

INTERAKCIJA NAVADNEGA HMELJA (*Humulus lupulus* L.) IN GLIVE *Verticillium nonalfalfae*

Lucija LUSKAR¹, Jernej JAKŠE² in Andreja ČERENAK³

Pregledni članek / Review article

Prispelo / Received: 25. 10. 2022

Sprejeto / Accepted: 17. 11. 2022

Izvleček

Verticilijska uvelost hmelja je bolezen, ki se manifestira v interakciji med fitopatogenimi glivami iz rodu *Verticillium* sensu stricto (*V. dahliae* in *V. nonalfalfae*) in občutljivimi kultivarji hmelja. Interakcija je v glavni meri odvisna od patogenosti glive in stopnje občutljivosti oz. odpornosti hmelja. Letalno obliko bolezni povzroča *V. nonalfalfae*, patotip PG2, ki povzroči razvoj hudih simptomov, kot so kloroze, nekroze, venenje in hitro odmiranje tkiva, rastlina pa v celoti propade v isti ali naslednji sezoni. Prehod glive v prevajalni sistem rastline povzroči zamašitev prevodnega sistema in s tem venenje rastline. Odziv odpornih kultivarjev in občutljivih kultivarjev je pokazal, da imajo občutljivi kultivarji hitrejša in močnejša obrambna mehanizma, kot so tvorba tiloz in nalaganje lignina ter suberina na stenah ksilema, ki vodijo v razvoj simptomov. Ob okužbi pride pri hmelju do povečanega izražanja encimov, ki razgrajujejo in odstranjujejo glivne hife. Ekspresijske študije nakazujejo na povečano izražanje genov, vpletenih v biosintezo kutina pri odpornem kultivarju, poleg tega pa ima pri ekspresiji pomembno vlogo tudi RNA interferenca. Ne glede na poznavanje mnogih glivnih efektorjev in njihovih receptorjev, pa še do danes mehanizem odpornosti ni dokončno raziskan.

Ključne besede: verticilijska uvelost hmelja, hmelj, gliva verticilij, odpornost, žlahtnjenje

¹ Mag. biotehol., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: lucija.luskar@ihps.si

² Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, e-naslov: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

³ Izr. prof. dr., IHPS, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

INTERACTION OF HOP (*Humulus lupulus* L.) AND *Verticillium nonalfalfae*

Abstract

Verticillium wilting of hops is a disease, manifested in the interaction between phytopathogenic fungus from genus *Verticillium* sensu stricto (*V. dahliae* in *V. nonalfalfae*) and susceptible hop cultivars. Interaction outcome is mostly depended on pathogenicity of the fungi and level of susception or resistance of hop. Lethal type of disease is caused by *V. nonalfalfae*, pathotype PG2, that induce development of severe symptoms, such as chlorosis, necrosis, wilting and plant tissue death, consequently the plant dies in the same season or in the next. The shift of fungi into the phloem results in clogging and wilting. Response studies of resistant and susceptible cultivars revealed faster and stronger defence mechanisms in susceptible cultivars, such as tylose formation, accumulation of lignin and suberin on xylem walls, mechanisms that lead to development of symptoms. Infection of hop is linked with expression of enzymes that degrade fungal hyphae. Expression studies indicate enhanced expression of genes, involved in biosynthesis of cutin in resistant cultivar and also importance of RNA interference. Despite knowing many fungal effectors and plant receptors, mechanism of hop resistance is not fully understood.

Key words: verticillium wilting of hops, hop, verticillium, resistance, breeding

1 UVOD

Rastline so se na našem planetu razvile kasneje od gliv, zato so interakcije med glivami in rastlinami stare toliko, kot so stare rastline same (Humphreys in sod., 2010). V grobem ločimo štiri glavne tipe interakcij: mutualistične, komenzalistične, neutralistične in parazitske. Rastlinski receptorji in z obrambo povezani proteini, ki interagirajo z glivnimi molekulami, lahko odločajo o izidu interakcije med dvema organizmoma (Zeilinger in sod., 2015). Veliko interakcij med glivo in rastlino je mutualističnih. Takšna interakcija stimulira rast rastlin in razvoj; ker gliva rastlini omogoča boljši privzem hranil in vode iz tal in ji pomaga pri toleranci na stres, rastlina pa v zameno glivi dovaja sladkorje (Buscot in sod., 2000). Medtem ko koristne interakcije nudijo stabilnost obema partnerjema, so škodljive interakcije evolucijski pritisk tako za patogene kot za rastlino (Jones in Dang, 2006).

Med glivami iz rodu *Verticillium* sensu stricto, ki parazitirajo rastline, verticilijsko uvelost hmelja povzročata predvsem *Verticillium dahliae* in *Verticillium nonalfalfae*. Slednja spada med vretenaste glive in je tipična zemeljska hemibiotrofna gliva, ki lahko prezimi v tleh, na obolelih rastlinah in v koreninah kot trajni micelij. Hife ali konidiji najdejo pot v prevajalni sistem skozi zdrave ali poškodovane mlade korenine. Po naselitvi korenin micelij nadaljuje pot v prevajalnem sistemu, kjer se začne močno razmnoževati in tvori konidije, ki se s sokom vred prenašajo po rastlini (Fradin in Thomma, 2006; Radišek in sod., 2004).

Pomembnejši gostitelji glive so krompir, špinaca, petunija ter, glede na patofiziologijo in potek okužb najpomembnejši, hmelj (Inderbitzin in sod., 2011; Kasson in sod., 2014; Snyder in sod., 2014). Ker je hmelj trajnica, lahko *V. nonalfalfae* povzroči popolno uničenje nasada in posledično ogromno gospodarsko škodo (Pegg, 1984; Klosterman, 2009).

Lažja oblika verticilijske uvelosti se je na hmelju pojavila leta 1924 v Angliji (Harris, 1927), leta 1933 pa v težji oz. letalni obliki. Leta 1955 se je bolezen prvič pojavila v Sloveniji, v večjem obsegu pa leta 1974 na kultivarju Aurora. Leta 1977 se je zaradi okužbe pojavila večja gospodarska škoda. Sprva je bilo ugotovljeno, da imajo angleški in slovenski visoko virulentni izolati najverjetneje različen izvor in so se verjetno razvili iz manj virulentnih patotipov, ki so že dolgo prisotni v hmeljiščih, a so bili zaradi blagih bolezenskih znakov neopazni in gospodarsko manj pomembni (Mandelc in sod., 2009).

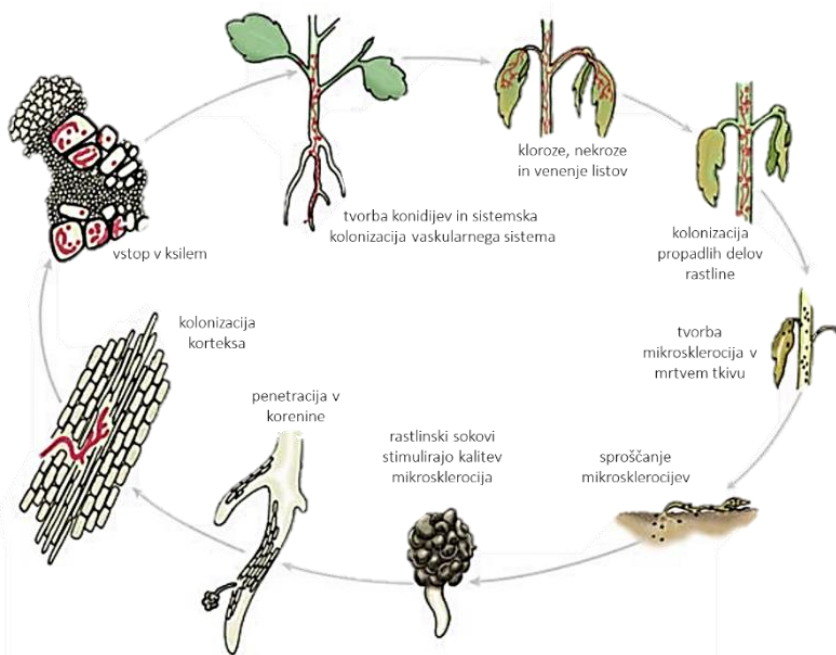
V Sloveniji verticilijsko uvelost hmelja povzročata dva patotipa glive *V. nonalfalfae*: patotip PG1, ki povzroča blago obliko bolezni, in patotip PG2, ki povzroča letalno obliko bolezni. Hmelj je primarni gostitelj slovenskih PG1 in PG2 patotipov (Radišek in sod., 2003). Razlika med blago in letalno obliko je, da se simptomi pri blagi obliki pojavijo kasneje v rastni sezoni, obolele rastline pa začnejo odebeljevati trte od spodaj navzgor, zaradi česar začne skorja pokati in postane hrapava, prevajalno tkivo postane rjavo. Listi porumenijo, robovi listov se obrnejo navzgor in ob dotiku odpadejo. Pri blagi obliki, za razliko od letalne, se obolele rastline posušijo, naslednje leto pa normalno rastejo naprej. Trte se pri letalni obliki običajno ne debelijo. Visoko virulentni patotip glive pri občutljivih rastlinah povzroči, da v nekaj mesecih po okužbi razvijejo hude simptome, kot so kloroze, nekroze in hitro odmiranje tkiva. Pri letalni obliki občutljive rastline odmrejo preko zime ali v naslednji rastni dobi (Talboys, 1987; Neve, 1991; Dolinar in Simončič, 1999; Radišek in sod., 2006).

Od prvega izbruha leta 1997 je bilo v 6 letih odkritih več kot 180 ha okuženih površin, od katerih jih je bila več kot polovica eradikiranih (Radišek in sod., 2004). Eradikacija in strogi ukrepi so bolezen zajezili, še vedno pa povzroča veliko škodo na že okuženih območjih, v hmeljiščih z zelo občutljivimi kultivarji. V članku so predstavljene dosedanje študije s področja interakcije med glivo *V. nonalfalfae* in različnimi kultivarji hmelja.

2 ŽIVLJENJSKI CIKEL GLIV IZ RODU *VERTICILLIUM* SENSU STRICTO

Gliva *V. nonalfalfae* je patogen prevajalnega sistema rastlin in živi v ksilemu gostitelja (Pegg in Brady, 2002). Življenjski cikel gliv *Verticillium* sensu stricto, vključno z glivo *V. nonalfalfae*, delimo v tri faze, dormantno, parazitsko in

saprofitsko (Fradin in Thomma, 2006). V času neugodnih razmer je *V. nonalfalfae* v dormantni fazi v obliki melaniziranega micelija (trajni micelij), ki ji omogoča preživeti v tleh več let. Ob zaznavi rastlinskih eksudatov nastopi parazitska faza življenjskega cikla glive, v kateri se začne trajni micelij razraščati in tvoriti hife. Razvoj bolezni pospešijo mokra in nepropustna tla ter pretirano gnojenje z dušikom (Keyworth in Hewitt, 1948). V ksilemu iz hif poganjajo konidiofori, na katerih se razvijejo fialide s številnimi konidiji. Konidiji potujejo po rastlini navzgor s transpiracijskim tokom ter vzklijejo v micelij na delih, kjer so žile manj prehodne in zadržijo konidije (Sewell and Wilson, 1964). Najtežji del širjenja glive je prodiranje glive v prevajalni sistem in traja dalj časa, razmnoževanje v prevajalnem sistemu in širjenje po njem pa je hitro.



Slika 1: Življenjski cikel fitopatogenih gliv iz rodu *Verticillium sensu stricto* (povzeto po Berlanger in Powelson, 2000).

V času kolonizacije lahko gliva izraža in izloča hidrolitične encime, ki so vpleteni v degradacijo rastlinske celične stene, kar ji dodatno olajša razširjenje (Chen in sod., 2016; Fradin in Thomma, 2006). Z razraščanjem glive po rastlini se krepijo simptomi okužbe in venenje rastline, do končnega propada rastline. Na tej stopnji se prične saprofitska faza, ko ob propadu rastline gliva naseli celotno rastlino (Talboys, 1958a, 1972). Med saprofitsko fazo gliva ponovno tvori trajne organe, ki ji bodo omogočili preživetje ter s tem sklene življenjski cikel (Fradin in Thomma, 2006; Radišek in sod., 2004).

3 SPLOŠEN RASTLINSKI IMUNSKI ODZIV

Prvo oz. fizično bariero med rastlino in patogenom predstavljata kutikula in epitelij, ki zagotavljata konstitutivno obrambo. V primeru, da patogen prodre v rastlino, imajo rastline sistem, ki zaznava patogene in ga imenujemo inducirana obramba (Doughari, 2015). V obrambi rastline spremenijo osnovne fiziološke procese, kot so dihanje, fotosinteza, translokacija nutrientov, transpiracija, rast in razvoj (Zeilinger in sod., 2016).

Rastline so sposobne zaznavati molekularne vzorce določenega patogena ali njegove efektorske molekule. Z vzorci izzvana imunost (PTI, angl. *pattern-triggered immunity*) se sproži, ko receptorji za prepoznavanje vzorcev (PRR, angl. *pattern recognition receptors*) zaznajo molekularne vzorce oz. molekule (PAMP, angl. *microbial oz. pathogen-associated molecular patterns*) (Gust in sod., 2017). Glivni molekularni vzorci so običajno kompleksni ogljikovi hidrati v celični steni, kot so hitin, beta glukani, galaktoglukomanani in drugi (De Wit in sod., 2009). Posledično pride do sinteze salicilne kisline, jasmonske kisline in etilena, oksidativnega izbruha, proizvodnje protimikrobnih snovi, nalaganja kaloze ob plazmodezme in zmanjšanega prenosa snovi iz citosola v apoplast (Bigeard in sod., 2015). Tekom evolucije so patogeni razvili različne načine, da bi se izognili PTI. Z efekorskimi molekulami ga lahko zatrejo, obidejo s toksičnimi efektorji ali pa razgradijo produkte obrambnih signalov. Rastline so v odgovor razvile z efektorji izzvano imunost (ETI, angl. *effector-triggered immunity*), pri kateri imajo vlogo proteini R (Anderson in sod., 2010). Pri rastlinah so najbolj poznani nukleotid vezavni LRR (ang. *leucine-rich repeat*, z leucinom bogata ponovitev) proteini, ki zaznavajo efektorske molekule ali pa modifikacije ključnih rastlinskih proteinov (Dangl in Jones, 2001; Gao in sod., 2018). Posledično pride do preobčutljivostnega odziva, ki se izraža v obliki lokalizirane programirane celične smrti, sinteze salicilne kisline in oksidativnega izbruha, ki prepreči širjenje škodljivca po rastlini (Wu in sod., 2014). Na ETI nivoju lahko govorimo o konstantni evolucijski tekmi med gostiteljem in patogenom, pri čemer gostitelj razvija in prilagaja receptorje za prepoznavo patogenov, na drugi strani pa patogen razvija nove strategije, kako zaobiti obrambne mehanizme gostitelja (Dodds in Rathjen, 2010; Jones in Dangl, 2006). Del PTI in ETI odgovora so tudi majhne RNA molekule (angl. *small RNA*; sRNA), ki so odgovorne za regulacijo odgovorov na abiotični in biotični stres. Najbolje opisan razred rastlinskih sRNA so miRNA (angl. *micro RNA*), ki lahko prispevajo k obrambi pred patogenom, in sicer z vplivom na izražanje obrambnih, s patogenozo povezanih proteinov (Zhang in sod., 2011; Yang L. in sod., 2013).

4 ODZIV HMELJA NA OKUŽBO Z GLIVO *V. NONALFALFAE*

4.1 Fizična obramba pred vstopom glive v ksilem

Rastline se na glive rodu *Verticillium* sensu stricto odzovejo na dveh temeljnih ravneh - s fizično zamejitvijo glive v ksilemu ter nato z njeno kemično odstranitvijo ali inhibicijo (Pegg in Brady, 2002; Yadeta in Thomma, 2013). Prvo bariero glivi predstavljata epidermalno in endodermalno tkivo, ki sta običajno zaščiteni s plastjo lignina, suberina in kutina (Talboys, 1958a; Yadeta in Thomma, 2013). Ko hife prodrejo med epidermalne celice koreninskega tkiva ter gliva vstopi v ksilemsko tkivo, se fizično omejevanje nadaljuje z mašenjem ksilemskih žil s tvorbo tiloz (mehurčkasti izrastki parenhimskih celic, ki se lahko razširijo v lumen ksilema), z nalaganjem kaloze in lignina na ksilemskih stenah, ter želiranjem ksilemskega soka (Talboys, 1958b; Pegg in Brady, 2002). Z vstopom v prevajalni sistem, prične gliva tvoriti konidiospore, ki se pasivno razširijo iz korenin v stebela s tokom ksilemskega soka v prevajalnem tkivu (Yadeta in Thomma, 2013). Omejevanje kolonizacije v odpornem in občutljivem kultivarju hmelja v času okužbe z *V. nonalfalfae* je začel preučeval Talboys (1958b). Občutljivi kultivarji hmelja ob okužbi z glivo *V. nonalfalfae* sprožijo tvorbo tiloz in snovi za utrjevanje celičnih sten prevajalnega tkiva, medtem ko so bili ti procesi pri odpornih kultivarjih manj intenzivni in zakasneli (Cregeen in sod., 2015; Talboys, 1958a, c). Talboys (1958b) je ugotovil, da je nalaganje lignina na stene epidermalnih celic koreninskega tkiva v stiku z glivo splošni odziv na okužbo z *V. nonalfalfae*, s čimer rastline hmelja otežijo penetracijo hif v prevajalno tkivo. Opazil je, da je ta proces bolj intenziven v občutljivem v primerjavi z odpornim kultivarjem hmelja (Wye Challenger), kjer pa je zaznal intenzivnejše nalaganje suberina v endodermalni plasti, kar bi lahko učinkoviteje omejilo vstop hif v ksilem. Tak fizični odziv lahko vodi v popolno zatesnitev ksilemskih žil in s tem prispeva k venenju in zmanjšani vitalnosti hmelja, vendar pa lahko rastline sprožijo diferenciacijo novega ksilemskega tkiva iz kambija (Fradin in Thomma, 2006; Talboys, 1958a). Pri drugem odpornem kultivarju (Wye Target), ki ga je preučevala Cregeen in sod. (2015), pa ni prišlo do nalaganja suberina, kar je verjetno posledica različnih virov odpornosti (Neve, 1991; Darby, 2001). Razlika med neodpornimi in odpornimi gostiteljskimi rastlinami se kaže v skorajšnji ali popolni odsotnosti kolonizacije ksilema pri odpornih rastlinah, medtem ko do okužbe korteksa pride tako pri neodpornih kot pri odpornih rastlinah (Pegg in Brady, 2002). Že Keyworth (1953) je predpostavil, da igrajo pri odpornosti ključno vlogo obrambni procesi v koreninah, ki preprečijo oziroma omejijo vstop glive v ksilem rastline, kar je dokazal na dva načina. Pri okuževanju stebel neodpornega kultivarja hmelja (Fuggle) z glivo *V. nonalfalfae* je opazil povezavo med količino inokuluma in intenzivnostjo bolezenskih znamenj – ob injiciranju manj koncentrirane suspenzije spor so bili simptomi milejši, kot ob injiciranju bolj koncentrirane suspenzije spor. Nato je v poskusu s cepljenjem stebel neodpornega kultivarja hmelja (Fuggle) na korenine odpornega (OR55, vir odpornosti Y 90) in obratno pokazal, da

so v tem primeru bolezenska znamenja intenzivnejša v steblu odpornega kultivarja (s koreninami neodpornega), kot v steblu neodpornega kultivarja (s koreninami odpornega), kar naj bi odražalo različno količino inokuluma, ki doseže stebela skozi koreninski sistem odpornega oz. neodpornega kultivarja (Keyworth, 1953). Tranzicijo glive iz korenin v stebela so pri občutljivem kultivarju za podlagi glivne DNA zaznali 12 dni po inokulaciji (dpi), medtem ko so pri odpornem kultivarju zaznali nizke količine glivne DNA v vseh točkah vzorčenja (1, 3, 6, 12, 15, 18 in 30 dpi) (Kunej in sod., 2020).

4.2 Kemični obrambni mehanizmi

Kemični obrambni mehanizmi vključujejo inhibicijo rasti glive in razgradnjo hif s številnimi snovmi s protimikrobnim delovanjem, kot so s patogenezo povezani proteini, fitoaleksini in fenolne snovi (Benhamou, 1995; Daayf in sod., 1997). Sinteza in sproščanje teh snovi spada med splošne odzive rastline na okužbo in je značilna tako za odporne kot za neodporne rastline (Pegg in Brady, 2002). Ob okužbi z *V. nonalfalfae* je značilno povečano izražanje peroksidaz, hitinaz in β -glukanaz, ki igrajo pomembno vlogo pri odstranjevanju glivnih hif iz prevajalnih tkiv (Mandelc in sod., 2013). Fenoli so pri rastlinah prisotni tekom rasti, kjer delujejo kot signalne molekule in modulatorji. Pomembno vlogo pa igrajo tudi pri odzivu na okužbo, kjer pride do sinteze dodatnih fenolov (Cheynier in sod., 2013). Berne in sod. (2020) niso ugotovili korelacije med konstitutivno vsebnostjo fenolov pri različnih kultivarjih hmelja in odpornostjo na *V. nonalfalfae*, so pa ugotovili, da ima odporen kultivar Wye Target v koreninah signifikantno več fenolov v fazi pred cvetenjem, kar bi mu lahko pomagalo pri preprečevanju okužb. Kunej in sod. (2020) so opazovali prisotnost različnih fenolnih skupin v koreninah in steblih odpornega in občutljivega kultivarja hmelja okuženih in neokuženih rastlin in opazili povečane koncentracije flavanolor 3 dpi v koreninah okuženih rastlinah odpornega kultivarja, kar lahko vpliva na preprečevanje nadaljnje infekcije.

4.3 Odziv na nivoju ekspresije

Da imajo neodporni kultivarji močnejši splošen odziv na okužbo so s proteomskimi in transkriptomskimi študijami ugotovili različni raziskovalci raziskovalne skupine na Biotehniški fakulteti v Ljubljani (Mandelc in sod., 2013; Cregeen in sod., 2015; Progar, 2017). Zaradi močnejšega splošnega odziva pri neodpornem kultivarju verjetno pride do zamašitve prevajalnega tkiva. Mandelc in sod. (2013) so pri primerjalnem proteomskem profiliranju korenin odpornega (Wye Target) in neodpornega (Celeia) kultivarja, okuženih z visoko virulentnim patotipom glive, ugotovili, da se v koreninah neodpornih rastlin ob okužbi inducirajo številni obrambni proteini, med njimi hitinaze, β -glukanaze in peroksidaze, medtem ko ob okužbi odpornih rastlin ne pride do večjih sprememb v koreninskem proteomu. Ugotovili so, da so pri neodpornem kultivarju izrazito inducirani geni povezani s

patogenezo (PR proteini) v koreninah. Ker pri odpornem kultivarju niso zaznali nobenih infekcijsko specifičnih sprememb, so sklepali, da gre pri odpornem kultivarju (Wye Target) za konstitutivno obrambo. Cregeen in sod. (2015) tudi na transkriptomskem nivoju poročajo o izrazitem povečanju izražanja s patogenozo povezanih proteinov ob okužbi z glivo *V. nonalfalfae* v neodpornih rastlinah hmelja, medtem ko je bilo za odporne rastline specifično povečano izražanje genov, vpletenih v ubikvitinacijo in vezikularni transport, kar kaže na možno vpletenost teh mehanizmov pri odpornosti na verticilijsko uvelost hmelja.

V prvi RNA-seq študiji na področju interakcije glive *Verticillium nonalfalfae* in hmelja so Progar in sod. (2017) merili diferenčno izražene gene v odpornem in neodpornem kultivarju v koreninah in nadzemnih delih, ter pogledali, v katere obogatitvene skupine spadajo najdeni geni. Izbrali so 8 kandidatnih genov, ki so jih analizirali s qPCR. Opazili so povišano izražanje dveh genov, ki sta povezana z modifikacijami celične stene. Pri odpornem kultivarju je gen za sintezo kutina kazal znatno povečano izražanje. Kandidatna gena *HICYP86A* (citokrom P450 86A) in *HIGLIP* (lipaza GDSL) spadata med gene, povezane z biosintezo kutina, ki je bila po mrežni analizi sodeč z diferenčno izraženimi geni najbolj obogatena funkcijska skupina v nadzemnih delih odpornega kultivarja. Oba gena sta po okužbi z glivo pokazala znižano izražanje pri obeh kultivarjih, ki je bilo intenzivnejše pri odpornem kultivarju. Tudi pri predhodni transkriptomski raziskavi odziva hmelja na glivo *V. nonalfalfae*, ki so jo izvedli Cregeen in sod. (2015), sta bila med diferenčno izraženimi geni zaznana dva, ki sta povezana z metabolizmom kutina: epoksid hidrolaza, katere izražanje je bilo bolj povišano v odpornem kultivarju, in acil-CoA vezavni protein, katerega izražanje je bilo povišano v odpornem kultivarju, v neodpornem pa se je izražanje po okužbi znižalo.

4.4 RNA interferenca

Kunej in sod. (2021) so preučevali izražanje genov za ključne proteine RNA interference (RNAi) in okarakterizirali diferenčno izražene miRNA v koreninah občutljivega in odpornega kultivarja hmelja 1 in 3 dpi. Oba kultivarja ob okužbi utišata biogenezo ta-siRNA (trans delujoča mala interferenčna RNA), vendar vsak na svoj način. Opazili so visoko ohranjenost izbranih RNAi genov (*AGO*, *DCL* in *RDR*) pri hmelju in njemu sorodnimi vrstami. S študijo izražanja so ugotovili, da je *AGO2* statistično signifikantno različen pri okuženih in neokuženih rastlinah pri obeh kultivarjih 3 dpi, kar lahko doprinese k zmanjšanju ta-siRNA odziva na okužbo. K temu lahko doprinese tudi zmanjšano izražanje *AGO7* pri okuženih rastlinah občutljivega kultivarja hmelja 1 dpi. Gen *RDR6* je kazal znatno znižano izražanje v okuženih koreninah odpornega kultivarja 3 dpi, kar povezujejo s formacijo lateralnih korenin in aktivacijo sekundarnih metabolitov. S študijo miRNA so ugotovili, da je mehanizem odpornosti oziroma tolerance kultivarja Wye Target, verjetno povezan z regulacijo miRNA, ki modulirajo biološke procese vpletene v rast, razvoj in *de novo*

nastajanje korenin in koreninskega prevajalnega tkiva med okužbo z *V. nonalfalfae*. Občutljivi kultivar hmelja kaže spremembe v izražanju miRNA, ki uravnavajo gene vključene v transkripcijsko reprogramiranje, kar vodi v spremembe različnih metabolnih procesov (Kunej in sod., 2021).

5 GLIVNI VIRULENTNI DEJAVNIKI

Fitopatogeni mikroorganizmi ob napadu rastlin izločajo različne virulentne dejavnike (efektorje, encime za razgradnjo celične stene ali fitotoksine), s katerimi vplivajo na celično strukturo in celične procese gostitelja z namenom vzpostaviti uspešno kolonizacijo. Efektorji so glivne manjše molekule brez značilnih proteinskih struktur, ki se izražajo v rastlinah (Jones in Dangl, 2006).

5.1 Kandidatni efektorji glive *V. nonalfalfae*

V okviru raziskovalne skupine na Biotehniški fakulteti so tekom različnih raziskav našli nekaj kandidatnih efektorjev, in sicer 2 proteina iz ksilemskega soka (Mandelc, 2010), protein z domeno za vezavo hitina (CBD) najden v transkriptomu hmelja (Cregeen in sod., 2015), 8 naključno izbranih proteinov iz letalno specifične regije (Flajšman, 2016) in 5 kandidatnih efektorjev izbranih z bioinformacijskimi orodji (Marton in sod., 2018). Cregeen in sod. (2015) so v transkriptomu hmelja identificirali tri glivne gene, med katerimi je CBD kazal zelo visoko ekspresijo v občutljivem kultivarju (Celeia), zato je bil uvrščen med potencialne glivne efektorje (Volk in sod., 2019). Kljub temu, da mutanta z delecijo v genu za ta protein ni kazala manjše virulence, je bilo ugotovljeno (Flajšman in sod., 2016), da ima sposobnost vezave hitina, in po okužbi v rastlini glivo zaščiti pred rastlinskimi hitinazami (Volk in sod., 2019). Flajšman in sod. (2016) so v študiji z mutantami poleg encima lignin-peroksidaza (VnaPRX1.1277) poročali tudi o prvem majhnem sekretornem proteinu pri vrsti *V. nonalfalfae* (VnaSSP4.2), ki ima efektorjem podobne strukturne lastnosti in je udeležen v virulenci glive. Gena se ne nahajata samo v visoko virulentnem patotipu, ampak se homologa nahaja tudi v manj virulentnem patotipu *V. nonalfalfae*, kar pomeni, da gena nista patotip specifična znotraj vrste *V. nonalfalfae*. Za VnaSSP4.2 so nadaljnji poskusi pokazali, da ob vezavi z lipidom v rastlinski membrani tvori pore in omogoča vstop drugim efektorjem (Volk in sod., 2016; Javornik, 2019).

5.1 Regulacija patogenosti z RNA interferenco

Prve raziskave s področja RNAi pri *V. nonalfalfae* so bile narejene v okviru doktorske naloge Jeseničnik (2020), kjer so zabeležili povečano izražanje komponent RNAi v steblih odpornega in občutljivega kultivarja hmelja, ki predstavljajo okolje, kjer se gliva aktivno razrašča po rastlini. Le-to podpira domnevo, da je mehanizem RNAi eden izmed akterjev patogenosti visoko

virulentnega patotipa glive. Okarakterizirali so mehanizem RNAi pri glivi *V. nonalfalfae* z identifikacijo ključnih komponent sinteze malih in miRNA (mikro molekulam RNA podobne RNA) ter komponente utišanja tarčnih genov. Potrdili so obstoj in izražanje dveh proteinov RdRP, dveh DCL in dveh AGO (Jeseničnik in sod., 2019). Nadaljnje so identificirali ter potrdili izražanje devetih miRNA glive ter potrdili aktivnost mehanizma RNAi z eksperimentalno analizo razreza tarčnih mRNA, napovedanih v anotiranem genomu glive (Jeseničnik in sod., 2022).

RNAi posredovano izražanje genov lahko poteka tudi med različnimi kraljestvi organizmov, kar je bilo ugotovljeno tudi pri interakciji *V. nonalfalfae* in hmelja. Jeseničnik in sod. (2019) so preverjali izražanje glivnih RNAi genov v koreninah in steblih okuženih rastlin in opazili večje izražanje glivnih RNAi genov v steblih odpornega in občutljivega genotipa. Sklepajo, da visoko virulentni patotip sintetizira sRNA ter jih verjetno kot efektorje transportira v rastlino, kjer vplivajo na obrambne mehanizme rastline. Devet identificiranih in potrjenih miRNA ima več kot 600 predpostavljenih tarč v genomu hmelja.

6 ISKANJE MARKERSKIH GENOV ZA ODPORNOST

6.1 Viri odpornosti

V hmelju sta znana dva izhodiščna vira odpornosti, in sicer iz dveh ameriških divjih genotipov hmelja podvrste *H. lupulus* var. *neomexicanus* z oznakama Y 90 in AA 7 (Darby, 2001). Za vir odpornosti iz genotipa Y 90 je bilo ob analizi stopnje odpornosti potomcev ocenjeno, da gre za aditivni genski učinek oziroma za poligensko lastnost, ki je zato manj zanimiva za nadaljnje žlahtnjenje. Pri viru odpornosti iz genotipa AA 7, ki je bil uporabljen pri žlahtnjenju kultivarja Wye Target in celotnem nadaljnjem angleškem programu žlahtnjenja hmelja, pa je bilo na podlagi analize segregacijskih razmerij potomcev križanja določeno, da odpornost temelji na delovanju dveh komplementarnih dominantnih genov, kar potrjuje tudi relativno konstanten nivo odpornosti skozi več generacij potomcev (Darby, 2001). V Sloveniji je drugi najbolj razširjen kultivar, ki se prideluje na 27 % vseh hmeljišč Celeia, ki je zelo občutljiv kultivar. Med novejšimi kultivarji so na *V. nonalfalfae* odporni Styrian Gold, Styrian Eureka, Styrian Eagle in Styrian Dragon, ki se iz tržnih razlogov gojijo le na manjšem deležu površin (Čerenak in sod., 2022).

6.2 Segregacija odpornosti pri potomcih

Leta 2013 je bila pri hmelju opravljena genetska raziskava vira odpornosti na verticilijsko uvelost hmelja na F1 generaciji potomcev križanja odpornega kultivarja Wye Target (vir odpornosti AA 7) in neodpornega moškega genotipa hmelja BL2/1, pri kateri je bila ocenjena stopnja bolezenskih znamenj in izvedeno kartiranje kvantitativnih lokusov (QTL, ang. *quantitative trait locus*; Jakše in sod., 2013). Na

ta način je bila identificirana pomembna QTL regija, povezana z odpornostjo na verticilijsko uvelost hmelja, ki pojasnjuje med 24,2 in 26,0 % fenotipske variabilnosti bolezenskih znamenj in potrjuje delovanje več kot enega gena. Pri tem sicer ni znano, koliko genov je zajetih v omenjeni QTL regiji, a segregacijska analiza F1 generacije križanja je bila skladna z omenjenim Darbyjevim modelom delovanja dveh komplementarnih dominantnih genov in kaže na verjetno vključenost vsaj enega od genov v omenjeni QTL regiji (Jakše in sod., 2013; Darby, 2001).

6.3 Kandidati za odpornostne gene

Analogi R genov (RGA – *R gene analogues*), so kandidati za odpornostne gene, ki imajo ohranjene domene in igrajo pomembno vlogo pri odpornosti na patogene (Kumar Sekhwal in sod., 2015). Pri hmelju je bilo izvedeno RGA profiliranje, v katerem je bilo odkritih 17 skupin RGA (Kozjak in sod., 2009). Proizvedena sta bila dva molekularna označevalca, ki sta segregirala za družino križanja in v kateri segregira tudi odpornost na verticilijsko uvelost hmelja (Wye Target x 2/1). Kmalu zatem so transkriptomski projekti omogočili prost dostop do okrog 10 000 hmeljnih oznak izraženega zaporedja (EST, angl.: *expressed sequence tag*; Nagel in sod., 2008) za izvedbo iskanja EST-RGA s pristopom kandidatnega gena (Majer, 2014). V tej raziskavi sta bila odkrita dva homologa gena *Ve1* iz krompirja, *HLVe1-1* in *HLVe1-2*, ki nosita zapis za membranska receptorska proteina z zunaj-celično LRR domeno; takšni receptorji so tipični za prepoznavo efektorskih proteinov. *HLVe1-1* se deduje dominantno, zato ne more predstavljati vira odpornosti, saj so potomci različno odporni na *V. nonalfalfae*. Za *HLVe1-2* so opazili običajno Mendelsko segregacijo dveh funkcionalnih alelnih oblik (*HLVe1-2A* in *HLVe1-2B*) pri potomstvu križanja, kjer so potomci z alelom *HLVe1-2A* bili bolj odporni kot prejemniki drugega alela (Majer, 2014). V koekpresijskem poskusu v tobaku je bila ugotovljena interakcija med *HLVe1-2A* in glivnim efektorjem *Ave1* (Song in sod., 2017). Kljub temu, da hmelj vsebuje funkcionalni homolog *Ve1*, pa le-ta najverjetneje ni vključen v obrambo hmelja pred glivo *V. nonalfalfae*, saj v sevih, ki okužujejo hmelj, ni bilo mogoče najti zaporedij gena za efektor *Ave1* (Progar, 2016).

7 ZAKLJUČEK

Pojav simptomov bolezni je pogojen z interakcijo rastline, patogena in okoljskih dejavnikov (Agrios, 2005). Interakcije med rastlinami in mikrobi so na molekularni ravni zelo kompleksne in kažejo na dolgotrajno koevolucijo obeh vpletenih (Dangl in Jones, 2001; Chisholm in sod., 2006; Zeillinger, 2016). Skupna lastnost bolezni, ki jih povzročajo talne glive, je predvsem pogosta neuspešnost zdravljenja okuženih rastlin, ter njihovo dolgotrajno ohranjanje v tleh v obliki trajnih organov (Radišek in Razinger, 2019).

Glavni dejavniki, ki omejujejo pridelavo hmelja na številnih hmeljiščih po svetu, so različni povzročitelji bolezni, od katerih največ škode povzročajo hmeljeva pepelovka, hmeljeva peronospora, viroidi ter glive iz rodu *Verticillium sensu stricto*, ki povzročajo verticilijsko uvelost hmelja (Neve, 1991; Radišek in sod., 2006). Interakcija med *V. nonalfalfae* in hmeljem je predmet raziskav na področju hmeljarstva že od leta 1953 (Keyworth, 1953) in je aktualna še danes, saj visoko virulentni patotipi glive povzročajo veliko gospodarsko škodo po hmeljiščih v Angliji, Nemčiji, Sloveniji, Češki in Belgiji.

Številne študije izražanja genov niso dale jasnih odgovor, so pa potrdile, da je odziv pri občutljivem kultivarju močnejši kot pri odpornem (Mandelc in sod., 2013; Cregeen in sod., 2015; Progar, 2017). Pri odpornem kultivarju so zaznali povečano izražanje genov, ki sodelujejo v metabolizmu proteinov (Cregeen in sod., 2015). Študije na nivoju RNAi odzivov na okužbo niso podale jasnih odgovorov. Iz dela Kunej in sod. (2021) lahko domnevamo, da je mehanizem odpornosti, opažen pri kultivarju Wye Target, verjetno povezan z regulacijo miRNA, ki modulirajo biološke procese vpletene v rast, razvoj in *de novo* nastajanje korenin in koreninskega prevajalnega tkiva med okužbo z *V. nonalfalfae*. Občutljivi kultivar hmelja kaže spremembe v izražanju miRNA, ki uravnavajo gene vključene v transkripcijsko reprogramiranje, kar vodi v spremembe v različnih metabolnih procesih. Primer znanega mehanizma odpornosti na verticilijsko uvelost hmelja je receptor Ve1 iz paradižnika, ki prepozna efektorski protein Ave1 iz glive *V. dahliae* (Song in sod., 2017) in čeprav je bil homolog *Ve1* najden tudi v hmelju, gliva *V. nonalfalfae*, ki okužuje hmelj, ne vsebuje efektorja Ave1, zato mora biti mehanizem odpornosti tu drugačen. Najden kvantitativni lokus pri segregacijski analizi potomcev križanja odpornega in neodpornega genotipa hmelja v generaciji F1 pojasnjuje 24–26 % fenotipske variabilnosti odpornosti na glivo *V. nonalfalfae* (Jakše in sod., 2013), kar ustreza modelu delovanja dveh dominantnih komplementarnih genov, kar je na dveh drugih družinah potomcev ugotovil že Darby (2001).

Analize flavanolov v okuženih rastlinah so pokazale njihovo akumulacijo v koreninah odpornega kultivarja hmelja v zgodnjih fazah okužbe, kar nakazuje na morebitno vlogo le-teh pri omejevanju širjenja glive *V. nonalfalfae* v stebelno tkivo (Kunej in sod., 2020).

Pri študijah glivnih efektorjev sta najbolj izstopala gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*, najdena pri visoko virulentnem in manj virulentnem patotipu, katerih izbitje je imelo vidne učinke na virulenco patogena (Flajšman, 2016). Kljub temu, da je bilo dokazano, da ima efektor CBD sposobnost vezave hitina in po okužbi v rastlini glivo zaščiti pred rastlinskimi hitinazami (Volk in sod., 2019), ne spremeni virulentnosti glive (Flajšman, 2016).

Velika izraženost glivnih RNAi komponent je pokazala, da je mehanizem RNAi verjetno eden izmed virov patogenosti glive *V. nonalfalfae*, ki glivi omogoča uspešno okuževanje ter kolonizacijo gostiteljske rastline hmelja (Jeseničnik in sod., 2019, 2022). Biološke poti, katerim pripadajo predpostavljene tarče v transkriptomu hmelja, skupaj z ravnmi izražanja komponent RNAi v okuženem hmelju ter zastopanostjo molekul miRNA po patotipih in tkivih, podpirajo dejstvo, da bi gliva *V. nonalfalfae* lahko sintetizirala sRNA oziroma miRNA ter jih transportirala v gostitelja po tako imenovanem modelu prenosa signalov RNAi med kraljestvi. Za potrditev tarč pri glivi in hmelju pa bi bilo potrebno narediti še raziskave z mutantami.

Zatiranje povzročiteljev verticilijske uvelosti hmelja je zelo težavno, predvsem zaradi dolgoživosti spor in melaniziranega micelija v tleh, zaradi širokega spektra gostiteljskih rastlin in zaradi neučinkovitosti fungicidov na delovanje patogena, ko se ta že nahaja v rastlini. Raziskave s področja interakcije predstavljajo pot do poznavanja mehanizmov, ki so ključni za uspešno obrambo hmelja pred glivo *V. nonalfalfae*. Poznavanje teh ne omogoča le razvoj fitofarmaceutskih sredstev, temveč tudi hitrejšo selekcijo z genetskimi markerji v smeri žlahtnjenja za odpornost na verticilijsko uvelost hmelja. Kljub mnogim raziskavam, ki so bile narejene v opisanih študijah, še vedno nismo uspeli najti ključnih elementov za obrambo pri odpornih kultivarjih. Verticilijska uvelost hmelja je bolezen, ki še vedno ogroža pridelavo hmelja, zato je sajenje odpornih kultivarjev ključno. V žlahtnjenju hmelja se še vedno uporabljajo testi z umetnim okuževanjem, ki jih izvajamo na kandidatnih genotipih, ki pa so dolgotrajni in delovno zahtevni. S prihodom novih generacij sekvenciranja in boljšega poznavanja genoma obeh vpletenih organizmov ciljamo na najdbo ključnih markerjev.

8 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujejo prof. dr. Kristini Gruden in dr. Sebastjanu Radišku za pregled članka.

9 LITERATURA

- Agrios, G. (2005). Plant Pathology 5th Edition. San Diego: Academic Press, 922.
https://books.google.com/books/about/Plant_Pathology.html?hl=sl&id=CnzbGZgby60C
- Anderson, J. P., Gleason, C. A., Foley, R. C., Thrall B, P. H., Burdon, J. B., & Singh, K. B. (2010). *Plants versus pathogens: an evolutionary arms race*.
<https://doi.org/10.1071/FP09304>
- Benhamou, N. (1995). Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with Verticillium-infected xylem vessels. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46(4), 321–338.
<https://doi.org/10.1006/PMPP.1995.1025>

- Berlanger, I., & Powelson, M. L. (2000). Verticillium wilt. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2000-0801-01>
- Berne, S., Kovačević, N., Kastelec, D., Javornik, B., & Radišek, S. (2020). Hop Polyphenols in Relation to Verticillium Wilt Resistance and Their Antifungal Activity. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 1318, 9(10), 1318. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9101318>
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). *Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI)*. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Buscot, F., Munch, J. C., Charcosset, J. Y., Gardes, M., Nehls, U., & Hampp, R. (2000). Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 601–614. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2000.TB00561.X>
- Chen, J. Y., Xiao, H. L., Gui, Y. J., Zhang, D. D., Li, L., Bao, Y. M., & Dai, X. F. (2016). Characterization of the Verticillium dahliae exoproteome involves in pathogenicity from cotton-containing medium. *Frontiers in Microbiology*, 1709. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01709>
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). *Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124(4), 803–814. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.02.008>
- Cregeen, S., Radišek, S., Mandelc, S., Turk, B., Stajner, N., Jakse, J., & Javornik, B. (2015). Different Gene Expressions of Resistant and Susceptible Hop Cultivars in Response to Infection with a Highly Aggressive Strain of Verticillium albo-atrum. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(3), 689–704. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0767-4>
- Čerenak, A., Oset Luskar, M., Luskar, L., Radišek, S., Rutnik, K., Ocvirk, M., Košir, I. J. (2022). Hop breeding in Slovenia – influence of storage on hop quality. *Proceedings of the Scientific-Technical Commission*. IHGC, Galicija, Španija. 18.
- Daayf, F., Nicole, M., Boher, B., Pando, A., & Geiger, J. P. (1997). Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of Verticillium dahliae. *European Journal of Plant Pathology* 1997 103:2, 103(2), 125–136. <https://doi.org/10.1023/A:1008620410471>
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). *defence responses to infection*. 411(June).
- de Wit, P. J. G. M., Mehrabi, R., van den Burg, H. A., & Stergiopoulos, I. (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 735–747. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2009.00591.X>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 2010 11:8, 11(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dolinar, M., Simoncic, A. (1999). Verticillium albo-atrum Reinke at Berthold and Verticillium dahliae Klebahn in Slovenia. *Lectures and Papers presented at 4th Slovenian Conference on Plant Protection*. Macek, J. (Ed.) (Ljubljana Univ. (Slovenia) Biotechnical Fac., Agronomy Dept).- Ljubljana
- Darby, P. (2001). Single gene traits in hop breeding. *Proceedings of the Scientific Commission IHGC*. Kent, England.76–81.
- Flajšman, M. (2016). Določanje virulentnih dejavnikov fitopatogene glive Verticillium albo-atrum z mutacijsko analizo : doktorska disertacija.

- Flajsman, M., Mandelc, S., Radisek, S., Stajner, N., Jakse, J., Kosmelj, K., & Javornik, B. (2016). Identification of novel virulence-associated proteins secreted to xylem by *Verticillium nonalfalfae* during colonization of hop plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(5), 362–373.
- Fradin, E. F., & Thomma, B. P. H. J. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7(2), 71–86. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2006.00323.X>
- Gao, Y., Wang, W., Zhang, T., Gong, Z., Zhao, H., & Han, G. Z. (2018). Out of Water: The Origin and Early Diversification of Plant R-Genes. *Plant Physiology*, 177(1), 82–89. <https://doi.org/10.1104/PP.18.00185>
- Gust, A. A., Pruitt, R., & Nürnberger, T. (2017). Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends in Plant Science*, 22(9), 779–791. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.005>
- Harris R.V. (1927). A wilt disease of hops. East Malling Research Station. Annual Report for 1925, II Supplement: 92-93
- Humphreys, C. P., Franks, P. J., Rees, M., Bidartondo, M. I., Leake, J. R., & Beerling, D. J. (2010). Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature Communications* 2010 1:1, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms1105>
- Inderbitzin P., Bostock R. M., Davis R. M., Usami T., Platt H. W., Subbarao K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE*, 6, 12: e28341, doi: 10.1371/journal.pone.0028341: 21 str.
- Javornik B. (2019). Genetske raziskave hmelja in njegovih škodljivih organizmov v Sloveniji – pogled nazaj. *Hmeljarski bilten*, 26: 5–22
- Jakse, J., Cerenak, A., Radisek, S., Satovic, Z., Luthar, Z., & Javornik, B. (2013). Identification of quantitative trait loci for resistance to *Verticillium* wilt and yield parameters in hop (*Humulus lupulus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126(6), 1431–1443. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2062-4>
- Jeseničnik, T., Štajner, N., Radišek, S., & Jakše, J. (2019). RNA interference core components identified and characterised in *Verticillium nonalfalfae*, a vascular wilt pathogenic plant fungi of hops. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44494-8>
- Jeseničnik, T., Identifikacija in opis malih molekul RNA pri fitopatogeni glivi *Verticillium nonalfalfae*: doktorska disertacija.
- JH, D. (2015). An Overview of Plant Immunity. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 6(11). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000322>
- Jeseničnik, T., Štajner, N., Radišek, S., Mishra, A.K., Košmelj, K., Kunej, U., Jakše, J. (2022) Discovery of microRNA-like Small RNAs in Pathogenic Plant Fungus *Verticillium nonalfalfae* Using High-Throughput Sequencing and qPCR and RLM-RACE Validation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2):900. <https://doi.org/10.3390/ijms23020900> (14. 11. 2022)
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 2006 444:7117, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/NATURE05286>
- Kasson, M. T., Short, D. P. G., O'Neal, E. S., Subbarao, K. V., & Davis, D. D. (2014). Comparative pathogenicity, biocontrol efficacy, and multilocus sequence typing of *Verticillium nonalfalfae* from the invasive *Ailanthus altissima* and other hosts. *Phytopathology*, 104(3), 282-292.

- Keyworth, W. G. (1953). Verticillium Wilt Of The Hop. *Annals of Applied Biology*, 40(2), 344–361. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7348.1953.TB01087.X>
- Keyworth, W. G., & Hewitt, E. J. (1948). Verticillium Wilt of the Hop (*Humulus Lupulus*) V. The Influence of Nutrition on the Reaction of the Hop Plant to Infection with *Verticillium Albo-Atrum*. *Journal of Horticultural Science*, 24(4), 219–227. <https://doi.org/10.1080/00221589.1948.11513692>
- Klosterman, S. J., Atallah, Z. K., Vallad, G. E., & Subbarao, K. V. (2009). Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. *Annual review of phytopathology*, 47, 39–62.
- Kozjak, P., Jakše, J., & Javornik, B. (2009). Isolation and sequence analysis of NBS-LRR disease resistance gene analogues from hop *Humulus lupulus* L. *Plant Science*, 176(6), 775–782. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.021>
- Kunej, U., Jakše, J., Radišek, S., & Štajner, N. (2021). Identification and Characterization of *Verticillium nonalfalfae*-Responsive MicroRNAs in the Roots of Resistant and Susceptible Hop Cultivars. *Plants 2021, Vol. 10, Page 1883*, 10(9), 1883. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10091883>
- Kunej, U., Mikulič-Petkovšek, M., Radišek, S., & Štajner, N. (2020). Changes in the Phenolic Compounds of Hop (*Humulus lupulus* L.) Induced by Infection with *Verticillium nonalfalfae*, the Causal Agent of Hop Verticillium Wilt. *Plants 2020, Vol. 9, Page 841*, 9(7), 841. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9070841>
- Majer, A. (2014). Identifikacija genov za odpornost na hmeljevo uvelost: doktorska disertacija.
- Mandelc, S., Radisek, S., Jamnik, P., & Javornik, B. (2009). Comparison of mycelial proteomes of two *Verticillium albo-atrum* pathotypes from hop. *European journal of plant pathology*, 125(1), 159–171
- Mandelc, S. (2010). Proteomska analiza povzročiteljev hmeljeve uvelosti (*Verticillium* spp.) in diferencialno izraženih proteinov v hmelju po okužbi s patotipom PG2 *Verticillium albo-atrum*: doktorska disertacija.
- Mandelc, S., Timperman, I., Radišek, S., Devreese, B., Samyn, B., & Javornik, B. (2013). Comparative proteomic profiling in compatible and incompatible interactions between hop roots and *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 68, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.017>
- Marton, K., Flajsman, M., Radisek, S., Kosmelj, K., Jakse, J., Javornik, B., & Berne, S. (2018). Comprehensive analysis of *Verticillium nonalfalfae* in silico secretome uncovers putative effector proteins expressed during hop invasion. *PLOS ONE*, 13(6), e0198971. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0198971>
- Nagel, J., Culley, L. K., Lu, Y., Liu, E., Matthews, P. D., Stevens, J. F., & Page, J. E. (2008). EST Analysis of Hop Glandular Trichomes Identifies an O-Methyltransferase That Catalyzes the Biosynthesis of Xanthohumol. *The Plant Cell*, 20(1), 186–200. <https://doi.org/10.1105/TPC.107.055178>
- Neve R. A. 1991. Hops. London, *Chapman and Hall*: 266 str.
- Pegg, G. F., Brady, B. L. (2002). *Verticillium wilts*. Wallingford (Oxon); New York, CABI Pub: 552.
- Pegg, G. F., & Street, P. F. S. (1984). Measurement of *Verticillium albo-atrum* in high and low resistance hop cultivars. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1), 99–106. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(84\)80216-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(84)80216-8)

- Progar, V., Transkriptomska analiza genov hmelja (*Humulus lupulus* L.) po okužbi s fitopatogeno glivo *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold: doktorska disertacija.
- Progar, V., Jakše, J., Štajner, N., Radišek, S., Javornik, B., & Berne, S. (2017). Comparative transcriptional analysis of hop responses to infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Cell Reports*, 36(10), 1599–1613. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2177-1>
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2003. Identifikacija dveh patotipov glive *Verticillium albo-atrum* na hmelju z molekulskimi markerji in umetnimi okužbami hmelja. V: *Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin*, Zreče, 4.-6. marec 2003. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 107–111
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2004. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Disease*, 88: 1115–1122
- Radišek S., Jakše 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., Javornik B. 2011. Taksonomija in variabilnost fitopatogenih vrst gliv iz rodu *Verticillium*. *Hmeljarski bilten*, 18: 41–55
- Radišek S., Razinger J. 2019. Preiskusanje biotičnih pripravkov za zatiranje verticilijske uvelosti in fuzarijskih obolenj paradižnika. *Hmeljarski bilten*, 26: 176–187
- Sekhwil, M. K., Li, P., Lam, I., Wang, X., Cloutier, S., & You, F. M. (2015). Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19248. <https://doi.org/10.3390/IJMS160819248>
- Sewell, G. W. F., & Wilson, J. F. (1964). Occurrence and Dispersal of *Verticillium Conidia* in Xylem Sap of the Hop (*Humulus lupulus* L.). *Nature* 196 204:4961, 204(4961), 901–901. <https://doi.org/10.1038/204901a0>
- Snyder, A. L., Salom, S. M., & Kok, L. T. (2014). Survey of *Verticillium nonalfalfae* (Phyllachorales) on tree-of-heaven in the southeastern USA. *Biocontrol Science and Technology*, 24(3), 303–314.
- Song, Y., Zhang, Z., Seidl, M. F., Majer, A., Jakse, J., Javornik, B., & Thomma, B. P. H. J. (2017). Broad taxonomic characterization of *Verticillium* wilt resistance genes reveals an ancient origin of the tomato Ve1 immune receptor. *Molecular Plant Pathology*, 18(2), 195–209. <https://doi.org/10.1111/mpp.12390>
- Talboys P. W. (1958a). Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Transaction of the British Mycological Society*, 41: 249–260
- Talboys P. W. (1958b). Some mechanisms contributing to *Verticillium*-resistance in the hop root. *Transactions of the British Mycological Society*, 41, 2: 227–241
- Talboys P. W. (1958c). Degradation of cellulose by *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 41, 2: 242–248
- Talboys P. W. (1972). Resistance to vascular wilt fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 181(1064), 319–332. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1972.0053>
- Talboys P. W. (1987). *Verticillium* wilt in English hops - Retrospect and prospect. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, 9, 1: 68–77
- Volk, H., Marton, K., Flajšman, M., Radišek, S., Tian, H., Hein, I., Podlipnik, Č., Thomma, B. P. H. J., Košmelj, K., Javornik, B., & Berne, S. (2019). Chitin-Binding Protein of *Verticillium nonalfalfae* Disguises Fungus from Plant Chitinases and Suppresses Chitin-Triggered Host Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(10), 1378–1390.

- Wu, L., Chen, H., Curtis, C., & Qing Fu, Z. (2014). Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence*, 5(7), 710–721. <https://doi.org/10.4161/viru.29755>
- Yadeta, K. A., & Thomma, B. P. H. J. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4(APR), 97. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2013.00097/BIBTEX>
- Yang, L., Jue, D., Li, W., Zhang, R., Chen, M., & Yang, Q. (2013). Identification of MiRNA from Eggplant (*Solanum melongena* L.) by Small RNA Deep Sequencing and Their Response to *Verticillium dahliae* Infection. *PLOS ONE*, 8(8), e72840. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0072840>
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, V., Kin, C., Tsui, M., & Nayak, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 045, 182–207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>
- Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W. C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H. da, Raikhel, N., & Jin, H. (2011). Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene MEMB12. *Molecular Cell*, 42(3), 356. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.04.010>