

ZAKLJUČNO POROČILO

O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

 REPUBLIKA SLOVENIJA
 NOSILEC JAVNEGA POOBLASTILA
 JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST
 REPUBLIKE SLOVENIJE, LJUBLJANA

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

Prejeto: 17-11-2008	Sig. z.: 0110
	Pril.:
Šifra zadeve: 03113-387/2006	Vrednost:

2. Šifra projekta:

V4-0340

3. Naslov projekta:

Razvoj in vpeljava sodobnih tehnologij za sanacijo tal na izkrčenih hmeljiščih zaradi okužb s karantensko boleznijo hmeljevo uvelostjo (*Verticillium* spp.)

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Razvoj in vpeljava sodobnih tehnologij za sanacijo tal na izkrčenih hmeljiščih zaradi okužb s karantensko boleznijo hmeljevo uvelostjo (*Verticillium* spp.)

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Development and establishment of modern technologies for soil disinfection in hop gardens eradicated because of *Verticillium* wilt infections.

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

Verticillium spp., *Humulus lupulus*, sanacija tal, diagnostične tehnike

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Verticillium spp., *Humulus lupulus*, soil disinfection, diagnostic techniques

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

6. Sofinancer/sofinancerji:

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

20162

Dr. Sebastjan Radišek

Datum: 10. 11. 2008

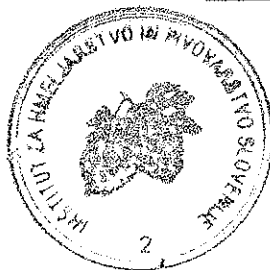
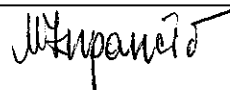
Podpis vodje projekta:

Dr. Sebastjan Radišek



Podpis in žig izvajalca:

Martina Zupančič, direktorica



II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- ☐ a) v celoti
☒ b) delno
☐ c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

V projektu smo si zadali 3 osnovne cilje in sicer:

1. Določiti gostiteljsko specifičnost hmeljnih izolatov glive V. albo-atrum, z namenom izbire najprimernejših rastlinskih vrst za preizkušanje učinkovitosti vnašanja njihovih ostankov v tla in ponuditi pridelovalcem širši izbor rastlin za gojenje na karantenskih premenah.
2. Vpeljati in razviti tehnologijo zmanjševanja infekcijskega potenciala glive V. albo-atrum v tleh, s čimer bi lahko skrajšali čas sanacije tal na izkrčenih hmeljiščih.
3. Vpeljati hitre diagnostične metode za preverjanje kontaminacije tal z glivo V. albo-atrum, kot podporo hmeljarjem za izognitev novih bolezenskih izbruhov oz. izbiro ustreznih sort pri vzpostavitvi nasadov.

Prva dva cilja smo izpolnili v celoti, medtem ko pri razvoju diagnostične metode nismo uspeli razviti tehnike s katero bi dosegali zadovoljive rezultate. Pri delu smo imeli težave pri pridobivanju dovolj kakovostne DNA pri kateri ne prihaja do prisotnosti inhibitorjev PCR reakcije, ki omogoča zaznavanje prisotnosti glive v tleh. Težava je metodološke narave in jo bomo v nadaljnjem delu v poskušali odpraviti ter tako hmeljarjem čimprej ponuditi možnost testiranja tal.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- ☐ a) da
☒ b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

Poročilo o relizaciji programa dela je opisano v Prilogi 1.

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- ☐ a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- ☒ b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- ☒ c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- ☐ d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- ☒ e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- ☒ a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- ☐ b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- ☐ c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- ☐ d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- ☒ e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- ☐ f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- ☐ g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- ☒ h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- ☐ i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

V projektu smo raziskali in razvili postopke s katerimi lahko hmeljarji in tudi drugi pridelovalci, ki imajo težave s proizvodnjo rastlin zaradi talnih gliv, znižajo infekcijski potencial brez uporabe fitofarmaceutskih sredstev ali dolgotrajnega izvajanja premene z negostiteljskimi rastlinami. Testirali smo gostiteljsko specifičnost različnih krmnih rastlin in tako prikazali nove možnosti za gojenje na karantenskih premenah. Pričeli smo z razvojem diagnostične metode s katero bo možno testirati tla in določiti prisotnost povzročiteljev hmeljeve uvelosti v tleh. Na ta način se bo možno izogniti novim bolezenskim izbruhom pri zasnovi novih nasadov. Z rezultati projekta smo tako v slovensko kmetijsko proizvodnjo uvedli nove tehnologije, ki v tujini v zadnjem desetletju pridobivajo na veljavi in so razvojno naravnane.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Rezultati projekta so dolgoročno zasnovani, saj bodo omogočili pridelovalcem na okuženih območjih hitrejšo obnovo proizvodnje in s tem ponovno vzpostavitev konkurenčnosti. Rezultati imajo tudi širši učinek, saj niso uporabni samo v hmeljarstvu, ampak tudi v ostalih panogah poljedelstva in vrtnarstva, kjer z zadnjem času prihaja do nastanka večjih škod zaradi vnosa nekaterih talnih organizmov.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ a) v domačih znanstvenih krogih;
- ☒ b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- ☒ c) pri domačih uporabnikih;
- ☒ d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Interes po rezultatih se izraža pri domačih pridelovalcih (hmeljarji, vrtnarji) in semenarskih hišah ter tujih znanstvenih institucijah (Bayer, Landesanstalt fuer Landwirtschaft, Institut fuer Pflanzenbau und Pflanzenzuechtung, Arbeitsbereich Hopfen, Hüll, Freising, Deutschland).

3.7. Število diplomantov, magistrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

1. diploma

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

Sodelovanja:

- Horticulture Research International, Department of Hop Research, Wye College, Wye Ashford, Kent, England
- Hop Research Institute co., Žatec, Czech Republic
- Bayer. Landesanstalt fuer Landwirtschaft, Institut fuer Pflanzenbau und Pflanzenzuechtung, Arbeitsbereich Hopfen, Hüll, Freising, Deutschland
- Oregon State University, Botany and Plant Pathology, Corvallis, Oregon, USA
- Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Pulawy, Poland
- Tasmania Institute of Agricultural Research, University of Tasmania, Australia

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

Rezultati tovrstnega sodelovanja temeljijo na izmenjavi materiala in izkušnj s kolegi iz tujine, predvsem na področju hmeljarskih in agronomskih tem ter povezovanju za nadaljnje prijave na EU projekte.

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani: <http://www.izum.si/>

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

Nacionalni koordinatorski sistematični nadzor nad hmeljevo uvelostjo v Sloveniji; Po odločbah Fitosanitarne uprave RS v letih 2000-2008.

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.

PRILOGA1: Vsebinsko poročilo k realizaciji projekta

1 UVOD

Hmelj je trajnica, katere pridelava je povezana z obsežno in prilagojeno agrotehniko, ki zahteva visoka gospodarska vlaganja. Okužba hmeljišč s talnima glivama *Verticillium albo-atrum* in *V. dahliae*, ki povzročata hmeljevo uvelost, predstavlja omejujoč dejavnik hmeljarske proizvodnje. V Sloveniji je omenjena bolezen postala gospodarsko pomembna leta 1997 s pojavom novega, zelo virulentnega patotipa PV1 (genotip PG2) glive *V. albo-atrum*, ki povzroča letalno obliko hmeljeve uvelosti oz. odmiranje hmeljnih rastlin. Zaradi dolgotrajnega ohranjanja glivic v tleh se na uničenih hmeljiščih izvaja obvezna štiriletna karantenska premena z žiti ali travami. Štiriletni izpad proizvodnje pa potiska pridelovalce na okuženih območjih v nezavidljiv in nekonkurenčni položaj, zaradi česar vse pogosteje prihaja do opuščanja pridelave hmelja.

Pri zatiranju talnih fitopatogenih gliv se v zadnjem desetletju v svetu pospešeno razvijajo tehnologije, ki temeljijo na ne-kemičnih pristopih in so tako v skladu z razvojem trajnostnega kmetijstva. Med temi po uspešnosti in praktični uporabi izstopajo: segrevanje tal s sončnim obsevanjem, poplavljanje tal in vnašanje različnih organskih ostankov v tla (Katan, 2000). Prvi dve tehnologiji sta pogojeni z naravnimi viri in sta zato omejeni samo na nekatera območja, medtem ko vnašanje organske snovi v tla omogoča širšo uporabo, kar je tudi razlog za intenzivne raziskave na tem področju v zadnjih letih (Bailey in Lazarovits, 2003).

Znano je, da uporaba podorin v poljedelstvu ugodno vpliva na povečanje mikrobiološke aktivnosti tal, predvsem v smislu naselitve mikofagnih organizmov, streptomicet in ostalih aktinomicet, ki preko tekmovalne sposobnosti, parazitizma in antagonizma negativno vplivajo na povzročitelje bolezni (Wiggins in Kinkel, 2005). Pri zatiranju in zniževanju infekcijskega potenciala gliv iz rodu *Verticillium* se je vnašanje ostankov rastlin iz družine križnic (Brassicaceae) izkazalo kot zelo uspešno in v ZDA že predstavlja pomemben ukrep pred sajenjem občutljivih rastlin (Brown in Morra, 1997). Pozitiven učinek zaoravanja križnic je pogojen z vsebnostjo glukosinolatov, ki se sproščajo pri razgradnji teh rastlin in imajo fungistatičen učinek. Subbarao s sod.(1999) so ugotovili primerljivo stopnjo zmanjšanja infekcijskega potenciala glive *V. dahliae* pri vnašanju ostankov brokolija (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) in uporabi razširjenih biocidov za razkuževanje tal na osnovi kloropikrina in metam-natrija. Podobne rezultate so objavili tudi Blok s sod.(2000), ki so fungistatični učinek dosegli z ustvarjanjem anaerobnih pogojev v tleh, ki imajo prav tako negativen učinek na preživetveno sposobnost fitopatogenih gliv iz rodu *Verticillium*. Poleg križnic je znanih še nekaj rastlin s fungistatičnim vplivom, med katerimi lahko izpostavimo sirek (*Sorgum bicolor* L.) in sudansko travo (*Sorgum sudanese* L.), ki ob razkroju tvorita toksičen hidrogen cianid (Davis s sod., 1996).

Ob tem je potrebno poudariti eno od omejitev pri tovrstnih raziskavah, in sicer določitev zanesljive ocene učinkovitosti opravljenih postopkov, saj tovrstna testiranja potekajo v zunanjih razmerah, kjer prihaja do številnih nenadzorovanih interakcij med talnimi

organizmi. Tako je v literaturi opisanih več metod, od katerih so najpogostejše omenjene sajenje testnih rastlin, mokro in suho presejevanje tal z uporabo različnih selektivnih gojišč in najlonsko filtriranje tal (Pegg in Brady, 2002). Tovrstne tehnike so večinoma ocenjene kot dolgotrajne, delovno zahtevne in pogostokrat nezanesljive. V nasprotju s tem pa sta Hawke in Lazarovits (1994) na modelu glive *V. dahliae* razvila zelo uspešno in zanesljivo metodo določanja, ki je postala standardna mikrobiološka metoda tudi pri ostalih talnih glivah. Osnovni princip te metode temelji na pripravi inokula glive v posebnih najlonskih vrečah, katerega infekcijski potencial je predhodno laboratorijsko določen v enotah CFU/g (angl. colony forming units). Sledi vnos inokula v tla in opravljanje postopkov zatiranja. Uspešnost vpliva zatiranja se oceni po določenem času z izkopom vreč in ponovno laboratorijsko oceno potenciala inokula. To metodo je možno prilagoditi za glivo *V. albo-atrum* in je zato primerna za oceno učinkovitosti različnih postopkov deinfestacije tal.

Ob zniževanju infekcijskega potenciala je pri kontroli nad hmeljevo uvelostjo pomembno pridobiti informacijo o kontaminaciji oz. prisotnosti te bolezni v tleh na zemljiščih, ki so namenjena saditvi novih nasadov. To pomeni predvsem hmeljišča na katerih se je izvajala karantenska premena, do ostalih površin na okuženih območjih. Na ta način se lahko pridelovalec izogne nepotrebnemu tveganju nastanka izbruhov bolezni in se na osnovi te informacije tudi odloči o izbiri primerne sorte ali izvajanju ostalih ukrepov. Tovrstna testiranja so v svetu razvita v večini dežel (Anglija, Grčija, Kanada, Nizozemska, Španija, ZDA), kjer glive iz rodu *Verticillium* resneje ogrožajo rastlinsko pridelavo in predstavljajo podporo, ki pripomore izognitvi nastankov bolezni ter na ta način pomembno vplivajo na zmanjšanje gospodarske škode. Sodobne analize testiranja tal temeljijo na molekularnih tehnikah na osnovi polimerazne verižne reakcije (PCR), ki v primerjavi z nekaterimi mikrobiološkimi metodami, ki trajajo tudi več tednov, ponujajo mnogo hitrejšo analizo, visok nivo detekcije in specifičnost analize (Martin s sod., 2000). Tako je npr. skupina španskih raziskovalcev (Prerez-Artez in sod., 2005) na osnovi patotipsko specifičnih RAPD DNA fragmentov razvila analizo, ki omogoča določanje dveh različno oljkam patogenih patotipov glive *V. dahliae* v tleh. Ta analiza je postala pomembna podpora pridelovalcem, saj se lahko na ta način izognejo bolezni oz. izberejo odporne sorte.

Iz omenjenega so bili glavni cilji projekta:

- Določiti gostiteljsko specifičnost hmeljnih izolatov glive *V. albo-atrum*, z namenom izbire najprimernejših rastlinskih vrst za preizkušanje učinkovitosti vnašanja njihovih ostankov v tla in ponuditi pridelovalcem širši izbor rastlin za gojenje na karantenskih premenah.
- Vpeljati in razviti tehnologijo zmanjševanja infekcijskega potenciala glive *V. albo-atrum* v tleh, s čimer bi lahko skrajšali čas sanacije tal na izkrčenih hmeljiščih.
- Vpeljati hitre diagnostične metode za preverjanje kontaminacije tal z glivo *V. albo-atrum*, kot podporo hmeljarjem za izognitev novih bolezenskih izbruhov oz. izbiro ustreznih sort pri vzpostavitvi nasadov.

2 METODE DELA

2.1 Določanje gostiteljske specifičnosti glive *V. albo-atrum* z umetnimi okužbami

V poskusu smo testirali odzive pomembnejših krmnih rastlin na okužbe glive *V. albo-atrum* (patotip PV1; genotip PG2) s tehniko umetne inokulacije v kontroliranih razmerah rastne komore. Rastline smo okužili z namakanjem koreninskega sistema v inokulu oz. suspenziji konidijev omenjene glive. Inokulum smo pripravili z 1 tedenskim gojenjem glive v tekočem gojišču (»general fungal medium«) na rotacijskem stresalniku. Sledila je mikroskopska potrditev kulture in umeritev koncentracije inokula s Thoma števno komoro na 5×10^6 konidijev/ml. Vsako od izbranih rastlin smo gojili v 4l lončkih v 6 ponovitvah po 3 rastline na lonček. Vizualna bolezenska znamenja smo ocenjevali 8 tednov po inokulaciji, kjer smo opazovali pojav listnih kloroz in nekroz ter porjavenje prevodnega tkiva pri posamezni rastlini. Z namenom potrditve prisotnosti uspešnosti okuževanja smo izvedli tudi reizolacije izolatov. Analizo vzorcev smo naredili s pomočjo klasične mikološke izolacije gliv v aseptičnih pogojih. Pri tem smo z namenom zmanjšanja okužb z nezaželenimi organizmi trte rastlin omočili z etanolom in toplotno obdelali s plamenom. Kot gojišče smo uporabili krompirjev dekstrozni agar, umerjen na pH 4,8 z dodatkom streptomycin-sulfata. Na omenjeno gojišče smo nato nanесли koščke obolelega prevajalnega tkiva rastlin. Po 3-5 dnevni inkubaciji na sobni temperaturi smo s pomočjo svetlobnega mikroskopa na osnovi značilnih konidioforov lahko določili prisotnost gliv iz rodu *Verticillium*.

Na osnovi vizualnega ocenjevanja deleža prizadete listne površine smo rastline uvrstili v naslednje razrede:

- 0 razred: brez bolezenskih znamenj
- 1 razred: 1-20% prizadete listne površine
- 2 razred: 21-40% prizadete listne površine
- 3 razred: 41-60% prizadete listne površine
- 4 razred: 61-80% prizadete listne površine
- 5 razred: 81-100% prizadete listne površine

Bolezenska znamenja prevodnega sistema rastlin smo ugotavljali s prerezom stebela in korenin posameznih rastlin in ocenjevanjem rjavenja tkiva. Pri tem smo uporabili naslednjo skalo:

- 0: brez bolezenskih znamenj
- 1: delno rjavenje
- 2: rjavo celotno tkivo

Skupne ocene za posamezno kulturo smo izrazili v obliki povprečij in določitvijo uspešnosti inokulacije, ki je lahko eden od indikatorjev občutljivosti.

2.1 Izdelava sond in vpeljava mikrobiološke tehnike za določanje uspešnosti postopkov

Osnovo sond so predstavljale 150 ml vreče, ki smo jih izdelali iz dvojne visoko kakovostne poliestrske tkanine (velikost por 16 μ m; Sefar) in jih napolnili s 100 ml homogene mešanice sterilne prsti iz mesta lokacije poskusa in z inokulom glive *V. albo-atrum* v razmerju 60ml : 40ml. Inokulum smo pripravili iz zmletih posušenih delov trt hmelja, ki smo jih čez noč

namakali v raztopini 1 % glukoze in 0,2 % kalijevega nitrata. Namakano zmes smo nato sterilizirali in okužili s kulturami izolatov gliv (*V. albo-atrum* genotip PG2), ki smo jih predhodno namnožili v tekočem umetnem gojišču z 1 tedensko inkubacijo na rotacijskem stresalniku. Sledila je 4 tedenska inkubacija v temi pri sobni temperaturi s tedenskim mešanjem, da smo zagotovili enakomerno razraščanje glive po substratu.

Pred tem smo opravili tudi optimizacijo oz. preizkus različnih selektivnih gojišč za določanje infekcijskega potenciala sond. V ta namen smo za glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* najprej določili rast in selektivnost na treh različnih gojiščih in sicer: NP-10 (Sorensen in sod., 1991), modificiranem Komada mediju (Christen, 1982) in gojišču na osnovi talnega ekstrakta (Harris in sod., 1993). S tehniko serijskih redčitev na izbranem gojišču smo nato določali infekcijski potencial sond v enotah CFU/ml. Pri tem smo posamezno sondo razdeli na dva pod-vzorca (a/b) in ju ločeno analizirali.

2.2 Postavitev poljskega poskusa za določitev primerne tehnologije za deinfestacijo tal

Dvoletni poljski poskus smo iz fitosanitarnih razlogov izvajali na površini, na kateri se je izvajala obvezna karantenska premena. V poskusu smo preizkušali vpliv podora brokolija, sudanske trave in mnogocvetne ljulke na deinfestacijo tal z glivo *V. albo-atrum*. Obenem smo ugotavljali tudi učinek prekrivanja parcel s PVC folijo in učinek gnojenja s hlevskim gnojem. Kot standard smo v poskus vključili parcele brez rastlin in parcele s koruzo in trpežno ljuljko, s katerimi smo simulirali izvajanje standardne karantenske premene. Poskusno polje (0,5 ha) smo razdelili na dve glavni parceli (split-plot zasnova), na katerih smo na enem delu v obeh letih izvedli gnojenje s hlevskim gnojem (20 t). Naredili smo tudi kemično in mehansko analizo tal. Obe glavni parceli smo razdelili na 10 obravnavanj v 4 ponovitvah in velikosti parcel 5 m x 5 m, torej skupaj 80 parcel.

Obravnavanja so bila:

- Sudanska trava (podor)
- Sudanska trava (podor) + prekrivanje s črno PVC folijo
- Brokoli (podor)
- Brokoli (podor) + prekrivanje s črno PVC folijo
- Mnogocvetna ljuljka (podor)
- Mnogocvetna ljuljka (podor) + prekrivanje s črno PVC folijo
- Trpežna ljuljka
- Koruza
- Kontrola prazno
- Kontrola prazno + prekrivanje s črno PVC folijo

Setev (sudanska trava, mnogocvetna ljuljka, trpežna ljuljka, koruza) in saditev (brokoli) rastlin smo izvedli v začetku maja. Rastline smo redno oskrbovali po načelih dobre kmetijske prakse (gnojenje, zalivanje, ustrezno varstvo pred boleznimi, škodljivci in pleveli). Konec meseca julija smo rastline zmulčili in zaorali. Pred tem smo določili težo, višino in gostoto rastlin, da smo lahko ocenili vnos rastlinske mase v tla. Sledila je inštalacija sond, ki smo jih pred glodalci zaščitili z mrežo proti voluharju, na vsako parcelo v globino 20 cm. V

letu 2007 smo na vsako parcelo inštalirali 4 sonde, od katerih smo prvo izkopali in analizirali vsebino konec septembra, ostale 3 pa smo izkopali konec oktobra. Od teh smo vsebino ene analizirali, ostali dve sonde pa shranili pri temperaturi 4°C in ustrezno označili za nadaljevanje poskusa v naslednjem letu. V letu 2008 smo poskus ponovili v enaki zasnovi, v tla ustreznih parcel pa smo vnesli novi 2 sonde kot ponovitev poskusa in 2 sonde, ki sta bili izpostavljeni postopkom v letu 2007 z namenom izpostavitve dvakratnim postopkom in daljšim časovnim obdobju v tleh.

2.3 Vpeljava in razvoj molekularne diagnostične analize za detekcijo *V. albo-atrum* v tleh

V procesu optimizacije izolacije celokupne DNA tal, ki je predpogoj za uspešno analizo, smo preizkusili 3 različne metode:

1. Metoda, ki so jo razvili Volossiouk s sod., 1995 (Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms. Applied and Environment Microbiology, 1995: 3972-3976);
2. Metoda, ki sta jo razvila Lee in Taylor (1990) (Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. V: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky D. H., White J. J., Eds T. J. (eds). San Diego, Academic Press: 282-287);
3. Uporaba komercialnega kompleta: PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.).

Uspešnost posamezne metode smo preizkušali na umetno okuženih tleh, katerim smo dodali okužen substrat v razmerjih: 1: 10000, 1:1000 in 1:100. Koncentracijo in kakovost DNA smo preverjali na agaroznem gelu (1,5%). Izolirano DNA smo uporabili v PCR reakciji, kjer smo v prvi fazi uporabili specifične oligonukleotide za namnoževanje ITS regij ribosomalne DNA gliv (White s sod., 1990), čemur je sledila PCR reakcija z začetnimi oligonukleotidi specifičnimi za glivo *V. albo-atrum* (Nazar in sod., 1991; Robb in sod., 1993). PCR reakcijske mešanice (20 µl) so vsebovale 1× PCR pufer, 0,2 mM vsakega dNTP-ja, 0,5 µM vsakega začetnega oligonukleotida, 1,5 mM MgCl₂ in 0,6 enote encima Taq DNA polimeraze in 20 ng izolirane DNA. Reakcije smo izvajali v PCR napravi MWG Primus 96 po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 4-minutna denaturacija pri 94° C, ki ji sledi 30 ciklov pri 94° C (45 s), 55° C (30 s) in namnoževanje pri temperaturi 72° C (70 s). Vzorce smo ločevali z 1,5 % agarozno gelsko elektroforezo.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 Določanje gostiteljske specifičnosti glive *V. albo-atrum* z umetnimi okužbami

V poskus smo vključili 14 krmnih rastlin (preglednica 1), ki jih pogosto srečamo na naših njivah in za katere smo želeli ugotoviti, ali so lahko gostitelji hmeljnemu patotipu PV1 (genotip PG2) talne glive *V. albo-atrum*. Rastline smo testirali na podlagi umetnih okužb v zaprtih in kontroliranih razmerah rastne komore. V poskusu smo ugotovili, da od vseh testiranih rastlin ni bilo možno okužiti brokolija, s čimer smo potrdili ugotovitve

predhodnih raziskav tujih raziskovalcev o visoki odpornosti te rastline na okužbo z glivami iz rodu *Verticillium* (Subbarao in Hubbard, 1999). Visoko stopnjo odpornosti smo ugotovili tudi pri lucerni, ki je občutljiva samo na specializirano skupino izolatov glive *V. albo-atrum*. Pri ocenjevanju zunanjih in notranjih bolezenskih znamenj pri lucerni na rastlinah nismo opazili reakcij, vendar pa smo prisotnost glive potrdili z reizolacijo oz. mikrobiološko tehniko v zelo nizkem deležu (6,6%) v koreninah. Možno je, da je ta detekcija posledica epifitske rasti te glive na koreninah. Najvišjo stopnjo občutljivosti smo ugotovili pri fižolu, ričku in kuštravi grašici, kjer je prišlo do propadanja in odmiranja rastlin. Pri ostalih rastlinah, ki niso izrazile zunanjih bolezenskih znamenj, smo prisotnost glive večinoma ugotovili v koreninskem sistemu ob visoki stopnji kolonizacije (ocena 2). Kot indikator občutljivosti lahko upoštevamo tudi uspešnost inokulacije, ki je bila pri občutljivih rastlinah med 55,6% in 94%. Najnižja je bila pri brokoli (0%), lucerni (6,6%) in zelju (33%).

Preglednica 1: Rezultati testiranja različnih kmetijskih rastlin na okužbo z glivo *Verticillium albo-atrum* (hmeljni patotip PV1; genotip PG2)

Rastlina	Sorta	Ocena* listja	Ocena* stebila	Ocena* korenin	Uspešnost inokulacije
Navadna (krmna) ogrščica (<i>Brassica napus</i> L. ssp. <i>oleifera</i>)	Starška	2	1	1	72,2%
Inkarnatka (<i>Trifolium incarnatum</i>)	Inkara	1	0	2	55,6%
Zelje (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)	Varaždinsko	0	0	1	33,3%
Fižol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Sivček	4	1	2	75,0%
Riček (<i>Camelina sativa</i>)	/	4	2	2	77,8%
Bela gorjušica (<i>Sinapis alba</i> L. subsp. <i>alba</i>)	Zlata	2	2	2	58,3%
Oljna redkev (<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>oleiformis</i>)	Raula	1	1	2	88,9%
Krmna repica (<i>Brassica campestris</i>)	Perko	1	0	2	66,7%
Kuštrava grašica (ozimna) (<i>Vicia villosa</i>)	Hungvillosa	3	2	2	94,1%
Lucerna (<i>Medicago sativa</i>)	Soča	0	0	0	6,6%
Oljna ogrščica (<i>Brassica napus</i> var. <i>oleifera</i>)	Smart	0	0	1	66,7%
Brokoli (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)	Corvet F1	0	0	0	0,0%
Črna detelja (<i>Trifolium pratense</i>)	/	0	0	1	66,7%
Facelija (<i>Phacelia tanacetifolia</i>)	/	0	1	1	83,3 %

*Povprečna vrednost okuženih rastlin, pri katerih smo z reizolacijo potrdili pristnost glive.

Na osnovi rezultatov poskusa lahko zaključimo, da je patotip PG2 glive *V. albo-atrum* zelo patogen, saj lahko okužuje veliko število rastlin iz različnih rodov. Testirane rastline, razen brokolija in lucerne, tako niso primerne za sajenje na karantenskih premenah, saj lahko gliva na njih preživi in se tako ohranja v tleh. Kljub zmožnosti glive, da okužuje veliko število dvokaličnic, je potrebno v prihodnosti nadaljevati s testiranjem, ki bi razkrila potencialne rastline za pridelovanje na karantenskih premenah.

3.2 Optimizacija metode za določanje infekcijskega potenciala sond

Pri optimizaciji mikrobiološke analize smo preizkusili tri različna gojišča, ki se najpogosteje omenjajo v literaturi za analize talnega infekcijskega potenciala gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* (preglednica 2). Gojišča smo pripravili v petrijevkah, na katere smo nacepili kulture obeh gliv. V času inkubiranja (10 dni) smo spremljali rast in razvoj kolonij, pri čemer smo vsak postopek opravili v 4 ponovitvah. Rast in obliko kolonij na testiranih gojiščih smo primerjali s standardnim gojiščem krompirjevim agarjem. Vsa gojišča smo preizkusili tudi pri analizi sond in ocenili selektivnost na osnovi prisotnosti ter rasti bakterij, aktinomycet in ostalih gliv. Oba parametra smo ocenili s skalo od 0-5. Na osnovi analiz smo najboljše rezultate dosegli pri modificiranem Komada medij (Christen, 1982), ki smo ga izbrali za analize sond.

Preglednica 2: Preizkušanje različnih specifičnih gojišč za primernost analiz z glivo *V. albo-atrum* in *V. dahliae*

Gojišče	Gliva	Hitrost rasti	Selektivnost
NP-10 (Sorensen in sod., 1991)	<i>V. albo-atrum</i>	3	2
	<i>V. dahliae</i>	1	3
Modificiran Komada medij (Christen, 1982)	<i>V. albo-atrum</i>	3	4
	<i>V. dahliae</i>	1	4
Talni ekstrakt (Harris in sod., 1993).	<i>V. albo-atrum</i>	1	2
	<i>V. dahliae</i>	1	2
Krompirjev agar (kontrola)	<i>V. albo-atrum</i>	5	0
	<i>V. dahliae</i>	5	0

3.3 Preizkušanje različnih tehnologij za deinfestacijo tal

V dvoletnem poskusu smo preizkušali uspešnost različnih tehnologij, s katerimi lahko pospešimo nižanje infekcijskega potenciala talnih gliv (slika 1). Določali smo vpliv zaoravanja ostankov mnogocvetne ljuljke, brokolija in sudanske trave na padec infekcijskega potenciala glive *V. albo-atrum*. Poleg tega smo ugotavljali tudi vpliv prekrivanja parcel s PVC folijo in učinek gnojenja s hlevskim gnojem. Kot standard smo v poskus vključili parcele brez rastlin in parcele s koruzo ter trpežno ljuljko, s katerimi smo simulirali izvajanje standardne karantenske premene. V obeh letih smo pred mulčenjem in zaoravanjem določili težo, višino in gostoto rastlin, da smo lahko ocenili vnos rastlinske mase v tla (preglednica 3; preglednica 4).

Preglednica 3: Meritve vnosa organske mase v tla v času podora v letu 2007

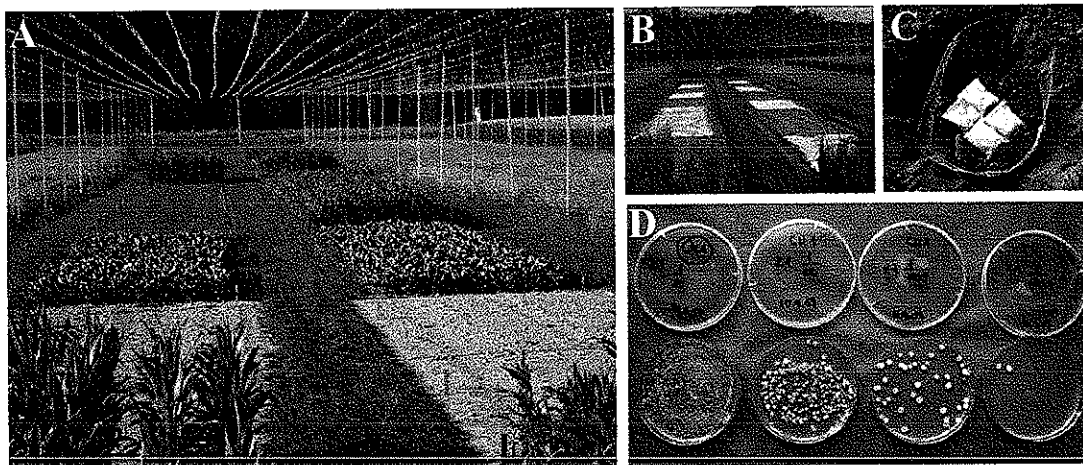
Rastlina	Gnojeno/ negnojeno	^a Povp. višina (cm)	^a Povp. število rastlin/m ²	^a Povp. masa 1 rastline(g)
Sudanska trava	gnojeno	132	13	167,5
	negnojeno	127	13	118,8
Brokoli	gnojeno	52,5	6	716,5
	negnojeno	46,7	6	534,7
Mnogocvetna ljudjka	gnojeno	54,5	vzorec 20 cm x 20 cm	173,34
	negnojeno	45,5	vzorec 20 cm x 20 cm	98,86

^aPovprečje osnovano na meritvah v 4 ponovitvah.

Preglednica 4: Meritve vnosa organske mase v tla v času podora v letu 2008.

Rastlina	gnojeno/ negnojeno	^a Povp. višina (cm)	^a Povp. število rastlin/m ²	^a Povp. masa 1 rastline(g)
Sudanska trava	gnojeno	153	18	285,16
	negnojeno	149	18	215,57
Brokoli	gnojeno	44	6	799,26
	negnojeno	43	6	517,90
Mnogocvetna ljudjka	gnojeno	39	vzorec 20 cm x 20 cm	294,92
	negnojeno	37	vzorec 20 cm x 20 cm	270,03

^aPovprečje osnovano na meritvah v 4 ponovitvah.



Slika 1: Preizkušanje različnih tehnologij za deinfestacijo tal: A - Poskusno polje pred zaoravanjem rastlinske mase; B - poskusno polje po zaoravanju in vnosu sond; C- sonde s substratom glive *V. alboatrum*; D – Laboratorijska metoda analiziranja sond.

Uspešnost posameznih postopkov smo merili s sondami, v katerih smo imeli znan infekcijski potencial omenjene glive. Sonde smo v obeh letih izkopali v dveh časovnih intervalih in nato laboratorijsko izmerili infekcijski potencial (IP). Pri tem smo vsako sondo razdeli na dva pod-vzorca (a/b) in ju ločeno analizirali. Infekcijski potencial sond smo določili kot povprečno vrednost obeh pod-vzorcev in ga izrazili v enotah CFU/g. Infekcijski potencial sond izdelanih v letu 2007 je pred vnosom v tla znašal 525 CFU/g substrata, v letu 2008 pa 150 CFU/g. Po mesecu dni izpostavljenosti na kontrolnih parcelah, kjer ni bilo posevka in aplikacije hlevskega gnoja, je IP v primeru sond iz leta 2007 padel na 24 CFU/g, ter na 2 CFU/g pri sondah iz leta 2008. Razlog za takšen padec je najverjetneje v stabilizaciji kulture v talnih razmerah in propadu določenega dela kulture, ki se je ohranjal na ostankih umetnega gojišča.

Preglednica 5: Rezultati poskusa določanja vpliva različnih posevkov na zmanjšanje infekcijskega potenciala glive *Verticillium albo-atrum* v tleh

Posevek	PVC folia (+/-)	Gnojenje (+/-)	Infekcijski potencial (CFU/g x 10 ⁴)					
			Sonde 2007**				Sonde 2008***	
			1. vzor.	2. vzor.	3.vzor.	4.vzor.	1. vzor.	2. vzor.
Brez posevka	-	-	22,44	13,85	0,05	0,27	1,75	1,15
	+	-	0,50	0,31	0,44	0,26	0,21	0,10
	-	+	18,65	10,80	0,20	0,66	1,85	1,30
	+	+	3,74	0,44	0,32	0,76	0,04	0,80
Brokoli	-	-	17,80	3,65	0,82	1,00	6,35	4,30
	+	-	6,36	0,70	1,68	1,50	5,50	0,32
	-	+	25,15	9,25	1,22	1,75	2,65	2,00
	+	+	2,62	0,99	1,05	0,60	0,40	0,30
Sudanska trava	-	-	14,39	7,45	0,57	0,57	6,00	1,55
	+	-	7,80	0,65	0,18	0,46	0,55	2,33
	-	+	16,42	11,45	0,54	1,10	2,05	1,15
	+	+	1,38	7,50	2,75	2,00	0,65	1,55
Mnogocvetna ljulka	-	-	19,70	13,65	0,96	0,97	4,55	10,75
	+	-	0,26	1,31	0,43	0,32	1,38	1,86
	-	+	29,20	14,85	0,28	1,48	6,68	3,35
	+	+	9,15	3,75	0,76	0,86	0,28	0,30
Koruza*	-	-	33,80	4,85	0,22	0,26	26,00	40,50
	-	+	47,00	25,40	1,76	1,25	17,70	6,50
Trpežna ljulka*	-	-	12,90	6,00	0,37	0,75	2,15	0,89
	-	+	21,30	9,60	0,36	1,57	4,00	12,50

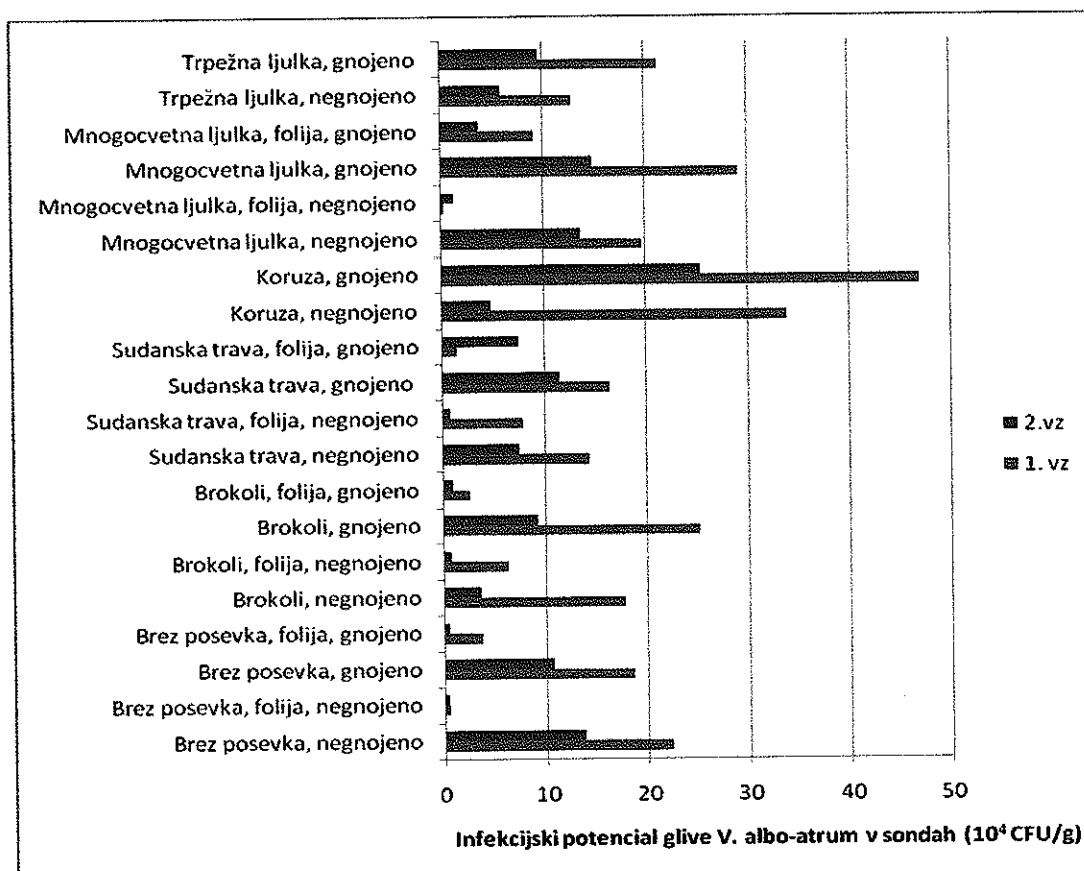
*Standard: Simulacija izvajanja standardne karantenske premene pri katerih nismo izvedli podora.

** Sonde izdelane v letu 2007; 1. vzorčenje (28. 9. 2007), 2. vzorčenje (28.10.2007), 3. vzorčenje (4. 9. 2008), 4. vzorčenje (6.10. 2008)

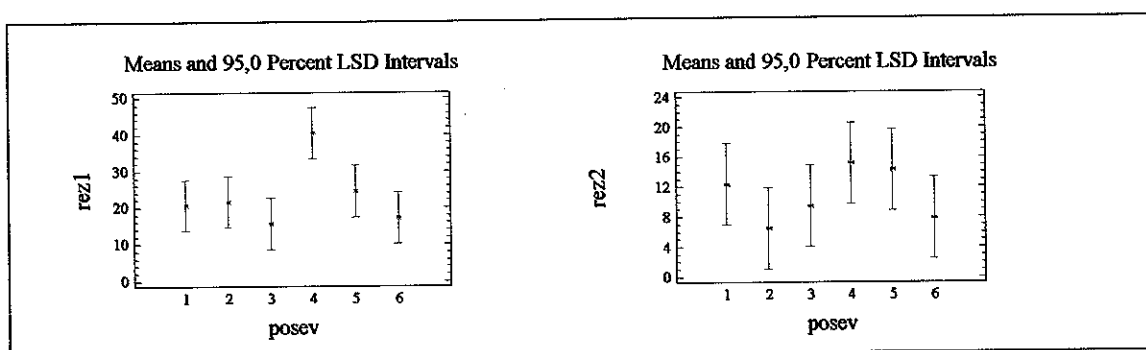
*** Sonde izdelane v letu 2008; 1. vzorčenje (4. 9. 2008), 2. vzorčenje (6.10. 2008)

Pridobljene podatke smo ustrezno statistično obdelali z več-faktorsko analizo variance (ANOVA; program Statgraphic plus 4.0). Rezultati analize sond, izdelanih v letu 2007, ki smo jih izkopali v istem letu, so pokazale močan in dokazljiv vpliv uporabe PVC folije, in sicer so se vrednosti infekcijskega potenciala (CFU/g) zelo zmanjšale ob prekrivanju parcel s folijo (grafikona 1 in 3). Pri tem nismo zaznali bistvenega vpliva posevka (brokoli, sudanska trava, mnogocvetna ljulka in brez posevka) ter vpliva gnojenja s hlevskim gnojem, ne glede na čas vzorčenja. Pri primerjalni analizi vseh obravnavanj, v

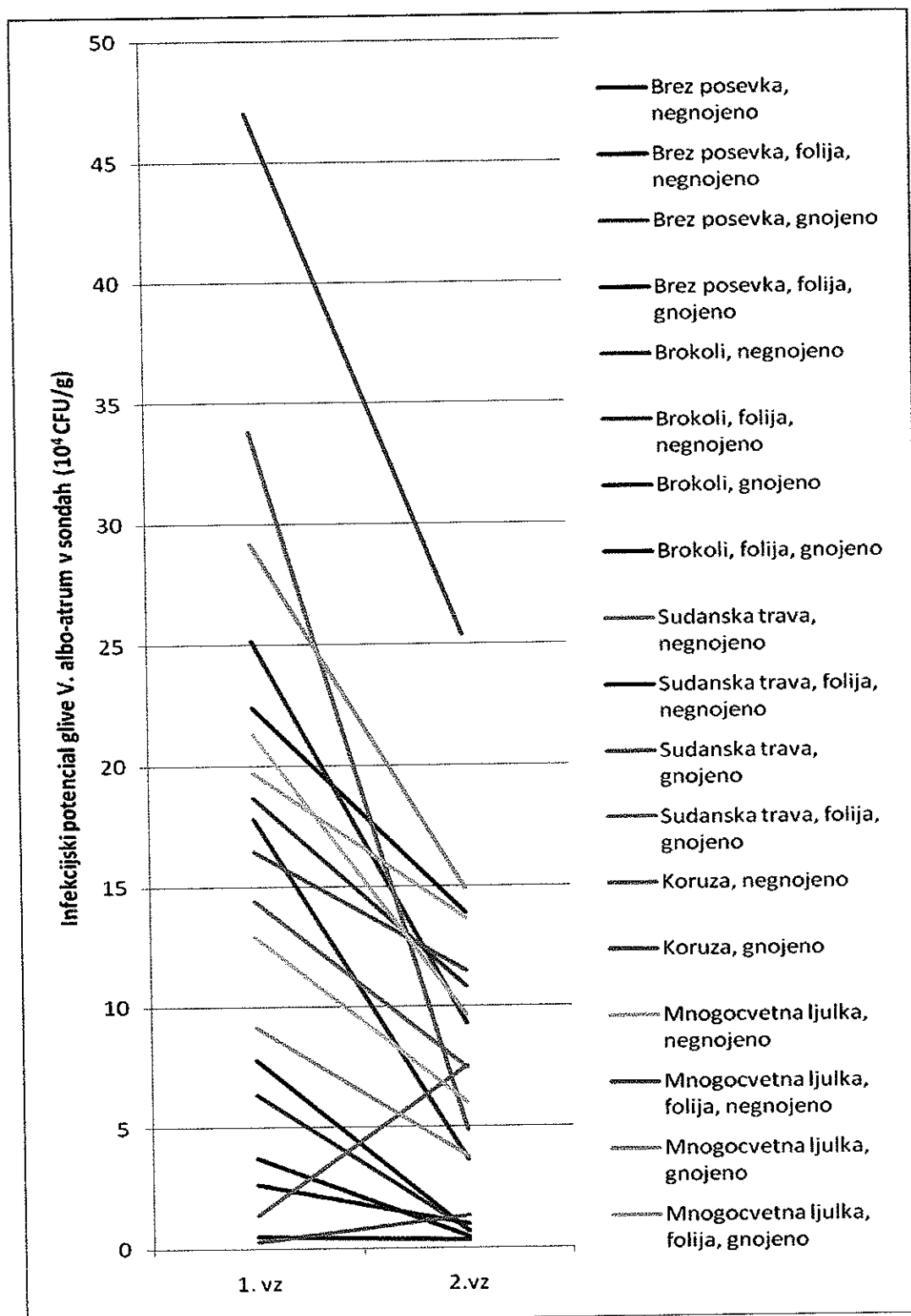
katero smo vključili tudi parcele, posajene s koruzo in trpežno ljuljko, katere nismo zaoravali, smo pri analizi rezultatov prvega vzorčenja ugotovili statistično značilno slabše padanje infekcijskega potenciala pri koruzi (grafikon 2). Ta razlika med koruzo in ostalimi posevki se je v času drugega vzorčenja nekoliko zmanjšala, vendar ostala v primerljivem razmerju (grafikona 1 in 3).



Grafikon 1: Rezultati učinkovitosti različnih postopkov za zniževanje infekcijskega potenciala glive *V. albo-atrum* v tleh v letu 2007 (palični pogled)

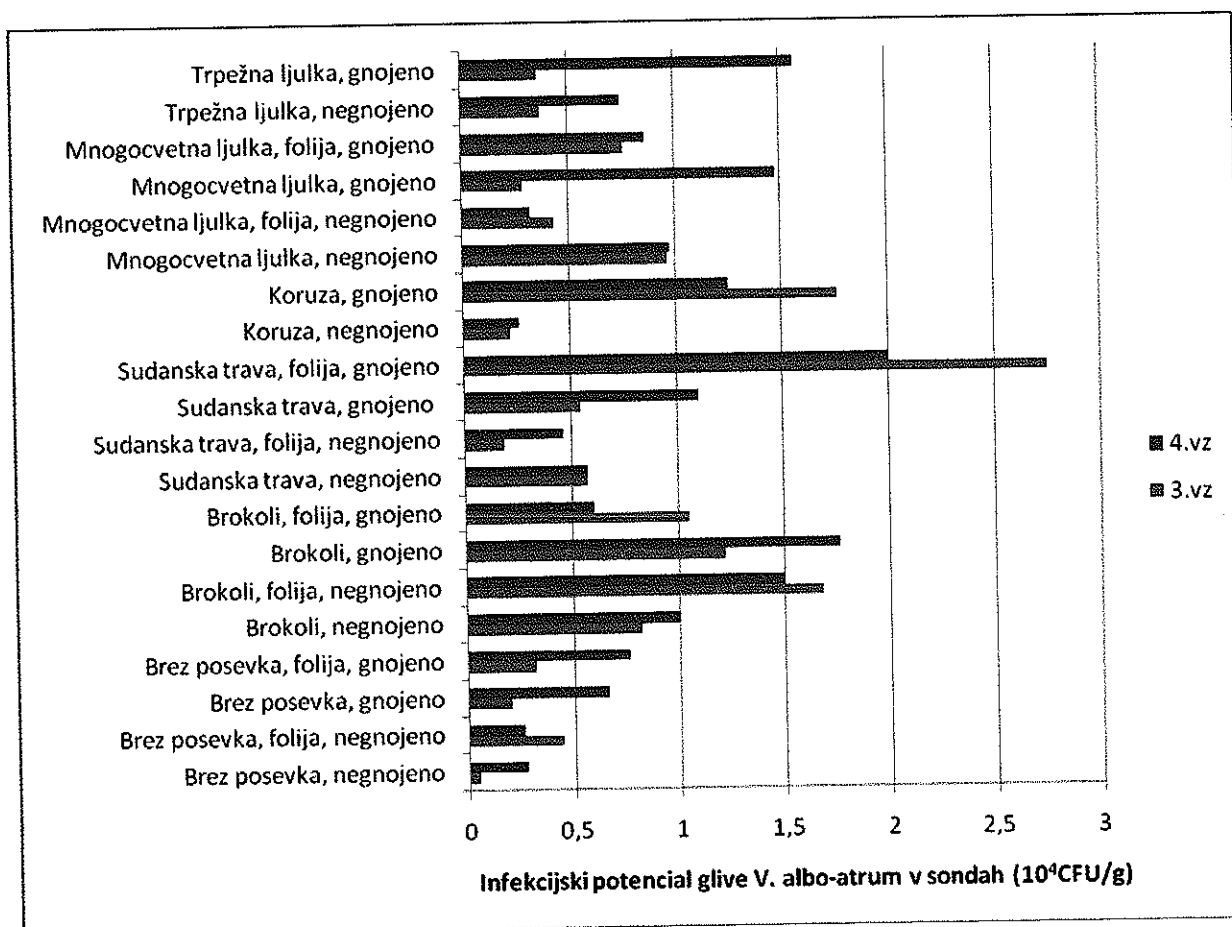


Grafikon 2: Vpliv posevkov na zniževanje infekcijskega potenciala glive *V. albo-atrum* v tleh v letu 2007 glede na vzorčenje; (rez1 = 1 vzorčenje, rez2 = 2 vzorčenje, 1 = brez posevka, 2 = brokoli, 3 = sudanska trava, 4 = koruzza, 5 = mnogocvetna ljuljka, 6 = trpežna ljuljka)



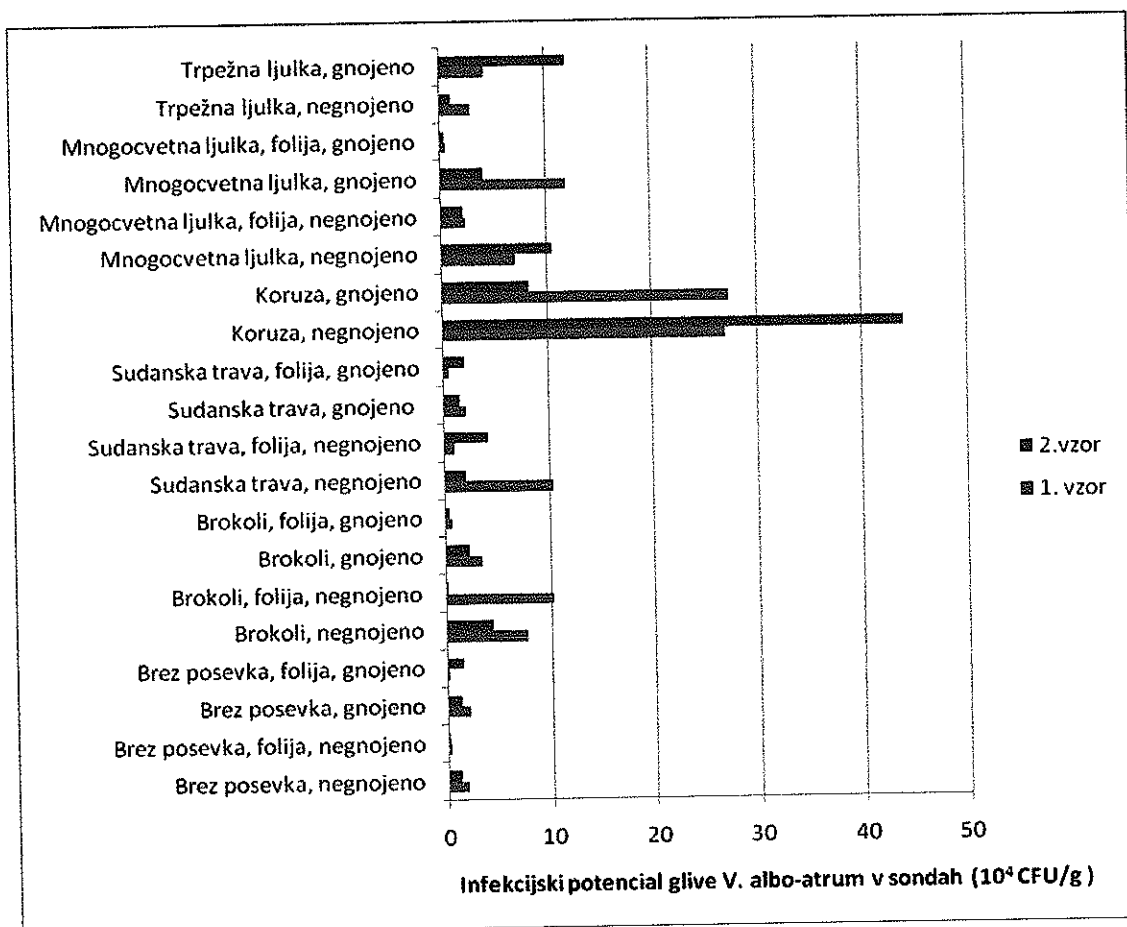
Grafikon 3: Rezultati učinkovitosti različnih postopkov za zniževanje infekcijskega potenciala glive *V. albo-atrum* v tleh v letu 2007 (vrstični pogled).

Pri analizi sond, izdelanih v letu 2007, ki smo jih izpostavili enakim postopkom v letu 2007 in 2008, smo potrdili učinkovitost folije, medtem ko značilnega vpliva posevka in gnojenja nismo zaznali. V povprečju so se pri vseh obravnavanjih CFU vrednosti znižale na zelo nizko raven, vendar pri nobenem nismo potrdili popolnega propada glivne kulture (grafikon 4).

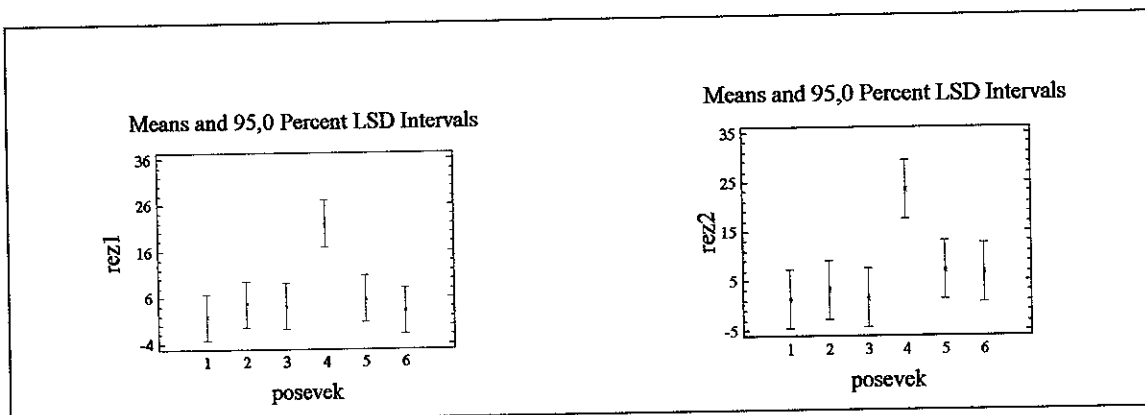


Grafikon 4: Rezultati učinkovitosti različnih postopkov za zniževanje infekcijskega potenciala glive *V. albo-atrum* v tleh pri analizi sond, ki smo jih izpostavili postopkom v letu 2007 in 2008.

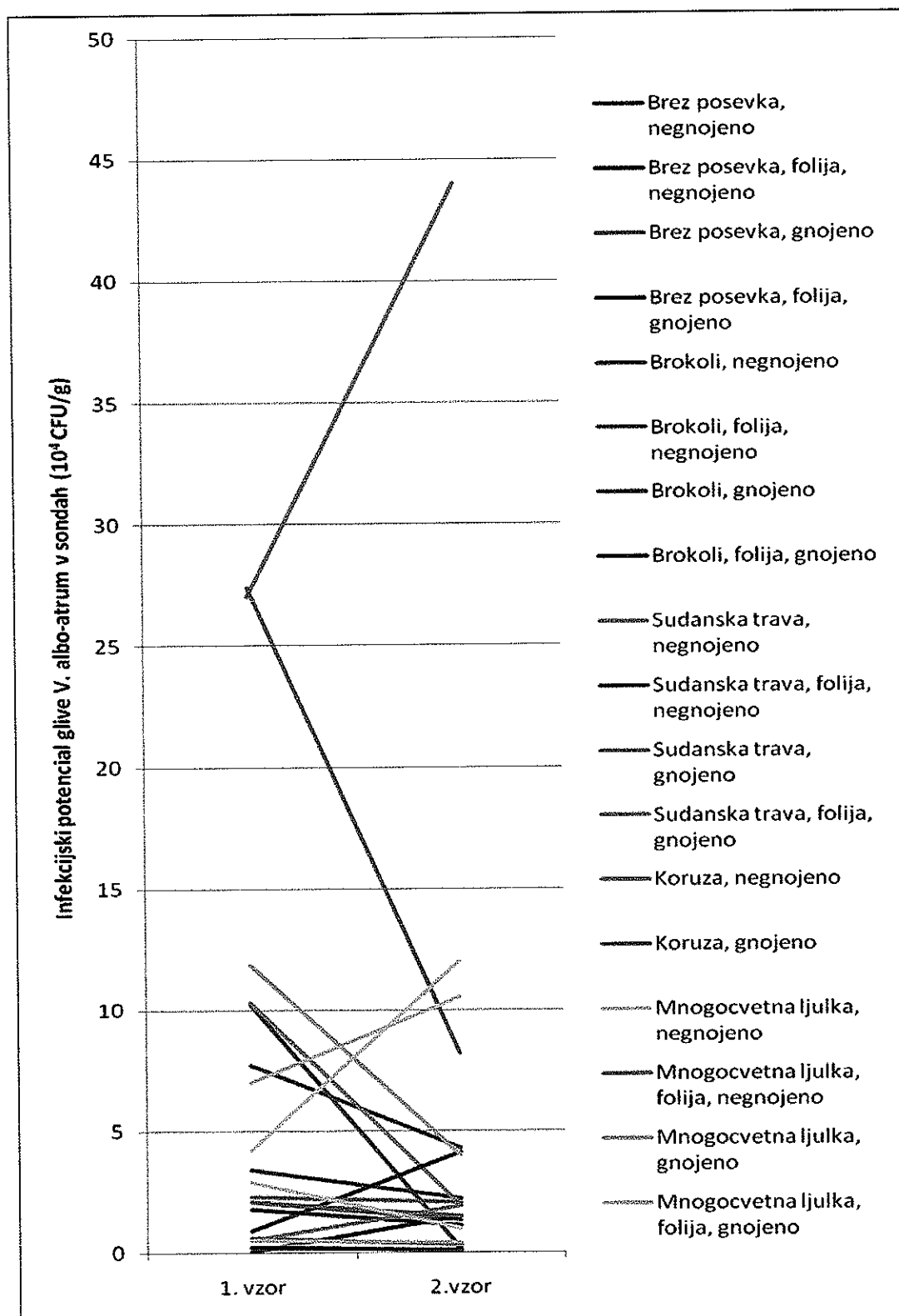
Pri analizi sond, izdelanih v letu 2008 in izpostavljenih v istem letu, smo dobili primerljive rezultate s poskusom v letu 2007. Statistično značilno smo potrdili močan vpliv PVC folije na zniževanje infekcijskega potenciala, vendar brez značilnega vpliva posevka (brokoli, sudanska trava, mnogocvetna ljulka in brez posevka) ter gnojenja s hlevskim gnojem. Ob primerjavi vseh obravnavanj, kjer sta vključeni tudi koruza in trpežna ljulka, ki predstavljata simulacijo standardne karantenske premene, se je koruza ponovno pokazala kot rastlina z najslabšim učinkom (grafikoni 5, 6, 7).



Grafikon 5: Rezultati učinkovitosti različnih postopkov za zniževanje infekcijskega potenciala glive *V. albo-atrum* v tleh v letu 2008 (palični pogled).



Grafikon 6: Vpliv posevkov na zniževanje infekcijskega potenciala glive *V. albo-atrum* v tleh v letu 2008 glede na vzorčenje; (rez1 = 1 vzorčenje, rez2 = 2 vzorčenje, 1 = brez posevka, 2 = brokoli, 3 = sudanska trava, 4 = koruza, 5 = mnogocvetna ljulka, 6 = trpežna ljulka).



Grafikon 7: Rezultati učinkovitosti različnih postopkov za zniževanje infekcijskega potenciala glive *V. albo-atrum* v tleh v letu 2008 (vrstični pogled)

Na osnovi rezultatov dvoletnega poljskega poskusa in testiranja sond lahko povzamemo, da smo najvišjo stopnjo učinkovitosti znižanja infekcijskega potenciala dosegli z metodo solarizacije oz. prekrivanja tal s PVC folijo. S to tehniko povzročimo segrevanje tal v globini ornice tudi do 40°C in posledično dosežemo odmiranje večine mezofilnih organizmov, med katere spadajo rastlinski patogeni in škodljivci, ne prizadene pa koristnih mikoriznih gliv in bakterij. Učinkovitost te metode je precej odvisna od vremenskih razmer, zato se večinoma uporablja v kombinaciji s fungicidi ali rastlinami s fungistatičnim učinkom. V našem poskusu nismo zaznali značilnih razlik med učinki brokolija, ki izloča glukozinulate, sudansko travo, ki izloča cianovodik, in mnogocvetno ljuljko na zniževanje infekcijskega potenciala (IP) glive *V. alboatrum*. Vendar smo s temi rastlinami in postopki zaoravanja dosegli značilno boljše rezultate kot pri koruzi, ki je v poskusu predstavljala standardni posevek in se priporoča ter tudi najpogosteje uporablja na karantenskih premenah. Pri ugotavljanju vpliva gnojenja s hlevskim gnojem nismo zaznali statistično značilnega vpliva, vendar smo v prvem letu zaznali celo rahel negativen učinek pri večini postopkov, kar pa se je v enakem obsegu v drugem letu poskusa spremenilo v pozitiven vpliv na nižanje IP. Na podlagi rezultatov talne analize smo zaznali povečanje vsebnosti organske mase v tleh, kar je najverjetneje razlog za spremembo in izboljšanje mikrobiološke slike tal in posledičnega vpliva na nižanje IP. S poskusom smo ugotovili, da s kombinacijo solarizacije in ustreznih podorin uspemo močno znižati IP, vendar pa v nobenem primeru nismo uspeli izničiti prisotnosti glive v sondah, kar nakazuje na trdovratnost te glive in praktično nezmožnost popolne eliminacije iz tal. To potrjuje tudi dejstvo, da tudi po 4 in več letnem izvajanju premene v novih nasadih hmelja prihaja do ponovitve bolezenskih izbruhov.

V poskusu je pomembno izpostaviti tudi tehnične in ekonomske vidike uporabe omenjenih postopkov. Tako kljub dobrim rezultatom ne pričakujemo, da bodo hmeljarji sprejeli postopke solarizacije na večjih površinah, predvsem zaradi visokega stroška PVC folije in stroška odpada. Je pa to metoda, ki najbolj....

Tako je glede na ugotovitve poskusov in ekonomičnosti trenutno smiselno izvajati naslednje postopke s katerimi lahko skrajšamo čas trajanja 4 letne karantenske premene:

- V primeru nasadov, kjer je bila okužba omejena na del nasada (posamezna poljina), je smiselno po uničenju izvesti vsaj en postopek solarizacije v kombinaciji z mulčenjem in podorom sudanske trave, mnogocvetne ljuljke ali brokolija. Pri tem je pomembno, da sudanska trava pred mulčenjem ne preseže višine 150 cm, zaradi kasnejšega nižanja vsebnosti alkaloida v tej rastlini. Tla naj bodo s folijo prekrita najmanj 6 tednov. Tem postopku naj sledi setev ozimnega žita ali sudanske trave za podor.

I. Primer postopka nižanja IP ob uporabi solarizacije in zelenega podora:

Leto uničenja	Po obiranju hmelja uničenje nasada sledi setev ozimnega žita.
1. leto	Po žetvi žita setev mnogocvetne ljuljke.
2. leto	V juniju mulčenje in zaoravanje celotne mase mnogocvetne ljuljke ter prekrivanje tal s PVC folijo (solarizacija minimalno 6 tednov). Sledi setev sudanske trave ali brokolija za zeleni podor.
3. leto	Sajenje hmelja.

II. Primer postopka nižanja IP ob uporabi solarizacije in zelenega podora:

Leto uničenja	Po obiranju hmelja uničenje nasada sledi setev mnogocvetne ljuljke.
1. leto	V juniju mulčenje in zaoravanje celotne mase mnogocvetne ljuljke ter prekrivanje tal s PVC folijo (solarizacija minimalno 6 tednov). Sledi setev ozimnega žita.
2. leto	Po žetvi žita sledi setev sudanske trave ali brokolija za zeleni podor.
3. leto	Sajenje hmelja.

- V primeru nasadov, kjer je okužba bila zelo razširjena in se je uničila večja površina tal, je smiselno izvajati kombinacijo pridelave ozimnih in jarih žit s podorom sudanske trave ali brokolija.

I. Primer postopka nižanja IP ob uporabi zelenega podora:

Leto uničenja	Po obiranju hmelja uničenje nasada sledi setev ozimnega žita.
1. leto	Po žetvi žita sledi setev sudanske trave/brokolija za zeleni podor.
2. leto	Setev jarega žita in setev sudanske trave/brokolija za zeleni podor.
3. leto	Sajenje hmelja.

3.4 Vpeljava in razvoj diagnostične analize za detekcijo *V. albo-atrum* v tleh

Pri razvoju rutinske metode testiranja smo največji delež aktivnosti posvetili optimizaciji izolacije kakovostne talne DNA, ki je predpogoj za nadaljevanje uspešne analize. Pri tem smo preizkušali tri različne metode (Volossiuk s sod., 1995, Lee in Taylor, 1990 in komercialni komplet PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit, BIO Laboratories, Inc.). Uspešnost posamezne metode smo preizkušali na umetno okuženih tleh, katerim smo dodali okužen substrat v razmerjih: 1: 10000, 1:1000 in 1:100. Pri vseh metodah smo izolirali od 40-80ng DNA/ μ l ne glede na okužen substrat. Izolirano DNA smo uporabili v PCR reakciji, kjer smo uporabili specifične oligonukleotide za namnoževanje ITS regij ribosomalne DNA gliv (White s sod., 1990). Pri delu smo dobili zelo slabe signale ali teh nismo zaznali. Izolacije smo večkrat ponovili, vendar signalov nismo uspeli izboljšati. Razlog lahko iščemo v inhibiciji PCR reakcije, ki jo bomo v nadaljnjem delu poskušali odstraniti z določenimi modifikacijami DNA izolacij. Delo bomo poskušali nadaljevati v okviru strokovnih nalog in na ta način čimprej zagotoviti pridelovalcem možnost talnega testiranja.

Viri

- Bailey K.L., Lazarovits G. 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and Tillage Research* 72: 169-180.
- Blok W.J., Lamers J.G., Termorshuisen A.J., Bollen G.J. 2000. Control of soilborne plant pathogen by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology* 90: 253-259.
- Brown P.D., Morra M.J. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-conining plants. V: *Advances in Agronomy*, VI 61. Sparks D.L. (ed), Academic Press, New York
- Christen A.A. 1982. A selective medium for isolating *Verticillium albo-atrum* from soil. *Phytopathology* 72: 47-49
- Dolinar M., Simončič A. 1999. Hmeljeva uvelost (*Verticillium albo-atrum* Reinke at Berthold in *Verticillium dahliae* Klebhan) v Sloveniji. *Hmeljar*, 3-4: 32-36
- Harris D.C., Yang J.R., Ridout M.S. 1993. The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil. *Plant Pathology* 42: 238-250
- Hawke M.A., Lazarovits G. 1994. Production and manipulation of individual microsclerotia of *Verticillium dahliae* for use in studies of survival. *Phytopathology* 84: 883-890
- Katan J. 2000. Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. *Crop Protection*, 19: 725-731
- Martin R.R., James D., Lavesque C.A. 2000. Impact of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 38: 27-239
- Pegg G.F., Brady B.L. 2002. *Verticillium Wilts*. Wallingford, CABI Publishing: 552 str.
- Perez-Artez E., Mecado-Blanco J., Ruz-Carrillo A.R., Rodriguez-Jurado D., Jimenez-Diaz R.M., 2005. Detection of the defoliating and non-defoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in artificial and natural soils by nested PCR. *Plant and Soil* 265: 349-356
- Sorensen L.H., Scheider A.T., Davis J.R. 1991. Influence of sodium polygalacturonate sources and improved recovery of *Verticillium* spp. From soil. *Phytopathology* 81: 1347
- Subbarao K.V., Hubbard J.C. 1999. Evaluation of Broccoli Residue Incorporation into Field Soil for *Verticillium* wilt Control in Cauliflower. *Plant Disease* 83: 124-129
- Volossiouk T., Robb E.J., Nazar R. N. 1995. Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology* 11: 3972-3976
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: Innis M.A., Gefland D.H., Sninsky J.J., White T.J (Eds.). *PCR Protocols. A guide o Methods and Application*. San Diego,CA, USA: Academic Press, 315-322
- Wiggins E.B., Kinkel L.L. 2005. Green manures and crop sequences influence alfalfa root rot and pathogen inhibitory activity among soil-borne steptomycetes. *Plant and Soil*, 268: 271-283.