

Inž. Ema Groman

Poljoprivredni fakultet, Zagreb

## IZVJEŠTAJ

### O ISPITIVANJU VIRULENTNOSTI GLJIVE *HELMINTHOSPORIUM TURCICUM* PASS, IZAZIVAČA SIVE PJEGAVOSTI LISTA KUKURUZA

#### UVOD

*Helminthosporium turcicum* Pass. je parazitsko gljivično oboljenje kukuruza, na čijim listovima izaziva široke sive ovalno-dugoljaste mrlje, paralelne nervaturi lista. Ovaj gljivični parazit izaziva uvenuće lišća poznato pod imenom paleži, a također i čađavosti uslijed tamnih fruktifikacija na lišću, koje su često vrlo brojne i bujne.

Eksperimenti na ispitivanjima virulentnosti ove gljive provedeni su na terenu i u laboratoriju na kukuruзу pomoću umjetno izazvane epifitocije sa uzročnikom ove bolesti *Helminthosporium turcicum* Pass., kroz više godina (1959.—1962.), sa ciljem da se utvrde otporne linije kukuruza na ovu bolest kako bi dobivene najotpornije linije mogle dalje poslužiti za ukrštavanje kukuruza na otpornost novih sorata, odnosno hibrida.

Budući da se u ranijim ispitivanjima kod nas provedenim (1959. god.) zapažala izvjesna razlika u napadu ovog parazita na jednu te istu liniju kukuruza, to se uz promatranje 1. agroklimatskih uslova pokušalo slijedećih godina uporedo i sa utvrđivanjem; 2. patogeniteta, odnosno virulentnosti samog uzročnika, tj. njegove sposobnosti za infekciju kulturne biljke.

1. Što se tiče agroklimatskih uslova, zapaženo je kroz višegodišnje ocjenjivanje napada umjetne infekcije kod nas na terenu da umjerena temperatura, te česte kiše i rose za vrijeme vegetacije vrlo pogoduju širenju ove bolesti.

2. Isto tako kod nas su studirane kulturalne i patogene promjene izolata dobivenih iz sive pjegavosti lista kukuruza pri čemu je utvrđeno, da se uzročnik *Helminthosporium turcicum* Pass. razlikuje u virulentnosti, no te razlike nisu bile uniforme iz godine u godinu.

Variranja napada bolesti na istoj liniji kukuruza kroz razne vegetacijske sezone ispitivana kod nas bila su vrlo signifikantna iz kojeg se razloga pristupilo ispitivanju varijabiliteta virulentnosti navedenog parazita, pošto je varijabilnost u patogenitetu uzročnika ove bolesti u pravilu odgovorna za veću ili manju otpornost i same linije kukuruza.

Već tokom prvih izolacija ovog uzročnika kod nas i njegovog uzgoja na umjetnom supstratu (2% krumpir — dekstrozni agar) zapažene su signifikantne razlike u kulturalnim karakteristikama i to u boji, bujnosti kulture, produkciji konidija i dr. Isto su tako precjepeljivanjem na isti supstrat zapaženi razni saltanti u uzgoju čiste kulture ove gljive, koji su se značajno razlikovali od roditeljske kulture, kako u morfologiji, tako i u fiziologiji (virulentnosti).

3. Otpornost kukuruza prema toj gljivičnoj bolesti, kako je to studirano i utvrđeno u Sjedinjenim Američkim Državama genetski određuje nekoliko gena, tako da je koncentracija gena na otpornost prema ovom parazitu studirana u 9 generacija, pri čemu su dobiveni i različiti rezultati. No, dosada nije utvrđena nijedna linija kukuruza, koja bi bila imuna prema toj bolesti, što znači da za sada postoje samo manje ili jače otporne linije.

#### MATERIJAL I METODA RADA

Izolacije gljive *Helminthosporium turcicum* Pass. u našem ispitivanju uzete su sa napadnutog lišća kukuruza iz 7 raznih lokaliteta u NRH kroz period od 4 godine. Izolati su uzgajani na umjetnom supstratu, na 2% krumpir — dekstroz-

nom agaru, u Petrijevim posudama. Spore (konidije) za izolacije dobivene su sa mrlja lišća kukuruza prirodno inficiranog sa gljivom *Helminthosporium turcicum* Pass. koje su mrlje stavljane u vlažnu komoru kod temperature od 15° C u trajanju od 24—96 sati. Pomoću sterilne igle za mikroskopiranje spore (konidije) prenošene su pojedinačno sa nosioca konidija (konidiofora) na tvrdi agar u Petrijeve posude na koji su način dobivene čiste kulture monokonidijskog tipa ove gljive. Osim toga izvršena je izolacija i hifalnog tipa kulture ove gljive na taj način, da su konidije stavljane najprije na klijanje u viseću kap (u tzv. van Thiegemove komore), te nakon što se isključila hifa (nit klice vegetativnog tijela gljive) počela razgranjavati vršeno je rezanje dijelova hife koristeći se oštrim sterilnim skalpelom i konačno izvršeno prenošenje djelova hifa na umjetno hranjivi supstrat. Svaki dio hife isključale iz jedne jedine stanice stavljen je u jednu Petrijevku. Na taj način dobivena su dva tipa uzgoja čiste kulture ove gljive i to:

a) monokonidijski tip kulture uzgojen iz jedne jedine konidije;

b) hifalni tip kulture, uzgojen od dijelova hife jedne jedine isključale konidije.

Ispitivanja i promatranja čistih kultura ove gljive vršena su u oba tipa u Petrijevim posudama veličine promjera 100 mm na istom umjetnom supstratu (2% krumpir — dekstrozni agar) uzgojenih u termostatu kod iste temperature od 25° C, kao optimalne za razvoj gljive.

Monokonidijski tip ove gljive izrastao na gore navedenom hranjivom supstratu poslužio je kao inokulum za test na virulentnost u poljskim pokusima.

Inokulum je pripremljen na taj način, da su čiste kulture ove gljive iz dviju Petrijevih posuda zajedno sa hranjivom podlogom — agarom mješane dvije minute na situ u cca 200 ccm destilirane vode, te nakon dobrog homogeniziranja ovog materijala, dodana je voda u količini do 1 lit.

Test na virulentnost odnosno na patogenitet ove gljive, izvršen je i u stakleniku na kukuruзу vrlo osjetljivom na ovu bolest sa oznakom (Botinec — linija A-188).

Prva inokulacija kukuruza u polju izvršena je u vrijeme kada su biljke kukuruza bile u visini od 30—50 cm tj. u vrijeme 10—14 dana prije izbacivanja mrljica, dok je druga inokulacija izvršena sedam dana nakon prve (po metodi Ullstrup). Svaki se test sastojao od dvije repeticije sa po 10 biljaka u redu, tj. ukupno 20 biljaka.

Inokulacije u stakleniku izvršene su prskanjem inokuluma na mlade biljke kukuruza u stadiju od 5—6 lista, koje su rasle u loncima veličine promjera 8 cm u steriliziranoj zemlji. Inokulirane biljke smještene su odmah iza inokulacije u vlažnu komoru kod temperature od 24—29,4° C u trajanju od dva dana (48 sati), a nakon toga premještene u staklenik kod temperature između 24 i 32° C.

Prva zapažanja i očitavanja pokusa u polju vršena su u vrijeme kada se početna infekcija sasvim razvila što je uobičajeno uslijedilo od 14—17 dana nakon izvršene prve inokulacije što je redovno uvijek uslijedilo prije početka sekundarnih infekcija. Ocjena virulentnosti izvršena je u više stupanja napada i to od 0,5—5.

Stupanj virulentnosti, koji je bio utvrđen za pojedini test i interpretiran kao vrijednosni faktor virulentnosti pomnožen je sa postotkom inficiranih listova na koji je način dobivena jačina napada. Do kraja pokusa izvršeno je ukupno 4 očitavanja rezultata.

#### VARIJABILNOST UZGOJA ČISTIH KULTURA GLJIVE

Za vrijeme četirigodišnjeg rada uzgoja čistih kultura gljive *Helminthosporium turcicum* Pass., zapaženo je da se kulturalni karakter monokonidijskih izolata, kao i izolata hifalnog tipa iz istih lokaliteta i sa istih mrlja na listu međusobno razlikuje na istom umjetnom hranjivom supstratu, u brzini rasta, zatim u boji i tipu čiste kulture, nadalje u bujnosti vegetativnih organa (micelija), odnosno generativnih organa gljive (konidija), kada je prenošenje izvršeno iz iste monokonidijske kulture — roditelja, na podkulturu (subkulturu).

Boja pojedinih uzgoja čiste kulture gljive prelazila je od bjelkaste do maslinasto-sive sa prelazima u tamno-maslinastu boju. Rast micelija se također razlikovao, tako da je postojao čitav niz prelaza od plosnate teksture priljubljene na

hranjivu podlogu do pahuljasto-pamučne strukture micelija sa zračnim uzrastom. Zračni rast micelija prelazio je od oblika vrlo oskudnog, pa sve do obilnog rasta, no uvijek je bio dovoljno uočljiv. Na nekim čistim kulturama gljive sa početnim laganim pahuljastim rastom micelija, kasnije se zapažalo postepeno lagano ovlaženje površine sa prelazom u plosnati micelij, priljubljen na hranjivu podlogu. Micelijski splet hifa u kulturi ovoga tipa imao je mnogo jakih razgranjenja rasta. Tamne kulture su u pravilu imale slabije razvijeni zračni rast micelija gljive, no sa većom produkcijom konidija kao generativnih organa gljive. Brzina rasta kultura kod 25° C kao optimalne temperature za rast ove gljive bila je također različita. Za tjedan dana neki su izolati prekrili cijelu površinu hranjive podloge u Petrijevim posudama, dok su drugi izolati rasli sporije i nepravilno.

U većini uzgoja čistih kultura konidije su se počele formirati već unutar tjedan dana razvoja, dok se u manjem broju uzgoja čistih kultura konidije nisu formirale, već samo vegetativno tijelo gljive tzv. micelij, a u pojedinačnim čistim kulturama pojavljivale su se kasnije i abortivne konidije nepravilne forme. Najviše fertilnih konidija formirano je od 10—20 dana rasta, kada je i inokulum uobičajeno u starosti od 14—20 dana uziman za vršenje umjetne infekcije za poljske i laboratorijske pokuse.

Kad se izolati ovoga parazita prenose iz originalnih prvobitnih roditeljskih uzgoja čistih kultura na podkulture, na istu hranjivu podlogu u pravilu ne ostaju isti.

#### VARIJABILNOST U VIRULENCI

Da bi se utvrdilo kako monokonidijski izolati gljive *Helminthosporium turcicum* Pass., diferiraju u njihovoj sposobnosti da izazovu sivu pjegavost lista kukuruza, u poljskim i laboratorijskim pokusima kroz duži niz godina, inokulirane su biljke vrlo osjetljive sorte kukuruza sa izolatima sa 7 lokaliteta u NRH kako je naprijed navedeno.

Budući da test umjetne infekcije u stakleniku nije očitovao značajne razlike u stupnju virulencije, to se radi toga nije ni uzeo u obzir za tu svrhu.

U poljskim pokusima virulencija se očitovala u stupnjevima i to od vrlo visoke virulentnosti do samih tragova bolesti sa utvrđenom razlikom između izolata, no bez korelacije sa lokalitetom iz kojeg je gljiva potekla.

Osim toga izvršena je također i reizolacija ovoga parazita, odnosno izolacija sa listova kukuruza umjetno izvršene infekcije, sa kojom je izolacijom vršena ponovna umjetna infekcija, odnosno reinfekcija slijedećim pasażama:

- a) samo kroz biljku hraniteljku, odnosno biljku kukuruza;
- b) pomoću čistog uzgoja kulture gljive na uvijek istu umjetno hranjivu podlogu 2%-tni krumpir — dekstrozni agar).

#### REZULTATI

Četverogodišnji rezultati dobiveni inokulacijom pokazali su, da se monokonidijski izolati gljive *Helminthosporium turcicum* Pass. međusobno morfološki razlikuju, kao i da variraju u njihovoj sposobnosti da inficiraju biljku — hraniteljku kukuruza iz godine u godinu. Ova se pojava očitovala u svim slučajevima, bilo da su izolati održavani na umjetno hranjivoj podlozi, bilo da su prolazili pasażom kroz osjetljivu biljku hraniteljku i održavani samo u tkivu lista kukuruza sve do vremena vršenja infekcije u poljskim pokusima.

Pasažom parazita kroz biljku — hraniteljku ili održavanje parazita na umjetnoj i hranjivoj podlozi nije zapažen neki stabilni način u nužnom povećavanju ili smanjenju njegove virulencije. U nekim slučajevima je pasaża parazita kroz biljku hraniteljku očitovala pojačanu virulentnost, a u drugim slučajevima opet pasaża kroz umjetni supstrat, no što uobičajeno nije bila konstantna pojava.

Rezultati ovih testova pokazuju da varijante parazita koji međusobno diferiraju po svojoj virulenciji mogu istu pojačati u tkivu osjetljive biljke hraniteljke.

što pokazuje da se virulencija jednog izolata može uočljivo mijenjati prolazeći kroz živi organizam biljke hraniteljke, kao i prolazeći kroz mrtvi umjetni supstrat hranjive podloge.

Ove uočene promjene gljive ne očituju neku **utvrđenu stabilnost** iz godine u godinu, već se mijenjaju pod utjecajem klimatskih faktora, tako da nije dosada zapažen ni jedan stabilan tip ovog parazita koji bi se kroz duži niz godina dosljedno provlačio u konstantnosti jačine patogeniteta ili virulencije, odnosno u sposobnosti za infekciju biljke, koju napada.

Poljski su testovi jasno pokazali da **postoji mnogo patogenih varijacija parazita**, no one nisu **parzistentne**.

Iako ove varijante diferiraju u stupnju virulencije na jednu te istu liniju kukuruza kroz duži niz godina, one se ipak ne mogu izdvojiti u separatne fiziološke rase, budući da one nisu **konstantne** u svom patogenitetu iz godine u godinu, iz kojeg razloga ne mogu ni biti identificirane kao definitivne fiziološke rase.

Dosada je vrlo malo poznato u pogledu porijekla ovih kulturalnih i patogenih varijanata gljive *Helminthosporium turcicum* Pass., odnosno još je uvijek nepoznat razlog njihove nestabilnosti. Pretpostavke za objašnjenje ovih promjena mogu se djelomice svesti na učinak okoline i klimata, čiji faktori okružuju dva živa organizma i utiču kako na biljku kukuruza kao hraniteljku ove parazitske gljive s jedne strane, tako i na živi organizam same parazitske gljive s druge strane, čije djelovanje u dužem periodu trajanja može eventualno dovesti do formiranja novih patogenih varijanata gljive i do nestabilnije otpornosti, odnosno osjetljivosti same ispitivane čiste linije kukuruza.

Ukoliko bi se tim ispitivanjem tokom daljnjih višegodišnjih ispitivanja možda mogla utvrditi izvjesna **stabilnost u varijabilnosti virulencije**, u tom bi se slučaju moglo pretpostaviti i na utvrđivanju fizioloških rasa, kao što je to slučaj kod druge *helminthosporioze* kukuruza koju izaziva druga vrsta uzročnika — *Helminthosporium carbonum* kod kojeg su dosada utvrđene dvije fiziološke rase, no čiji uzročnik ne predstavlja značajni problem kod bolesti kukuruza.

#### ZAKLJUČAK

Ispitivanje virulentnosti gljivičnog parazita *Helminthosporium turcicum* Pass. koji uzrokuje sivu pjegavost lista kukuruza vrši se paralelno sa ispitivanjem otpornosti linija i hibrida kukuruza prema toj bolesti i to:

- a) u laboratoriju i
- b) na terenu.

Budući da je kroz višegodišnja ispitivanja i ocjenjivanja zapaženo, da se otpornost iste linije kukuruza mijenja uslijed varijabilnosti u virulenciji samog uzročnika bolesti, to je potrebno i redovno vršiti ova ispitivanja u oba pravca, da se dobiju što tačnije prosječne ocjene u otpornosti linija, odnosno hibrida kukuruza.

#### LITERATURA

1. Molot M. P. et Simone J.: Influence de divers facteurs sur la resistance du Mais aux parasites cryptogamiques Ann. Epiphyties 1962, 13 (2) 77—93.
2. Robert L. Alice: Cultural and Pathogenic Variability in Single Conidial and Hyphal-Typ Isolates of *Helminthosporium turcicum* Pass. Technical Bulletin No 1058, Washington July 1952.
3. Sprague F. George: Corn and corn improvement, New-York 1955.
4. Ullstrup J. Arnold: Further studies on a species of *Helminthosporium* parasiting corn. Phytopathology, Vol. XXXIV, No 2. Lafayette-Indiana 1950.
5. Ullstrup J. Arnold: Diseases of Dent Corn in Indiana. Lafayette-Indiana 1950.
6. Ullstrup J. Arnold—Miles R. S.: The effects of some leaf blights of corn on grain yield. Phytopathology Vol, 47, No 6. Lafayette-Indiana 1957.
7. Eucarpia. Deuxieme Reunion de la Section »Mais et Sorgho« F. A. O. Rome 20—23 Fevrier 1962.