

Diagnostyka Diagnostic

***Verticillium albo-atrum* i *V. dahliae* na chmielu**

Zakres stosowania

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Verticillium albo-atrum* i *V. dahliae* na chmielu.

Zatwierdzenia i nowelizacje

Zatwierdzony we wrześniu, 2007 roku.

Wprowadzenie

Wercilioza chmielu (*Humulus lupulus*) może być chorobą powodującą poważne straty. W Europie, gatunkiem najczęściej izolowanym z chmielu jest *V. albo-atrum*, ale czasami, zwłaszcza w Niemczech izoluje się *V. dahliae* (Zinkernagel, 1982). Także z chmielu, ale rzadko izolowano *V. tricorpus*, ale ten gatunek nie jest znaczącym patogenem na tej roślinie.

V. albo-atrum i *V. dahliae* są gatunkami blisko spokrewnionymi i zwykle rozróżnia się je dzięki obecności struktur spoczynkowych (ciemna grzybnia spoczynkowa i mikrosklerocja odpowiednio). Oba gatunki, poza chmielem występują na wielu roślinach zielnych i drzewiastych, w dużej części obszarów umiarkowanych i subtropikalnych. Znana jest specjalizacja w stosunku do określonego gospodarza, ale generalnie izolaty obu gatunków mają szeroki zakres roślin żywicielskich i nie ma molekularnych lub morfologicznych dowodów na to, że „szczepy chmielowe” tworzą odrębne grupy w obrębie gatunku. Jednakże, jeśli chodzi o zmienność patogeniczną *V. albo-atrum* i *V. dahliae* niezbędne jest prowadzenie dalszych badań dotyczących interakcji gospodarz/patogen oraz odporności gospodarza, a do czasu uzyskania wyników, każdy izolat powinien być charakteryzowany w ramach określonych grup gospodarzy.

Wędnięcie chmielu powodowane przez *Verticillium* występuje w formie zmiennej (łagodnej) lub progresywnej (śmiertelnej, letalnej). Na ogół łagodne wędnięcie różni się intensywnością z roku na rok i rzadko powoduje zamieranie roślin, natomiast progresywne wędnięcie jest mniej uzależnione od sezonowych wahań klimatycznych i powoduje bardzo poważne symptomy z szybkim zamieraniem roślin. W Anglii, stosując testy wirulencji na różnych odmianach chmielu zidentyfikowano jeden łagodny szczep *V. albo-atrum* (M) i trzy typy letalne (PV1, PV2 i PV3) (Sewell & Wilson, 1984; Clarkson & Heale, 1985). Progresywne wędnięcie chmielu było geograficznie ograniczone do Anglii, do roku 1997, kiedy zarejestrowano epidemię na Słowenii. Testy wirulencji i analiza molekularna „chmielowych” izolatów *V. albo-atrum* pochodzących ze Słowenii i Anglii zidentyfikowały nowy genotyp (PG2) progresywnego patotypu PV1, który pojawił się na Słowenii (Radišek i wsp., 2003, 2006). Donoszono również o łagodnej formie werciliozy chmielu w Niemczech,

Polsce, Belgii, Francji, Słowenii, a poza Europą, w Nowej Zelandii i USA (Oregon), wywołanej zarówno przez *V. albo-atrum* lub *V. dahliae* (Neve,1991).

We wszystkich krajach uprawy chmielu, w których zostały niedawno wprowadzone odmiany odporne może w przyszłości wystąpić wzrost patogeniczności. W praktyce, niektóre infekcje odmian chmielu, powodowane przez izolaty o niskiej zjadliwości, bez odporności na więdnienie, prawdopodobnie występuje wszędzie tam, gdzie uprawia się chmiel. W takich przypadkach widoczne będą jedynie łagodne objawy. Występowanie szczepów o wysokiej wirulencji w stosunku do chmielu doprowadziło do ograniczeń, dotyczących przemieszczania roślin chmielu i materiału rozmnożeniowego.

Oba gatunki są przede wszystkim organizmami odglebowymi. W przypadku zainfekowania roślin, nie ma skutecznego leczenia chemicznego. Chmiel jest długowieczną byliną, która ze względu na wymóg stosowania drogich, stacjonarnych systemów podpór, często uprawiana jest w tych samych miejscach. Zakażenie plantacji chmielowych (chmielniki) może prowadzić do powtarzających się infekcji i rezygnacji z miejsc uprawy, chociaż często skutecznym sposobem redukcji strat jest stosowanie odmian o wysokiej odporności, jeżeli zezwalają na to przepisy lokalne i wymagania rynku. Historycznie rzecz ujmując, sadzenie odpornych/tolerancyjnych odmian w Wielkiej Brytanii doprowadziło do selekcji szczepów *Verticillium* o wysokiej zjadliwości.

Tożsamość

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

Verticillium dahliae Klebahn (1913)

Synonimy: Wcześniej w literaturze nie rozróżniano tych dwóch gatunków, stosując tylko nazwę *V. albo-atrum*, chociaż niektórzy autorzy rozróżniali izolaty *V. dahliae* jako formy *V. albo-atrum* tworzące mikrosklerocja lub sklerocja. Stosowano wiele innych nazw form i odmian, ale żadna z nich nie jest w powszechnym użyciu, za wyjątkiem poniższej. *V. dahliae* var. *longisporum* Stark (1961) ma dłuższe konidia niż większość izolatów, ale jest prawie całkowicie ograniczony do gospodarzy krzyżowych i został zaproponowany jako odrębny gatunek *V. longisporum* (Karapapa i wsp., 1997). *V. albo-atrum* został podzielony na dwie "grupy" (Robb i wsp., 1993): izolaty GrpI są najczęstsze i obejmują wszystkie te znajdujące na chmielu; izolaty GrpII są morfologicznie i molekularnie odrębne od izolatów GrpI, są zwłaszcza związane z ziemniakami i powinny stanowić odrębny gatunek (ale nie zostały jeszcze formalnie opisane jako takie).

Teleomorfa: nie stwierdzono/zidentyfikowano

Stanowisko taksonomiczne: Fungi: Ascomycota: Pezizomycotina: Sordariomycetes: Phyllachorales

Komputerowy kod EPPO: VERTAH (*V. albo-atrum*) & VERTDH (*V. dahliae*)

Kategoria fitosanitarna: EPPO A2; UE II/A2

Wykrywanie

Opisywane gatunki nie są zwykle związane z tymi częściami roślin chmielu, będącymi przedmiotem obrotu handlowego w przemyśle piwowarskim tj. suszonymi kwiatami (szyszki) i różnymi rodzajami ekstraktów z nich uzyskanych. Występują w resztkach poźniwnych, ale zazwyczaj są usuwane lokalnie, w najgorszym przypadku dochodzi tylko do

rozprzestrzeniania się grzybów na niewielkie odległości. Mogą być przenoszone z materiałem rozmnożeniowym i ewentualnie z towarzyszącą mu glebą.

Objawy choroby

W zależności od zjadliwości patogena, wrażliwości odmian i czynników ekologicznych choroba na chmielu może występować w formie łagodnej lub progresywnej. Do objawów, które są znane w obu postaciach choroby należą: (i) żółknięcie i więdnienie liści, które rozpoczyna się u podstawy łodygi i rozciąga się ku górze. Przebarwienie liści zaczyna się między głównymi nerwami i prowadzi do brzegowej i międzynynerwowej nekrozy (rys.1). Brzegi liści wywijają się do góry, a zainfekowane liście bardzo łatwo odpadają. (ii) Zainfekowane łodygi, do wysokości 1,5 m od podstawy, są nabrzmięte (tzw. „gruby pęd”), a na zewnątrz może występować brązowienie i korkowacenie. W przeciwieństwie do więdnienia powodowanego przez gatunek z rodzaju *Fusarium* - sprawcę raka, zainfekowane łodygi nie rozwijają ograniczonych "zgrubień" u podstawy, a rośliny pozostają mocno przytwierdzone.



Rys.1. Żółknięcie i więdnienie liści powodowane przez *Verticillium*.



Rys. 2. Łagodna forma więdnienia powodowana przez *Verticillium*. Przeplatane się wzajemnie zainfekowane i zdrowe łodygi.

Łagodne więdnienie: Ta forma choroby występuje u wrażliwych odmian chmielu zainfekowanych mniej agresywnym szczepem patogena, lub u odmian tolerancyjnych zainfekowanych przez szczepy wysoce agresywne. Łagodne więdnienie różni się intensywnością z sezonu na sezon i rzadko powoduje zamieranie roślin. Rośliny zainfekowane w jednym sezonie mogą zatem wyglądać zdrowo w przyszłym sezonie. Porażone rośliny są zwykle rozproszone na plantacji chmielu, a występowanie choroby związane jest z nadmierną wilgotnością gleby. Pierwsze objawy pojawiają się na liściach pod koniec lipca lub na początku sierpnia i tylko niektóre z łodyg są wówczas porażone (rys. 2). Boczne pędy wyrastające z kątów porażonych liści często nie wykazują żadnych objawów. Zwykle występuje znaczne zgrubienie łodyg (rys. 2), a brązowienie wiązek przewodzących ograniczone jest do centrum (rys. 3).



Rys. 3. Przekrój poprzeczny i podłużny łodygi porażonej przez *Verticillium*. Brązowienie tkanki naczyniowej jest ograniczone do centrum, co jest typowe dla łagodnej postaci tej choroby.

Letalne więdnienie: Ta postać choroby występuje u wrażliwych odmian chmielu porażonych przez szczepy wysoce agresywne. W przeciwieństwie do łagodnej postaci, epidemia śmiertelna charakteryzuje się szerokim i szybkim zamieraniem liści i pędów bocznych (rys. 4) i w końcu prowadzi do śmierci całej karpki. Łodygi rzadko są nabrzmiałe i na wczesnym etapie choroby występuje brązowe zabarwienie całej tkanki naczyniowej (rys. 5). Porażone rośliny, które przetrwały zimę często wydają tylko kilka słabych łodyg w następnym sezonie, a i te wkrótce (początek czerwca) wykazują typowe objawy i zamierają. Rośliny, które zostały porażone w trakcie sezonu zwykle wykazują pierwsze objawy na etapie formowania szyszek. W ciągu 2-3 tygodni, wszystkie liście zamierają i zwykle opadają, podczas gdy szyszki utrzymują się i usychają z łodygami. Czynniki ekologiczne mają mniejszy wpływ na występowanie choroby, a jej rozprzestrzenianie na plantacjach chmielowych związane jest ze sposobem uprawy.



Rys. 4. Letalna forma więdnienia spowodowanego przez *Verticillium*. Masowe i szybkie zamieranie liści i pędów bocznych.



Rys. 5. Przekrój podłużny łodygi porażonej przez *Verticillium* (z lewej): brązowe zabarwienie całej tkanki, co jest typowe dla letalnej postaci tej choroby: Przekrój podłużny łodygi zdrowej rośliny (z prawej).

Wykrywanie w roślinach

Jako patogeny inwazyjne korzeni, *V. albo-atrum* i *V. dahliae* mogą być zlokalizowane w układzie naczyniowym korzeni i postępować ku wierzchołkowi rośliny. Przekroje poprzeczne łodyg często wykazują brązowienie tkanki, nawet wówczas, kiedy zewnętrzne objawy nie są jeszcze widoczne. Chmiel jest najczęściej rozmnażany przez sadzonki, które uzyskuje się z karpki chmielu podczas okresu spoczynkowego, jesienią lub wczesną wiosną. Zewnętrzne objawy choroby nie są widoczne na sadzonkach, więc przed rozmnażaniem najlepiej jest przeprowadzić inspekcje materiału matecznego oraz procedury diagnostyczne. Ze względu na dużą liczbę sadzonek wytwarzanych z chmielnika, możliwe jest tylko losowe pobieranie próbek (na Słowenii do 3%). Przekrój poprzeczny łodyg sadzonek może wykazywać brązowienie tkanki naczyniowej, które jest powodowane przez oba gatunki *Verticillium*. Podobne zabarwienie tkanek naczyniowych może powodować również *Gibberella pulicaris* (anamorfa *Fusarium sambucinum*), *Phytophthora citricola* lub *Pseudoperonospora humuli*. Dla potwierdzenia wymagana jest zatem izolacja grzybów i identyfikacja technikami molekularnymi. W przeciwieństwie do raka powodowanego przez *Fusarium*, nadziemne części roślin pozostają przytwierdzone, co oprócz widocznych objawów, jest użyteczną cechą diagnostyczną.

Wykrywanie w glebie

Badanie gleby w oparciu o metodę przesiewania na mokro lub na sucho może być stosowane w przypadku wykrywania *V. dahliae*, ale ze względu na to, że gatunek ten nie odgrywa ważnej roli w przypadku chmielu, metoda ta nie jest stosowana w odniesieniu do tej rośliny. W przypadku diagnozowania *V. albo-atrum* nie jest dostępna skuteczna metoda badania gleby. Dla obu gatunków opracowano testy PCR, ale jeszcze nie zostały one zwalidowane i zatwierdzone do praktycznego stosowania. Test oceny wirulencji przedstawiono w załączniku nr 1.

Identyfikacja

Izolacja

Izolację tych grzybów przeprowadza się na pożywkach półselektywnych (PLYA lub PDA; załącznik nr 2), które sprzyjają tworzeniu struktur spoczynkowych. Identyfikacja metodą hodowlaną trwa do 2 tygodni. Pobiera się fragment łodygi chmielu, około 10 cm długości, nieco powyżej poziomu gruntu. Następnie opala się w etanolu, a epidermę usuwa przy użyciu sterylnego skalpela. Ze środka łodygi wycina się fragment w kształcie klina i umieszcza na płytce Petriego zawierającej pożywkę półselektywną (zob. załącznik nr 2).

Procedurę powtarza się dla pozostałej części łodygi, tak, aby cały przekrój łodygi został wyłożony do izolacji. Grzyby mogą być zlokalizowane w obrębie łodygi, także może być konieczne pobranie kolejnej próbki dowolnego jej fragmentu. Szalki Petriego należy inkubować w ciemności, w temperaturze 20° C.

Morfologia

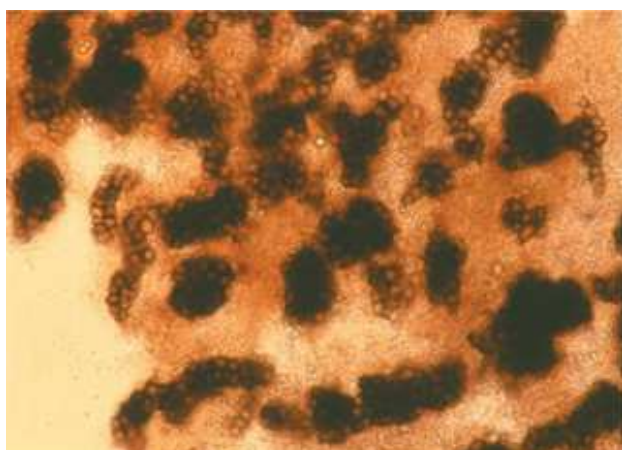
Po okresie 3-5 dni inkubacji pojawia się wzrost białej, puszystej grzybni *Verticillium*. Identyfikacja *Verticillium* wymaga obserwacji konidioforów (rys. 6) pod mikroskopem. Gatunki mogą być identyfikowane dzięki wytwarzanym struktrom spoczynkowym (po 1-2 tygodniach inkubacji), makroskopowo widoczne w postaci ciemnienia kultury (rys. 7); obserwacja kultur pod małym powiększeniem mikroskopu *in situ* lub w preparacie mikroskopowym powinna ujawnić charakter struktur spoczynkowych. Podstawowa identyfikacja gatunków zależy od charakteru struktur spoczynkowych. *V. dahliae* produkuje ciemne mikrosklerocja (rys. 8), podczas gdy *V. albo-atrum* może być rozróżniane na podstawie braku mikrosklerocjów i obecności ciemnej grzybni spoczynkowej (rys. 9). Izolatów uzyskanych z zainfekowanych tkanek, które wytwarzają ciemną grzybnię spoczynkową lub mikrosklerocja, raczej nie można pomylić z innymi grzybami, za wyjątkiem być może słabego patogena *V. tricorpus*. Tworzy on zarówno struktury spoczynkowe, jak i chlamydospory oraz obfity żółto-pomarańczowy pigment. Rodzaj *Verticillium* obejmuje trzy inne gatunki chorobotwórcze dla roślin; *V. nigrescens*, *V. nubilum* i *V. theobromae*, które są związane z innymi roślinami żywicielskimi. *V. theobromae* wywołuje głównie gnicie owoców bananów i jest rozpowszechniony tylko na obszarach tropikalnych. Tabela nr 1 zawiera opis chorobotwórczych dla roślin gatunków *Verticillium* (na podstawie- Opis grzybów i bakterii chorobotwórczych CMI nr 255 do 260).



Rys. 6. Okółkowe konidiofory *V. albo-atrum* (pow. 200×).



Rys. 7. Kultury *V. albo-atrum*. na pożywce PLYA



Rys. 8. Mikrosklerocja *Verticillium dahliae* (pow. 200×).



Rys. 9. Ciemna grzybnia spoczynkowa *V. albo-atrum* (pow. 200×).

Tabela nr 1. Morfologiczny opis gatunków *Verticillium* chorobotwórczych dla roślin.

	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>V. tricorpus</i> ^b	<i>V. nigrescens</i>	<i>V. nubilum</i>	<i>V. theobromae</i>
Grzybnia						
Kolor	szaro- czarna	czarna	złoto-czarna	brązowo-czarna	brązowo-czarna	szaro-brązowa
Hialinowe sektory	+	+	+	-	+	-
Grzybnia spoczynkowa (µm)	3-7	-	3.5-7	-	-	2-3.5
Mikrosklerocja (µm)	-	15-50(-100)	60-85	-	-	-
Chlamydospory (µm)	-	-	7.5-11	5.5-8(-10)	8.5-17	-
Konidiofory						
Kolor	hialinowy z czarną nabrzmiałą podstawą	hialinowy	hialinowy	hialinowy	hialinowy	hialinowy z brązową podstawą
Liczba fialid	2-4	3-5	3-4	1-3	1-3	3-6
Rozmiar fialid (µm)	20-30(-50)x1.4-3.2	16-35x1-2.5	12-25x2-3	20-35(-50)x1.5-3	25-35(-40)x1-2.5	14-37x1.5-5
Konidia						
Kształt i kolor	hialinowy, elipsoidalny do nieregularnego, prawie cylindryczny, jednokomórkowy rzadko z jedną przegrodą	hialinowy, elipsoidalny do nieregularnego, prawie cylindryczny, jednokomórkowy, rzadko z jedną przegrodą	hialinowy, elipsoidalny do nieregularnego, prawie cylindryczny, jednokomórkowy	hialinowy, elipsoidalny do nieregularnego, prawie cylindryczny, jednokomórkowy, czasami z jedną przegrodą	hialinowy, elipsoidalny do nieregularnego, prawie cylindryczny, jednokomórkowy, czasami z jedną przegrodą	hialinowy, elipsoidalny do nieregularnego, prawie cylindryczny, jednokomórkowy,
Rozmiar (µm)	3.5-10.5 (-12.5)x2-4	2.5-8x 1.4-3.2	3.5-10x1.5-3.5	4-8.5x1.5-2.5	4-10 (-12.5)x2.5-3.5	3-8x1.5-3
Roślina żywicielska (<i>Humulus lupulus</i>)	+	+	+	-	-	-
Patogeniczność	wysoka	wysoka	niska	niska	niska	niska
Saprofit glebowy	-	-	+	+	+	-

^a obecne (+); brak (-)

^b kolonie *V. tricorpus*, kiedy stają się widoczne (zwykle po tygodniu) wykazują typowe żółknięcie kultur, czego nie obserwuje się w przypadku *V. albo-atrum* i *V. dahliae*, u których powinna się tworzyć spoczynkowa grzybnia i mikrosklerocja.

^c opis kultur rosnących na PDA (agar glukozowo-ziemniaczany) w temperaturze 20°C, przez 2-3 tygodnie

Makroskopowo, oba główne gatunki są zmienne w kulturze i często tworzą zróżnicowane strefy wzrostu tzw. sektory. Kultury mogą być utrzymane przez wielokrotne przeszczepianie na pożywki PLYA lub PDA, ale może prowadzić to do utraty cech diagnostycznych struktur spoczynkowych (formy hialinowe). W przypadku braku kultury o jasno określonych i stabilnych cechach, identyfikację należy przeprowadzić techniką molekularną (przy zastosowaniu specyficznych starterów i / lub rRNA sekwencji ITS).

Kultury najlepiej przechowywać w postaci zawiesiny zarodników w 20% glicerolu (najlepiej na 3 mm kulkach ceramicznych, co ułatwia odzysk) w bardzo niskich temperaturach. Pomyłka z grzybami *Gliocladium* lub *Trichoderma* jest mało prawdopodobna.

Metody molekularne

Carder i wsp., (1994) opracowali protokół PCR ze starterami specyficznymi do identyfikacji *V. albo-atrum* i *V. dahliae* w czystych kulturach (załącznik nr 3). Startery 2/3 amplifikują izolaty *V. albo-atrum* uzyskane ze wszystkich roślin żywicielskich, za wyjątkiem lucerny (alfalfa); izolaty uzyskane z tego gospodarza (izolat L) są molekularnie i patogenicznie różne od izolatów uzyskanych z innych roślin żywicielskich (izolaty NL). Startery 2/3 nie amplifikują izolatów *V. dahliae* lub *V. tricorpus*. Startery 19/22 amplifikują wszystkie testowane izolaty *V. dahliae*; nie amplifikują izolatów *V. albo-atrum* lub *V. tricorpus*. Startery "uniwersalne" ITS1 i ITS4 (które amplifikują fragment rybosomalnego RNA kodującego sekwencję rozdziającą geny białek rybosomalnych) (White i wsp., 1990) powinny być wykorzystane do testowania jakości ekstraktów DNA. Dodatkowo, jeśli sekwencjonowano amplikony przy użyciu standardowych procedur, uzyskane z tymi starterami, mogą być stosowane nie tylko do identyfikacji *V. albo-atrum* i *V. dahliae*, ale także innych gatunków *Verticillium*. Porównanie uzyskanych sekwencji z sekwencjami referencyjnymi (akcesja nr: AF364015 dla *V. albo-atrum*; AY555948 dla *V. dahliae*; AY555962 dla *V. tricorpus*; AY555956 dla *V. nigrescens*; AY935948 dla *V. nubilum*; AY935947 dla *V. theobromae*) w Banku Genów (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) jest niezbędne do jednoznacznej identyfikacji.

Specyficzne startery (załącznik nr 3) zostały opracowane na podstawie analizy AFLP (Radišek i wsp., 2003, 2004) do identyfikacji wysoce zjadliwego genotypu PG2 (patotyp PV1) ze Słowenii.

DNA grzybowe powinno być wyizolowane z grzybni pobranej ze stałego (PDA, PLYA) lub płynnego podłoża (agar odżywczy – Potato Dextrose Broth), metodą Lee & Taylor (1990) z dodecylsiarczanem sodu (SDS) lub przy użyciu innych odpowiednich metod, w tym standardowych zestawów komercyjnych, w oparciu o protokoły dla grzybów strzępkowych.

Kultury referencyjne

CABI, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY, UK

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Uppsalalaan 8, 3584, CT Utrecht, Holandia.

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji przedstawiono w standardzie EPPO PM 7/77 (1) *Sprawozdawczość i dokumentowanie wyników badań*.

Informacje dodatkowe

Więcej informacji o tym organizmie można uzyskać od:
(zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))

Dr G. Down, Disease Management, Horticulture Research International, East Malling, West Malling, Kent ME19 6BJ, UK.

Dr D. Barbara, Sustainable Disease Resistance, Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick, CV35 9EF, UK.

Dr. S. Radišek, Slovenian Institute for Hop Research and Brewing, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenia

Podziękowania

Protokół ten został opracowany przez: (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))
Dr G. Down, Disease Management, Horticulture Research International, East Malling, West Malling, Kent (GB); Dr D. Barbara, Sustainable Disease Resistance, Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick (GB) and Dr. S. Radišek, Slovenian Institute for Hop Research and Brewing, Žalec (SI).

Materiały źródłowe (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))

- Boyle JS & Lew AM (1995) An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics* **11**, 8.
- Carder JH, Morton A, Tabrett AM & Barbara DJ (1994) Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Verticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts. In: *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification* (Ed. Schots A, Dewey FM & Oliver R), pp. 91–97. CAB International, Oxford (GB).
- Clarkson JM & Heale JB (1985) Pathogenicity and colonization studies on wild-type and auxotrophic isolates of *Verticillium albo-atrum* from hop. *Plant Pathology* **34**, 119–128.
- Karapapa VK, Bainbridge BW & Heale JB (1997) Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research* **101**, 1281–1294.
- Lee SB & Taylor JW (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: *PCR Protocols. A Guide to methods and applications* (Ed. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky DH, White JJ & Eds TJ), pp. 282–287. Academic Press, San Diego (US).
- Neve RA (1991) *Hops*. Chapman and Hall, London (GB).
- Radišek S, Jakje J & Javornik B (2004) Development of pathotype specific SCAR markers for the detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Disease* **88**, 1115–1122.
- Radišek S, Jakje J & Javornik B (2006) Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology* **116**, 301–314.
- Radišek S, Jakje J, Simoniii A & Javornik B (2003) Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. *Plant Disease* **87**, 633–638.
- Robb J, Moukhamedov R, Hu X, Platt HW & Nazar RN (1993) Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **43**, 423–436.
- Sewell GWF & Wilson JF (1984) The nature and distribution of *Verticillium albo-atrum* strains highly pathogenic to the hop. *Plant Pathology* **33** (1), 39–51.
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application* (Ed. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp. 315 – 322. Academic Press, San Diego (US).
- Zinkernagel V (1982) [On the development of *Verticillium* spp. in susceptible and tolerant

hop varieties after natural and artificial infection]. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **89**, 205–218 (in German).

Załącznik 1.

Ocena wirulencji

Ocena wirulencji jest wykonywana poprzez sztuczną inokulację odmian roślin chmielu o znanej odporności (tolerancji). Testy te są ważne w przypadku nowych ognisk choroby, w celu ustalenia odpowiedniej strategii zwalczania. Jako metodę inokulacji można wykorzystać zanurzenie korzeni w zawiesinie zarodników konidialnych lub zakażenie gleby porażonymi źdźbłami lub łodygami chmielu (Clarkson & Heale, 1985). Rośliny mogą być oceniane pod kątem widocznych objawów w ciągu całego okresu wegetacyjnego. Infekcje muszą być potwierdzone przez ponowną izolację patogena. W celu uniknięcia różnic w warunkach środowiskowych, badanie wirulencji powinno być wykonywane w komorze wzrostowej lub w szklarni. Dla celów standaryzacji, należy stosować nomenklaturę patotypów izolatów *V. albo-atrum*, która powstała w Anglii (Sewell & Wilson, 1984; Clarkson & Heale, 1985):

M: Izolaty, które powodują łagodne wędnięcie na podatnej odmianie Fuggle.

PV1: Izolaty, które powodują letalne wędnięcie na podatnej odmianie Fuggle.

PV2: Izolaty, które powodują letalne wędnięcie na umiarkowanie tolerancyjnej odmianie Wye Challenger i

PV3: Izolaty, które powodują letalne wędnięcie na tolerancyjnej odmianie Wye Target.

Testy w odniesieniu do opisywanego badania wirulencji i hodowli nowych odmian odpornych chmielu są prowadzone przez Horticulture Research International, East Malling, England (HRI) i Slovenian Institute for Hop Research and Brewing, Slovenia. Ponadto, dla genotypu PG2 (patotyp PV1) ze Słowenii została opracowana szybka charakterystyka wirulencji izolatów chmielowych *V. albo-atrum*, z zastosowaniem testu PCR i specyficznych starterów (Radišek i wsp., 2004).

Załącznik 2.

Przygotowanie agaru śliwkowego z laktozą i ekstraktem z drożdży (PLYA)

Składniki: 100ml skoncentrowanego ekstraktu śliwkowego; 5g laktozy, 1g wyciągu z drożdży (Difco), 20g agaru (Oxoid nr 3), 900ml wody destylowanej. Przygotowanie ekstraktu z suszonych śliwek wymaga: 50g śliwek, 1000ml wody destylowanej. Wypestkowane śliwki, należy gotować przez godzinę w garnku z pokrywką, przecedzić przez muślin, przefiltrować i zawiesić w 100 lub 200ml wody. W celu przechowywania, pożywka powinna być poddana sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20min. Można również zakupić w supermarketach gotowy do spożycia sok śliwkowy, który rozcieńcza się z wodą w stosunku 1:4, w celu przechowywania dodatkowo wysterylizować w autoklawie).

Aby przygotować PLYA, należy dodać 100ml ekstraktu z suszonych śliwek do wody destylowanej w zlewce, a następnie pozostałe składniki i wymieszać. Podgrzać w kuchence mikrofalowej przez 5 min. mieszając i kontynuować aż do rozpuszczenia agaru. Przed wylaniem na płytki wysterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min. w odpowiednich pojemnikach.

Przygotowanie agaru glukozowo-ziemniaczanego (PDA)

Składniki: 300g ziemniaków pokrojonych w kostkę; 20g glukozy; 15g agaru ; 1000ml wody destylowanej. Aby przygotować pożywkę, drobno pokrojone w kostkę ziemniaki ugotować w 500 ml wody destylowanej, przefiltrować przez gazę i uzupełnić wodą destylowaną do 1000 ml. Rozpuścić w przesączu agar i glukozę i sterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min. W handlu dostępna jest również gotowa pożywka PDA.

Załącznik 3.

Identyfikacja przy użyciu PCR i starterów specyficznych

Amplifikacja i analiza: mieszanina reakcyjna (20µl) powinna zawierać 1µl 10µM każdego ze starterów (tabela nr 2); 0,12µl 5 U µl⁻¹ *Taq* DNA polimerazy (Promega); 2µl 10X buforu PCR (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0,1% Triton[®]X-100, pH 9,0) (Promega); 1,2µl 25 mM MgCl₂; 1,6µl 2,5mM dNTP (Sigma); 2µl 10 ng µl⁻¹ grzybowego ekstraktu DNA i 11,08µl sterylnej wody do biologii molekularnej w celu uzyskania końcowej objętości 20µl. Amplifikację przeprowadza się w termocyklerze w następujących warunkach: 4 min w temperaturze 94°C, a następnie 30 cykli z profilem temperatur: 45s w 94°C, 30s w temperaturze przyłączania (tabela nr 2) i 60s w temperaturze 72°C. Po amplifikacji, mieszaninę reakcyjną rozdziela się elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w 0,5 x TBE buforze barwionym bromkiem etydy. Reakcja PCR powinna zawierać następujące kontrole: negatywną (woda wolna od RNA i DNA) i pozytywną (20ng DNA wyizolowane ze szczepu odniesienia patogena). Próbkę powinny być uznane za pozytywne na *V. albo-atrum* lub *V. dahliae* jeśli produktem amplifikacji jest pojedynczy prążek odpowiedniej wielkości (tabela nr 2).

Aby wykazać, że każda próbka jest potencjalnie amplifikowana w reakcji PCR, powinien być przeprowadzony kontrolny PCR (jak opisano powyżej), ze starterami uniwersalnymi ITS1 i ITS4 (tabela nr 2), zamiast starterów specyficznych. Należy stosować następujące warunki reakcji: 2 minuty w temperaturze 94°C, a następnie 30 cykli, 1min w 94°C, 1min w temperaturze 55°C i 1,5 min. w temp.72°C, a następnie 10 min. w temp. 72°C. Amplifikacja z tymi starterami potwierdza, że testowane DNA jest dobrej jakości, nadaje się do amplifikacji i kontrole negatywne na *V. albo-atrum* lub *V. dahliae* dały wyniki negatywne. Jednakże, jeśli amplifikacja nie nastąpiła, to należy DNA ponownie wyizolować i przetestować.

Tabela nr 2. Kombinacja starterów przeznaczonych do molekularnej identyfikacji izolatów *V. albo-atrum* i *V. dahliae*

Startery	Sekwencja starterów (5'-3')	Specyficzność	Wielkość produktu	Ta (° C)
2	ATGGACCGAACAGCTAGGTA	izolaty <i>V. albo-atrum</i> nie występujące na lucernie (NL grupa)	300 bp	54
3	TCTCAGATATATGCTGCTGC			
19	CGGTGACATAAATACTGAGAG	<i>V. dahliae</i>	580 bp	54
22	GACGATGCGGATTGAACGAA			
9-1E-For	GGTAAGACTCCTTACCGATGCTG	<i>V. albo-atrum</i> (patotyp PV1 na chmielu, genotyp PG2)	248 bp	59
9-1E-Rev	ATTCACACGCTACATATCAAACA			
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Grzybowe rybosomalne DNA (ITS1, 5.8 rDNA, ITS2)	różnie	55
ITS4	TCTCCGCTTATTGATATGC			

Identyfikacja poprzez sekwencjonowanie regionów ITS

Tożsamość obu gatunków *Verticillium* można potwierdzić przez sekwencjonowanie regionu ITS. Amplifikacja i analiza: Mieszanina reakcyjna (100µl) powinna zawierać: 5µl 10µM

każdego ze starterów (tabela nr 2); 0,6µl 5 U µl⁻¹ *Taq* DNA polimerazy (Promega); 10µl 10X buforu PCR (10mM Tris- HCl, 50mM KCl, 0,1% Triton[®]X-100, pH 9,0) (Promega); 6µl 25mM MgCl₂; 8µl 2,5mM dNTP (Sigma); 5µl 10ng µl⁻¹ grzybowego ekstraktu DNA i 60,4µl sterylnej wody do biologii molekularnej w celu uzyskania końcowej objętości 100µl. Amplifikację przeprowadza się w termocyklerze w następujących warunkach: 2 min. w 94°C, a następnie 30 cykli przy profilu temperatury: 1min w 94°C, 1min w temp. 55°C i 1,5 min. w temp. 72°C. Po 30 cyklach musi być przeprowadzony jeden cykl dodatkowo przez 10 minut w temperaturze 72°C. Próbki (10µl) rozdziela się na 1,5% żelu agarozowym, w sposób opisany powyżej .

Sekwencjonowanie amplikonów: pozostałe 90µl, uzyskane w reakcji oczyszcza się, stosując protokół Boyle i Lew (1995) lub komercyjne zestawy do oczyszczania produktów PCR. Próbki powinny być poddane dwukierunkowemu sekwencjonowaniu ze starterem ITS1(forward) i starterem ITS4 (revers). Uzyskane sekwencje porównuje się z sekwencjami referencyjnymi umieszczonymi w Banku Genów.

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Anna Wiśniewska	Grażyna Szkuta	Janina Butrymowicz