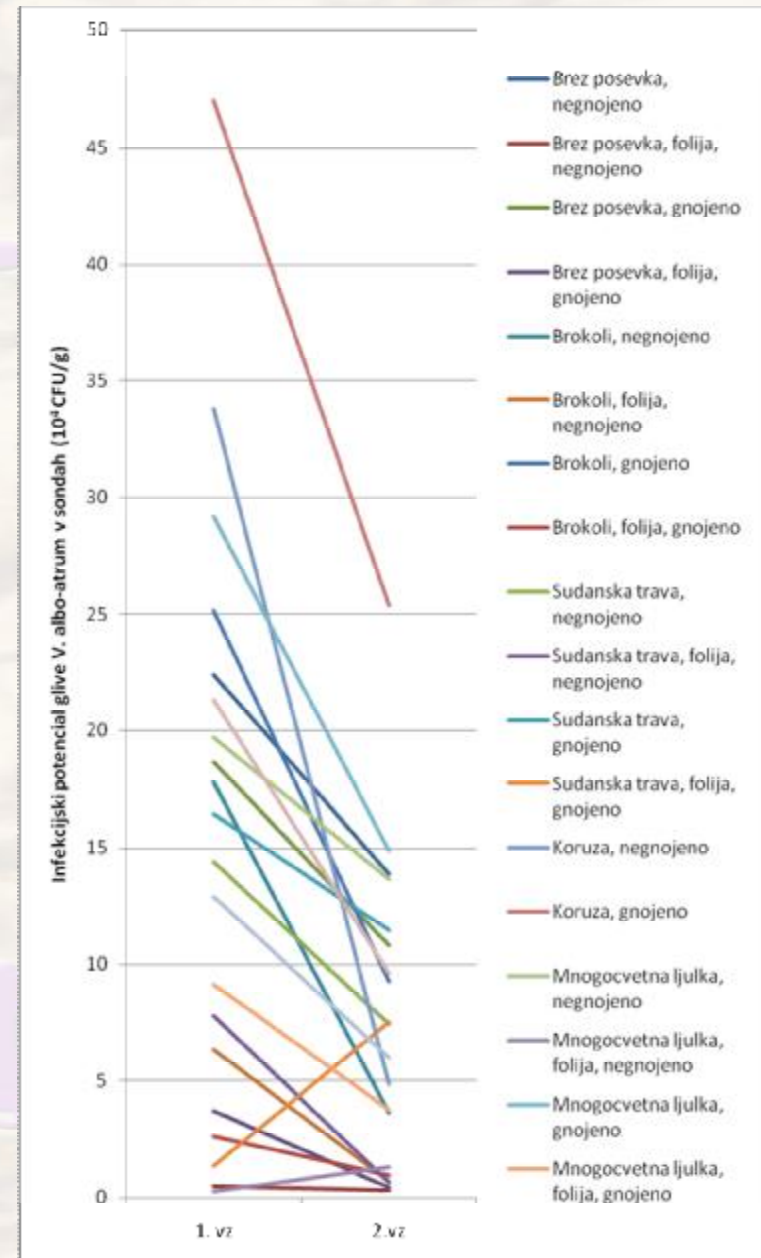
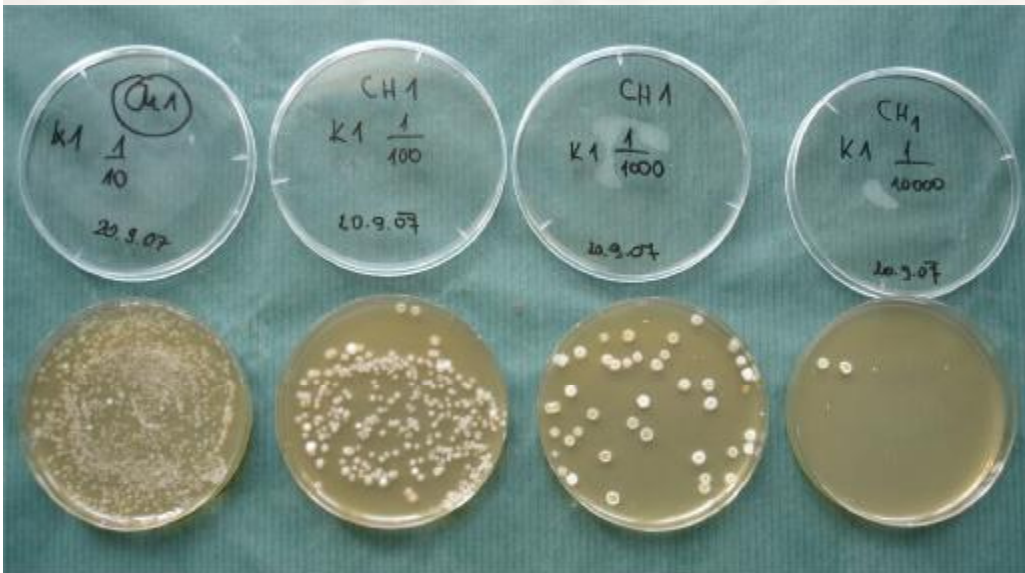






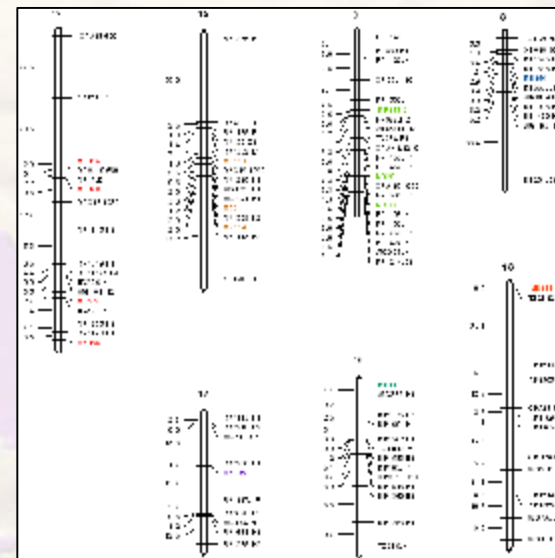
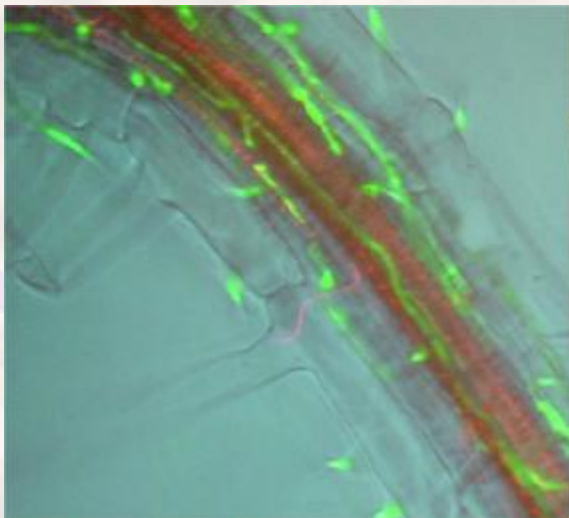


Mikrobiološka analiza sond



VI. RAZISKAVE ODPORNOSTI RASTLIN IN VIRULENCE PATOGENOV

- Interakcije rastlina - patogen (cDNA – AFLP, 2DE-PAGE)
- Genetsko kartiranje (identifikacija genov)





ZAHVALA:

- Fitosanitarni upravi RS
- Fitosanitarni inšpekciji
- MKGP in MVZT
- Sodelavcem na IHPS in BF