

PREDNOSTI I NEDOSTACI NEKIH METODA ANALIZE ZDRAVSTVENOG STANJA SJEMENA ŠEĆERNE REPE

Ž. TOMIĆ

Izvorni znanstveni rad

Primljeno 4.1.1994.

SAŽETAK

Analizama zdravstvenog stanja sjemena 11 sorti šećerne repe utvrđeno je koje se gljivice najčešće prenose sjemenom u našoj zemlji. Neke od njih su važni uzročnici bolesti šećerne repe (*Cercospora beticola* Sacc., *Phoma betae* Frank., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Alternaria tenuis* Nees).

Za analizu zdravstvenog stanja sjemena korištene su tri metode (metoda na filter papiru, metoda ispiranja i metoda na hranjivoj podlozi). Utvrđene su prednosti, ali i nedostaci ovih metoda kod određivanja gljivica koje se nalaze na sjemenu šećerne repe.

ADVANTAGES AND DEFICIENCIES OF SOME METHODS USED IN HEALTH ANALYSIS OF SUGAR BEET SEED

Ž. TOMIĆ

Original scientific paper

Received: 4. 1. 1994.

SUMMARY

Seed health analysis of 11 sugar beet varieties showed which are the most frequently seed borne fungi in our country. Some of them are important disease causers (*Cercospora beticola* Sacc., *Phoma betae* Frank., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Alternatia tenuis* Nees.).

For seed health analysis three methods were used (Blotter test, Washing test and PDA method). Advantages and deficiencies of these methods in determination of the sugar beet seed borne fungi were confirmed.

UVOD

Šećerna repa je veoma osjetljiva kultura s velikim zahtjevima u tehnologiji i visokim direktnim i indirektnim zahtjevima u tehnologiji i visokim direktnim i indirektnim troškovima proizvodnje, stoga je zaštita od bolesti, uz sve ostale agrotehničke mjere, važan čimbenik u dobivanju sigurnih, visokih i kvalitetnih uroda.

U usjevu ove kulture javlja se velik broj različitih bolesti, uzročnici kojih mogu biti i abiotski čimbenici, ali isto tako i gljivice, bakterije, virusi itd. U ovom

¹⁾ RH 41000 Zagreb Zaštita bilja d.o.o. Svetošimunska 25

radu najveća pozornost posvećena je gljivicama, koje se prenose sjemenom te metodama analize zdravstvenog stanja sjemena šećerne repe.

U sadašnjem načinu uzgoja šećerne repe za sjetvu se koristi isključivo monogermno (monokarpno) tj. jednoklično sjeme. Da bi se postigao optimalni sklop od 80.000 do 1000.000 biljaka po hektaru potrebno je zaštititi sjeme od uzročnika bolesti koji se nalaze na površini, pliće ili dublje u ostatku perigona te unutar sjemena, ali i od onih koji žive u tlu pa iz njega napadaju klicu i mladu biljčicu. Od uzročnika bolesti što se prenose sjemenom u nas su najznačajniji *Phoma betae* Frank., *Fusarium* spp., *Alternaria tenuis* Nees i *Rhizoctonia solani* Kuhn. Svi se oni mogu naći i u tlu, najčešće na zaraženim biljnim ostacima, a od gljiva koje napadaju klicu i mladu biljčicu šećerne repe, gotovo isključivo iz tla najopasnije su *Pythium* spp. i *Aphanomyces cochlioides* Drechsler.

Štete koje od ovih gljivica mogu nastati, u prvom redu ovise o kakvoći sjemena (zdravstveno stanje, klijavost, energija klijanja) te o nizu agrotehničkih mjera (obrada tla, stanje zemljišta, rok i dubina sjetve, plodored itd.), a također i o vremenskim prilikama (oborine, temperatura i sl.).

Da bi proizveli kvalitetno i nezaraženo sjeme šećerne repe, nužno je provoditi mjere zaštite od bolesti i štetnika u sjemenskim usjevima, savjesno obavljati zdravstvene preglede u polju kao i kontrolu zdravstvenog stanja sjemena.

Za analizu zdravstvenog stanja sjemena šećerne repe u našoj se zemlji koristi uglavnom klasična metoda na filter papiru, no postoje i druge metode specifične za pojedine uzročnike bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je:

- evidentirati uzročnike gljivičnih bolesti koji se prenose sjemenom i ostale gljivice na sjemenu šećerne repe
- korištenjem triju metoda analize zdravstvenog stanja sjemena šećerne repe, odrediti njihove prednosti i nedostatke.

PREGLED LITERATURE

Osim što je izvor i početak svakog života, sjeme (ovisno o vrsti) sadrži ugljikohidrate, bjelančevine, ulja, vitamine, minerale i druge tvari neophodne za početni razvoj mlade biljčice, ali to je istovremeno i supstrat pogodan za naseljavanje i razvoj mnogih mikroorganizama, među kojima su svakako gljive najbrojnije. Zato se sjemenom poljoprivrednih kultura prenose mnoge biljne bolesti koje mogu:

1. uvjetovati slabu poljsku klijavost i sklop biljaka,
2. direktno umanjiti urod,
3. smanjiti kvalitetu proizvoda u polju i skladištu, te
4. povećati parazitetni potencijal mikoza u tlu, koje je već suviše zaraženo u uvjetima uskog plodoređa (Čizmić, 1990.).

Najvažniji uzročnici bolesti su: gljivice, bakterije i virusi. Među njima posebno mjesto svakako zauzimaju gljivice, jer se s mikozaama najčešće susrećemo u praksi, a i tema su ovog rada. Uzročnici bolesti nalaze se:

1. na površini sjemena obično u obliku spora, rjeđe micelija, što se naziva

kontaminacija sjemena. Uzročnik miruje na sjemenu do sjetve, a onda raste, razmnožava se i zarazi mladu klicu ili biljku,

2. pliće ili dublje u sjemenoj testu u obliku dormantnog micelija i tada se govori o zarazi,

3. u unutrašnjosti sjemena u endospermu ili u samom embriju. Tu je riječ o unutarnjoj zarazi sjemena,

4. na zaraženim biljnim ostacima i sklerocijama pomiješanim sa sjemenom (Čizmić, 1987).

Uzročnici bolesti, koje se prenose sjemenom šećerne repe, mogu izazvati palež i polijeganje mladih biljčica i na taj način smanjiti broj biljaka po ha, odnosno utjecati na sklop o kome ovisi visina uroda. Osim toga, sjemenom ove važne industrijske biljke prenose se i bolesti koje se kasnije javljaju na usjevu, a među njima i najvažnija - pjegavost lista.

Zdravstveno stanje sjemena predstavlja veoma važnu kategoriju u okviru kakvoće sjemena uz ostale, ne manje važne, koje se određuju prilikom kontrole sjemena.

Za utvrđivanje zdravstvenog stanja sjemena koristi se, u svijetu već odavno usvojene metode kao što su:

I iz grupe bez prethodnog naklijavanja:

1. pregled naturalnog sjemena,
2. metoda ispiranja,
3. metoda osvjetljavanja ili luminiscentna metoda,
4. dokazivanje zaraze embrija.

II iz grupe uz prethodno naklijavanje

1. klasična metoda na filter-papiru, te njena modifikacija, metoda izmrzavanja,
2. metoda na agaru, odnosno hranjivim podlogama,
3. uzgoj u pijesku i zemlji,
4. metoda utvrđivanja zaraze uzgojem u polju (za utvrđivanje prisutnosti karantenskih bolesti u tzv. karantenskim poljima) i
5. metode za dokazivanje virusa koji se prenose sjemenom,
 - a) metoda test-biljaka,
 - b) seorološke metode (percipitacija u tekućem mediju, precipitacija u agar-skom gelu i ELISA-test) (Čizmić, 1986).

Ove metode moraju ispuniti slijedeće uvjete:

1. Test mora dati vjerodostojnu informaciju, koja odgovara rezultatima u polju i koja ispunjava zahtjeve karantenske službe,
2. Dobiveni rezultati moraju biti ponovljivi unutar statistički opravdanih granica,
3. Vrijeme, rad i oprema za testiranje mora biti ekonomski opravdani,
4. Do rezultata testiranja potrebno je doći u što je moguće kraćem vremenu (Neergaard, 1977).

Metode su specifične za pojedine grupe uzročnika (gljive, bakterije, viruse),

pa čak i za pojedine vrste. Svaka metoda ima prednosti i nedostatke i svakako ograničene mogućnosti.

Postojeći zakonski propisi za šećernu repu ne određuju posebne metode, osim normi za kljivost i dopušteni postotak zaraze na sjemenu u prometu.

Tablica 1. Dopušteni postotak zaraze na sjemenu šećerne repe
Table 1. Allowed percentage of infection on sugar beet seed

Vrsta	Uzročnik bolesti	Dopuštetni % u prometu
Šećerna i stočna repa te cikla (Beta)	Pernonospora schachtii Fuck.	0
	Phoma betae Frank.	5

(Sl. list, 52/86; NN 53/91)

U našoj literaturi ima malo podataka o uzročnicima gljivičnih bolesti koji se prenose sjemenom šećerne repe i metodama analiziranja zdravstvenog stanja sjemena.

Već 1954. godine Kišpatić i Milatović navode da je gljivica *Alternaria tenuis* praktički onemogućila analizu infekcije sjemena s *Phoma betae* metodom na hranjivoj podlozi te da je, zbog toga, za analiziranje zdravstvenog stanja prihvatljiva metoda na filter papiru. Lušin V. (1978) objavila je rezultate istraživanja zdravstvenog stanja sjemena šećerne repe metodom na filter papiru za razdoblje od 1967. do 1976. g. Iz njih se vidi da se zaraza s *Phoma betae* u analiziranim uzorcima domaće proizvodnje kretala do 0,1 do 2,7%, a najčešće 0,1 do 0,3%. U istom radu ona navodi da se na istim uzorcima sjemena metodom ispiranja mogao našti velik broj konidija gljivica *Cercospora beticola*.

U stranoj literaturi ima više podataka na ovu temu.

Tako npr. Tempe (1977) za metodu na filter papiru navodi da je naporna jer zahtjeva dugotrajno mikroskopiranje radi identifikacije piknida *P. betae* (analizu kompliciraju saprofitske gljivice na sjemenu), osim toga inkubacija u termo-komorici je duga (12-14 dana). Metoda na krumpir-dekstroza agaru (KDA), koja se u svijetu najviše koristi, ne traži mikroskopiranje, analiza se obavlja golim okom, a može se pregledati 4000 sjemenki za 1-2 minute (Tempe, 1977). U podacima iz literature može se uočiti da je zaraza sjemena šećerne repe s gljivom *Phoma betae* kod analiziranja KDA metodom uvijek niža od one utvrđene na filter papiru, a pogotovo metodom na vodenom agaru (WA). Razlog tom je predhodna dezinfekcija sjemena, neophodna kod KDA metode, kojom se, osim saprofitske mikoflore, uništava i površinska zaraza s gljivom *Phoma betae*. Dakle, nakon dezinfekcije u NaOCl i uklanjanja površinske zaraze sjemena s *Phoma betae*, dobivamo podatak o dubinskoj infekciji ovom gljivicom. Tempe (1977) navodi da je % dubinske zaraze sjemena u visokoj korelaciji s postotkom zaraze mladih biljčica u polju što je brojnim pokusima dokazano. Ipak neki autori tvrde da i površinska infekcija sjemena šećerne repe gljivicom *Phoma betae* može dovesti do infekcije klice i mladih biljčica u polju (Gambogy i Byford, 1976).

MATERIJAL I METODE RADA

Za analiziranje zdravstvenog stanja sjemena korištene su slijedeće tri metode:

1. Metoda naklijavanja na vlažnom filter papiru

Ova metoda je prikladna za sve vrste sjemena, jeftina je i jednostavna, a istovremeno s analizom zdravstvenog stanja može se ocjeniti i klijavost sjemena. Određeni broj sjemenki (obično 200 do 400) stavi se na vlažni filter papir, u Petrijeve zdjelice. Inkubacija se obavlja u termo-momorici pri 20-24°C uz osvjetljenje 12 h dnevno i 12 h mrak.

Za određivanje klijavosti, odnosno zdravstvenog stanja šećerne repe po metodi Neeb-a koristi se naborani filter papir (Ujević, 1972).

U analizu zdravstvenog stanja sjemena ovom metodom uključeno je 11 sorti šećerne repe:

- 1 PERLA
2. KW LENA
3. MARIBO ULTRAMOND
4. MARIBO MONOVA
5. OS NADA
6. OS OPTIMA
7. OS SANA
8. KW MAJA
9. KW TINA
10. KW DUCA
11. PONESA

Za sorte KW i KW DUCA analizirano je zdravstveno stanje sjemena iz tri vegetacijske sezone, sjeme sorti PERLA, KW LENA, OS NADA, OS OPTIMA i KW TINA iz dvije godine, a za sjeme sorti OS SANA MARIBO ULTRAMONO, MARIBO MONOVA I PONESA napravljena je analiza samo za jednu godinu. Pregledano je 200 sjemenki iz svakog uzorka.

2. Metoda ispiranja

Ova metoda, osim za utvrđivanje zaraze žitarice snijetima nije dovoljno pouzdana, jer prisutne spore, dijelovi micelija itd. ne garantiraju da su gljive i vijabilne. Određena se količina sjemena mučka u preporučenoj količini vode uz dodatak deterdženata ili u etilnom alkoholu. Dobivena suspenzija spora se odmah mikroskopira ili se spore koncentriraju centrifugiranjem, filtriranjem, odnosno evaporacijom. Uz upotrebu hemocitometra ili spektrofotometra ova kvalitativna metoda postaje i kvantitativna. Metodom ispiranja može se utvrditi prisutnost gljive *Cercospora beticola* na sjemenu šećerne repe (Neergaard, 1977; Lušin, 1978).

Sjeme svih 11 sorti šećerne repe navedenih kod metode na filter papiru analizirano je i metodom ispiranja. Da bi se zahvatio što veći broj sjemenki iz svakog je uzorka laboratorijskom čašom uzeta točno određena količina u 80 ml

alkohola (10 min.). Nakon evaporacije suspenzija je analizirana mikroskopiranjem i to tako da je za svaki uzorak sjemena napravljeno 5 preparata te su izbrojane konidije gljive *Cercospora beticola* koje su se nalazile ispod pokrovnog stakalca.

3. Metoda na hranjivoj podlozi

Ovo je najprikladnija metoda za određivanje duboke, unutarnje zaraze patogenim gljivama i bakterijama, koje sporo rastu pa njihov razvoj prigušuju brzorastuće saprofitske gljive i bakterija. Prema boji i makroskopskom izgledu kolonije određuje se vrlo brzo i bez upotrebe mikroskopa uzročnik. Tempe (1977) opisuje metodu na krumpir-odekstoza agaru (KDA), kao veoma povoljnu za određivanje infekcije s gljivom *Phoma betae*. Inkubacija traje 6 dana na 20°C u tami i dodatna 2 dana uz svjetlost 12 sati. Budući da je prije stavljanja sjemena na agar obavezna njegova dezinfekcija, 10 minuta u 1%-tnoj otopini NaOCl, radi uništavanja saprofitske mikoflore, mora se računati da će se na taj način i zaraza s gljivom *Phoma betae* umanjiti za određeni postotak.

Ova je metoda korištena samo jednom prilikom, isključivo radi usporedbe s metodom na vlažnom filter papiriu, kod ocjenjivanja zaraženosti sjemena s gljivom *Phoma betae*. Zbog toga je u analizu uzet uzorak sjemena stočne repe BRIGADIER jer iz vlastitog iskustva znamo da je ona gotovo uvijek jako zaražena s ovom gljivom, dok je jaka zaraza sjemena šećerne repe rijetkost.

Kao hranjiva podloga korišten je krumpir-dekstroza agar (KDA), a analiza je provedena na 200 sjemenki.

REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA

1. Rezultati analize metodom naklijavanja na vlažnom (naboranom) filter papiriu

Analiza zdravstvenog stanja 11 sorti šećerne repe provedena je na ukupno 21 uzorku naturalnog, netretiranog sjemena. Tri uzorka potječu iz 1988. g., deset uzoraka iz 1989.g., a osam uzoraka iz 1990.g. Rezultati analiza prikazani su u tablicama 2, 3, 4.

Tablica 2. Rezultati analize zdravstvenog stanja sjemena šećerne repe metodom na vlažnom filter papiriu (uzorci iz 1988.g.)

Table 2. Results of the sugar beet seed health testing blotter test (samples from 1988.)

Prisutne gljive	% zaraze sjemena		
	1 KW MAJA	2. KW TINA	3. KW DUCA
1. <i>Acremonium</i> sp.	1	3	5,5
2. <i>Alternaria tenuis</i> Nees	34	86,5	87
3. <i>Aspergillus</i> sp.	8,5	3	0
4. <i>Chaetomium</i> spp.	48,5	17	67,5
5. <i>Doratomyces</i> sp.	0	0	1,5

Prisutne gljive	% zaraze sjemena		
	1 KW MAJA	2. KW TINA	3. KW DUCA
6. <i>Epicoccum</i> spp.	0	1	0,5
7. <i>Fusarium</i> spp.	12,5	17,5	11,5
8. <i>Mucor</i> sp.	0	0	0,5
9. <i>Oedocephalum</i> sp.	0,5	0,5	0
10. <i>Ostracoderma</i> sp.	7,5	33	6
11. <i>Penicillium</i> sp.	0	1	0,5
12. <i>Phoma betae</i> Frank	1,5	0	1
13. <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn	2,5	2	0
14. <i>Stachybotrys</i> sp.	0	5,5	5
15. <i>Verticillium</i> sp.	0,5	0	0
16. <i>Mycelia sterilia</i>	14,5	6,5	11

Tablica 3. Rezultati analize zdravstvenog stanja šećerne repe metodom na vlažnom filter papiru (uzorci iz 1989. godine)

Table 3. Results of the sugar beet seed testing - blotter test (Samples from 1989.)

Prisutne gljive	% zaraze sjemena									
	Perla	KW Lena	Maribo ultra-mono	Maribo mono-va	OS Nada	OS Optima	OS Sana	KW Maja	KW Tina	KW Duca
<i>Acremoniella</i> sp.	1	0	0	1	0	0	0,5	1	0,5	1,5
<i>Acremonium</i> sp.	2	3,5	2,5	7	3	4	4,5	1,5	0	10
<i>Alternaria tennis</i> Nees	91,5	82	86,5	80,5	80	50	68,5	76	83,5	77,5
<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Cerospora beticola</i> Sacc.	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetomium</i> sp.	20	9	61	11,5	47	47	7	24	10,5	65
<i>Cladosporium</i> sp.	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum</i> sp.	0	0	0,5	0	0	0	0	0,5	0	0
<i>Fusarium</i> spp.	10,5	12,5	7,5	11,5	6,5	10	6	19	16,5	13,5
<i>Conatobotrys</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5
<i>Helminthosporium</i> sp.	0	1	0	0	0	0	0,5	0	0	0
<i>Mucor</i> sp.	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oedocephalus</i> sp.	3,5	0	1	2,5	0	1	0	2,5	1,5	0,5
<i>Ostracoderma</i> sp.	28	66	20	42	39	24,5	72	23	34,5	50,5
<i>Penicillium</i> spp.	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0
<i>Phoma betae</i> Frank	12,5	21	5	2,5	15,5	3	2,5	1	6,5	1,5
<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn	1,5	0	0,5	0,5	1,5	0	2,5	1	1	0,5
<i>Stachybotrys</i> sp.	0	5,5	2,5	3,5	2,5	17	4	0	0,5	11,5
<i>Trichothecium</i> sp.	0	1,5	0	0	0,5	1,5	0	2,5	4,5	3
<i>Mycelia sterilia</i>	1	9	3,5	6,5	11,5	9	7	7	14	5,5

Tablica 4. Rezultati analize zdravstvenog stanja sjemena šećerne repe metodom na vlažnom filter papiru (uzorci iz 1990. godine)

Table 4. Results of the sugar beet seed health testing - blotter test (Samples from 1990)

Prisutne gljive	% zaraze sjemna							
	Ponesa	Perla	KW Lena (a)	KW Lena (b)	OS Nada	OS Optima	KW Maja	KW Duca
Acremonium sp.	2,5	6	3	4	0	3	4	3
Alternaria tenuis Nees	81,5	100	95	86,5	91	77,5	100	92
Aspergillus spp.	1,5	0,5	0	0	0	2,5	0	0
Chaetomium spp.	5	4	5,5	0	9	8	3,5	0
Doratomyces sp.	0	0,5	0	0	0,5	0	2,5	0
Epicocum sp.	0	7	0	1	3	0	2	1
Fusarium spp.	17	7	8	2	5	4,5	6,5	9,5
Gonatotryps sp.	0	7	0,5	2,5	0	0	1,5	4,5
Myrothecium sp.	0	0,5	0	0	0	0	0	0
Oedocephalum sp.	0,5	0	0,5	0	0	3	0,5	2,5
Ostracoderma sp.	55	86	32	82	74,5	42	90	53
Penicillium spp.	0,5	0	0	1	0	7	0	0,5
Phoma betae Frank	8,5	0	3	0,5	0	6,5	2,5	0
Pithomyces sp.	0	0	0	0,5	0	0	0	0
Rhizopus sp.	2	0	0,5	0	4	4	3	0
Stachybotrys sp.	5,5	0	2,5	0	1	15,5	3	1,5
Mycelia sterilia	7,5	3	6	2	4,5	7,5	2,5	1,5

KW LENA (A) = frakcija sjemena od 4,0 - 4,25 mm

KW LENS (B) = frakcija sjemena od 4,0 - 5 mm

Iz rezultata istraživanja ovom metodom vidljivo je da se sjemenom šećerne repe prenose slijedeći uzročnici paleži i polijeganja: *Alternaria tenuis*, *Fusarium* spp., *Phoma betae* i *Rhizoctonia solani* te brojni saprofiti.

Alternaria tenuis Nees bila je prisutna na svim testiranim uzorcima i to su veoma visokom postotku. Ovom je gljivom bilo zaraženo od 34% do 100 % sjemenki, prosječno 81,2%. u postojećim zakonskim propisima o uzročnicima bolesti koji mogu biti prisutni na sjemenu, za ovu gljivu nema nikakvih ograničenja. što je i razumljivo budući da *Alternaria tenuis* može napasti mladu biljčicu samo u iznimno lošim uvjetima po usjev šećerne repe. I na sjemenu velikog broja drugih kultura ova se izrazito polifagna gljivica može naći, gotovo uvijek, u visokom postotku.

Fusarium spp. (najčešće *Fusarium oxysporum* Schlecht) također su nađene na svim uzorcima sjemena. Zaraza se kretala od 2 do 19%, s prosjekom 10,2%. neki

autori smatraju da je *Fusarium oxysporum* sekundarni parazit (Marić, 1982) na šećernoj repi. Po važećem Pravilniku (Sl. list, 1986) ni za ovog uzročnika bolesti nije naveden dopušteni postotak na sjemenu u prometu.

Phoma betae Frank, najvažniji uzročnik paleži i polijeganja mladih biljčica šećerne repe u nas, nađena je na 17 uzoraka, od ukupno 21. Zaraza se kretala od 0,5 - 21 %, a prosječna iznosi 4,5%. Dopušteni postotak zaraze na sjemenu u prometu je 5%.

Najviši postotak zaraze utvrđen je na sjemenu sorte KW Lena iz 1989. g. Slijedeće je godine zaraza na ovoj sorti bila znatno slabija i to u obje frakcije sjemena iako se moglo uočiti da je nešto viša na sitnijem nego na krupnijem sjemenu.

Iz rezultata u tablicama broj 2,3 i 4 vidljivo je da se postotak zaraze za pojedinu sortu mijenja po godinama. Pojava, kao i zastupljenost gljivica na sjemenu ovisi o lokalitetu, provedenoj zaštiti, vremenskim prilikama tijekom vegetacije, agrotehničkim mjerama itd.

Rhizoctonia solani Kuhn na sjemenu je nađena u analizama 1990. g. i to na 10 od 13 uzoraka, s tim da se kod sorte KW MAJA i KW TINA pojavila u uzorcima iz proizvodnje i 1988. i 1989. g. Zaraza se kretala od 0,5-2,5%. S obzirom da je riječ o polifagnoj i ekonomski značajnoj vrsti, u budućnosti se mogu očekivati i veći problemi.

Treba spomenuti da je *Cercospora beticola* Sacc. nađena samo na sjemenu sorte Perla, 1990. g. Radilo se o jednoj, praktički slučajno nađenoj konidiji ove gljive, što potvrđuje zaključke drugih autora (Kišpatić i Milatović, 1954; Lušin, 1978) da se na sjemenu cercospora, ovom metodom, realno ne može utvrditi. Dakle, rezultat od 0,5% zaraze na sorti Perla, nema nikakvog značaja.

Ako se usporede objavljeni rezultati Lušin V. (1978) s onima iz vlastitih istraživanja metodom na filter papiru, vidljivo je da se zaraza sjemena šećerne repe s gljivom *Phoma betae* zadnjih godina povećavala.

Iz vlastitih analiza gore navedenom metodom može se zaključiti da je sjeme šećerne repe i dalje neophodno tretirati fungicidima protiv gljivice *Phoma betae*, što je obvezno po važećim propisima. Naravno, jednako je važno svesti na najmanji mogući nivo zarazu sjemena tijekom vegetacije, agrotehničkim mjerama i pravilnom zaštitom od cercospore, koja će sigurno smanjiti inokulum i ovog parazita.

Gljivice nađene na sjemenu šećerne repe tijekom istraživanja metodom na vlažnom filter papiru

Determined fungi on the sugar beet seed during examination on blotter test

1. *Acremoniella* sp.
2. *Acremonium* sp.
3. *Alternaria tenuis* Nees
4. *Aspergillus* app.
5. *Cercospora beticola* Sacc.
6. *Chaetomium* spp.

7. *Cladosporium* sp.
8. *Doratomyces* sp.
9. *Epicoccum* sp.
10. *Fusarium* spp.
11. *Gonatobotrys* sp.
12. *Helminthosporium* sp.
13. *Mucor* sp.
14. *Myrothecium* sp.
15. *Oedocephalum* sp.
16. *Ostracoderma* sp.
17. *Penicillium* spp.
18. *Phoma betae* Frank.
19. *Pithomyces* sp.
20. *Rhizoctonia solani* Kuhn
21. *Rhizopus* sp.
22. *Stachybotrys* sp.
23. *Trichothecium* sp.
24. *Verticillium* sp.
25. *Mycelia sterilia*

Osim *Alternaria tenuis*, *Cercospora beticola*, *Fusarium* spp., *Phoma betae* i *Rhizoctonia solani* sve ostale naveden gljivice pripadaju saprofitskoj mikoflori, koja se nalazi na sjemenu, ali koliko je poznato, nema nikakav negativan utjecaj na šećernoj repi.

2. Rezultati analize metodom ispiranja

Kako je *Cercospora beticola* metodom na filter papiru nađena u veoma niskom postotku, a poznato je da se prenosi sjemenom, napravljena je analiza uzoraka sjemena i ovom metodom, u skladu s citiranom literaturom.

Svi uzorci sjemena šećerne repe testirani na vlažnom filter papiru obuhvaćeni su i ovom metodom.

Rezultati su prikazani u tablicama 6, 7 i 8 tako da je za svaki uzorak naveden broj konidija cerkospore u jednom preparatu pod predmetnim stakalcem u 5 ponavljanja te ukupan broj nađenih konidija.

Tablica 5. Rezultati analize uzoraka sjemena iz 1988. g. metodom ispiranja
 Table 5. Analyses of the seed samples from 1988. by the washing test

Sorta (Variety)	Broj konidija po jednom preparatu (Number of conidia under a one cover-glass)					Ukupno (totally)
	I	II	III	IV	V	
	(repetition)					
1. KW MAJA	3	1	2	1	1	8
2. KW TINA	1	1	1	0	0	3
3. KW DUCA	0	0	0	2	0	2

Tablica 6. Rezultati analize uzoraka sjemena iz 1989. g. metodom ispiranja
Table 6 Analyses of the seed samples from 1989. by the washing test

Sorta (Variety)	Broj konidija po jednom preparatu (Number of conidia under a one cover-glass)					UKUPNO (totally)
	I	II	III	IV	V	
	(repetition)					
1. PERLA	0	2	1	0	7	10
2. KW LENA	2	0	0	1	0	3
3. MARIBO ULTRAMONO	2	0	0	0	1	3
4. MARIBO MONOVA	16	15	20	16	27	94
5. OS NADA	0	0	1	1	1	3
6. OS OPTIMA	2	1	0	2	1	6
7. OS SANA	0	0	1	0	0	1
8. KW MAJA	1	1	0	2	1	5
9. KW TINA	0	2	2	0	2	6
10. KW DUCA	1	1	0	0	0	2

Tablica 7. Rezultati analize uzoraka sjemena iz 1990. g. metodom ispiranja
Table 7 Analyses of the seed samples from 1990. by the washing test

Sorta (Variety)	Broj konidija po jednom preparatu (Number of conidia under a one cover-glass)					UKUPNO (totally)
	I	II	III	IV	V	
	(repetition)					
1 PONESA	1	0	1	0	0	2
2. PERLA	0	0	0	0	0	0
3. KW LENA (4,0-4,25)	2	0	1	0	0	3
4. KW LENA (4,0-5,0)	0	0	0	0	0	0
5. OS NADA	1	0	0	0	0	1
6. OS OPTIMA	1	0	2	1	0	4
7. KW MAJA	0	0	0	1	0	1
8. KW DUCA	0	0	1	1	1	3

Iz rezultata dobivenih testom ispiranja, jasno se vidi da su konidije cercospore nađene na 19 do 21 uzorka, što nam govori da je ova gljiva veoma često prisutna na sjemenu repe. Budući da je analizom istih uzoraka, metodom na filter papiru, Cercospora beticola nađena samo na jednom od 21 uzorka, može se zaključiti da je test ispiranja puno bolja metoda za određivanje zaraze sjemena ovim parazitom. Ako se pogleda broj nađenih konidija po uzorcima, može se uočiti da je taj broj relativno malen (0-10) osim kod sorte MARIBO MONOVA (uzorak iz 1989 g.),

kod koje su izbrojene 94 konidije.

Radi usporedbe, broj se konidija *Alternaria tenuis* veoma često gotovo ne može točno odrediti, jer ih se ispod samo jednog pokrovnog stakalca nalazi više stotina.

Kod analiziranja sjemena šećerne repe metodom ispiranja javljaju se dva važna problema. Prvi je taj što je veoma teško utvrditi jesu li prisutne konidije i vijabilne, a samim tim i koliko su značajne kao izvor infekcije za budući usjev, iako Neergaard (1977) i Marić (1974) navode da je vijabilnost cercospore na sjemenu repe 2-3 godine, stoga preporučuju da ono toliko dugo odleži u skladištu, kao indirektnu mjeru suzbijanja ove bolesti.

Drugi, još teži, problem je kako odrediti u kojoj je mjeri prisutan stromatski micelij u tkivu ostatka perigone, kojeg Kišpatić (1962) smatra za glavni izvor infekcije.

Micelij kod ispiranja ostaje na sjemenu, u suspenziji se mogu naći jedino dijelovi konidiofora i samo ponekad stromatična nakupina s konidioforima. Njih je opet, teško razlikovati od veoma često prisutnog micelija *Alternaria tenuis* i rjeđe *Cladosporium* spp. Ipak, mora se naglasiti da su stromatične nakupine s konidioforima i dijelovi konidiofora, u ovom istraživanju, najčešće nađene upravo na sjemenu sorte MARIBO MONOVA, koja je bila najjače zaražena konidijama. Sve i kad bi se upotrebom hemocitometra ili spektrofotometra došlo do postotka zaraženosti sjemena konidijama cercospore, teško je nešto zaključiti iz tog rezultata, baš zbog gore navedenih problema. Budući da se danas u uzgoju šećerne repe koriste što otpornije sorte i da se zaštita od cercospore redovito provodi, sjeme kao izvor infekcije ne igra bitnu ulogu.

Što više, radi peletiranja se odstranjuje dio ostatka perigona u kojem se nalazi micelij gljive, uz to se i tretira fungicidom, što još više smanjuje inokulum na sjemenu.

Iz provedenih analiza ovom metodom, može se zaključiti da je sjeme šećerne repe sigurno jedan od izvora infekcije za *Cercospora beticola*. Broj konidija na sjemenu je relativno malen, osim u rijetkim slučajevima, što ovisi o otpornosti sorte i zaštiti tijekom vegetacije.

Osim cercospore prilikom mikroskopiranja suspenzije oučen je, na svakom uzorku veoma veliki broj konidija *Alternaria tenuis*. *Cladosporium* sp., *Fusarium* spp. i *Helminthosporium* sp. rijetko su nalažene, ali su ipak bile prisutne na sjemenu, za razliku od teleutospora *Uromyces betae* koje u ovim analizama nisu nađene, iako neki autori preporučuju test ispiranja upravo za ovu gljivu (Naumova, 1960; Ujević, 1972; Jovičević i Milošević, 1990).

3. Rezultati analize metodom na hranjivoj podlozi (KDA metoda)

Zbog različite osjetljivosti pojedinih metoda za određivanje zaraze sjemena šećerne repe s gljivom *Phoma betae*, citiranih u literaturi, u vlastitim je istraživanjima napravljena usporedba metode na filter papiru s KDA metodom. U analizu je uzet uzorak naturalnog sjemena stočne repe BRIGADIER budući je ona, prema

vlastitom iskustvu, gotovo uvijek jako zaražena sa *Phoma betae* (na šećernoj je repi jaka zaraza rijetkost).

Rezultati su prikazani u tablici 8.

Tablica 8. Usporedba analize sjemena stočne repe BRIGADIER metodom na filter papiru i metodom na hranjivoj podlozi

Table 8. Comparison of the blotter test and PDA method in seed health analyses

Metoda na vlažnom filter papiru (Blotter test)	Metoda na hranjivoj podlozi (KDA) (PDA method)
1. <i>Acremonia</i> sp. 2,5%	0%
2. <i>Acremonium</i> sp. 5%	0%
3. <i>Alternaria tenuis</i> Nees 93%	95%
4. <i>Aspergillus</i> sp. 1%	0%
5. <i>Chaetomium</i> sp. 91%	1%
6. <i>Fusarium</i> sp. 8%	2%
7. <i>Mucor</i> sp. 1%	1,5%
8. <i>Myrothecium</i> sp. 2,5%	0%
9. <i>Ostracoderma</i> sp. 2,5	0%
10. <i>Penicillium</i> sp. 2,5%	1%
11. <i>Phoma betae</i> Frank 24,5%	12,5%
12. <i>Sordaria</i> sp. 0%	0,5%
13. <i>Stachybotrys</i> sp. 10%	0%
14. <i>Mycelia sterilia</i> 0%	16%

Iz rezultata napravljenog pokusa uočljivo je da je dezinfekcijom u 1%-tnoj NaOCl, zaraza s *Phoma betae* znatno smanjena (gotovo za 50%), što potvrđuje prije iznesene podatke iz literature (Gambogy & Byford, 1976; Tempe, 1977). To nam govori da je, u ovom slučaju, površinska zaraza sjemena imala velik udio u ukupnoj infekciji.

Isto tako, jasno se vidi da dezinfekcija nije imala nikakvog utjecaja na gljivu *Alternaria tenuis* pa se može zaključiti da: ili micelij ove gljive prodire duboko u tkivo sjemena, i tako izbjegne dodir s NaOCl, ili ovaj način dezinficiranja nije dovoljan da uništi prisutne konidije na sjemenu. Postotak zaraze s *Fusarium* sp. znatno je snižen, što znači da je kod analiziranih uzoraka prevladavala površinska infekcija sjemena ovom vrstom. Gotovo sve saprofitske gljivice, prisutne na sjemenu kod metode na filter papiru, dezinfekcijom su potpuno uništene, ili je njihov postotak izrazito niži (iznimka je *Mucor* sp.).

Važno je istaknuti, da je KDA metoda iznimno dobra za određivanje zaraze sjemena šećerne repe s gljivom *Phoma betae*, a što je i u ovom pokusu potvrđeno. Ne samo što se vrijeme inkubacije dosta skraćuje, nego doista nije potrebna upotreba mikroskopa pa je trajanje analize neusporedivo kraće. Niti kolonije

Alternaria tenuis koje se stvaraju na PDA u petrijevkama, ne predstavljaju nikakav problem, iako su nađene gotovo na svakom sjemenu. Kolonije *Phoma betae* su toliko karakteristične da se, golim okom, jednostavno mogu razlikovati, čak i ako potječu sa istog sjemena, od kolonija *Alternaria tenuis*.

Kišpatić i Milatović (1954) navode da je *Alternaria tenuis* praktički onemogućila analizu infekcije sjemena sa *Phoma betae* zbog veoma brzog rasta na upotrebljenoj hranjivoj podlozi. u njihovoj analizi sjeme je stavljeno na ukošeni malcagar u epruvetu. Vjerojatno se problem javio zbog korištenja epruveta, kod kojih je analiza teža nego ako se koriste Petrijeve zdjelice, što je bio slučaj u vlastitom istraživanju KDA metodom. Sigurno da je u pitanju bila i hranjiva podloga (poznato je da je KDA odlična podloga za determinaciju *Phoma betae*; Tempe, 1977.

Iako je dokazano da i površinska infekcija sjemena ovom gljivom može izazvati bolest u polju (Gambogi i Byford, 1976) može se zaključiti da u današnjim uvjetima kada se u procesu dorade sjemena uklanja velik dio ostataka perigona (koji nosi površinsku infekciju), a uz to se sjeme tretira fungicidom kod peletiranja, ona nema praktične važnosti. Prema svemu sudeći, KDA metoda, koja je ujedno najbrža i najjednostavnija za determinaciju, daje i najrealnije rezultate jer pokazuje koliki je postotak, upravo najvažnije, dubinske zaraze sjemena.

Na kraju valja naglasiti da, iako je agar skup i uvozi se KDA metoda toliko skraćuje i olakšava analizu, jer mikroskopiranje nije potrebno, da se u svakom slučaju može preporučiti za određivanje zaraze sa *Phoma betae* na sjemenu šećerne repe.

ZAKLJUČAK

Na osnovu višegodišnjeg analiziranja zdravstvenog stanja sjemena šećerne repe može se zaključiti:

1. Od uzročnika paleži i polijeganja mladih biljčica šećerne repe, koji se prenose sjemenom, nađeni su slijedeći mikroorganizmi: *Alternaria tenuis* Nees, *Fusarium oxysporum* Schlecht., *Phoma betae* Frank. i *Rhizoctonia solani* Kuhn. Najvažniji uzročnik ove bolesti *Phoma betae*, često je prisutna na sjemenu, pa je tretiranje sjemena šećerne repe fungicidima, koji za to imaju dozvolu, neophodno (po postojećim zakonskim propisima i obezno).

2. Analizama zdravstvenog stanja sjemena dokazano je i prisustvo uzročnika najvažnije bolesti šećerne repe u nas (*Cercospora beticola*). Ipak, čini se da se samo mala količina inokuluma prenosi sjemenom (osim iznimno), a budući da se ono tretira fungicidima, praktički nema neke važnosti kao izvor infekcije.

3. Metode korištene za analizu zdravstvenog stanja sjemena pokazale su svoje prednosti, nedostatke i domet.

- a) Standardna metoda na vlažnom, naboranom filter papiru sigurna je i jeftina, ali zato spora (zbog duge inkubacije) i naporana (dugotrajno mikroskopiranje).

- b) Metoda ispiranja pokazala se pouzdanom za dokazivanje nazočnosti gljivice *Cercospora beticola* na sjemenu.

c) Metoda na hranjivoj podlozi (KDA) odlična je za otkrivanje dubinske zaraze gljivicom *Phoma betae* i veoma brza, ali i skupa zbog cijene agara. Uz to, traži i nešto više tehničkog rada zbog dezinfekcije sjemena u NaOCl i pripreme KDA.

LITERATURA

- Čizmić Ivanka (1986): Prijenos bolesti sjemenom pšenice i djelotvornost živinih i novih fungicida, Bilten Poljodobra, 3; 11-12.
- Čizmić Ivanka (1987): Bolesti povrća koje se prenose sjemenom i njihovo suzbijanje, u knjizi: Zaštita povrća, kolektiv autora, Znanje-Zagreb; 66.
- Gambogi P. and Byford W.J. (1976): Some Observations on Assessing *Phoma betae* Infection of Sugar-Beet Seed, Annals of Applied Biology 82; 31-40.
- Jovičević B. i Milošević Mirjana (1990): Bolesti semena, Dnevnik, Novi Sad; 152-159.
- Kišpatić J. i Milatović Ivanka (1954): Ispitivanja zdravstvenog stanja sjemena šećerne repe, Zaštita bilja 26, Beograd; 27-30.
- Kišpatić J. (1962): Rezultati pokusa tretiranja sjemena šećerne repe protiv cerkospore, Agronomski glasnik, Zagreb; 432-434.
- Lušin Vera (1978): Rezultati ispitivanja zdravstvenog stanja sjemena industrijskog bilja, Glavnik zaštite bilja, 12, Zadržna štampa, Zagreb; 384-387.
- Marić A. (1974): Bolesti šećerne repe, Forum, Novi Sad; 7-104.
- Marić, A. (1982): Štetočine i bolesti šećerne repe kolektiv, autora Jugoslovensko izdanje, Nolit, Beograd; 68-95.
- Naumova N.A. (1960): Analiza semena na gljivična i bakteriološka obolenja, II izdanje, Moskva, prijevod; 34-48, 157-160.
- Neergaard P. (1977): Seed Pathology, The Macmillan Press LTD London and Basingstoke (Volumes I and II) Volume I; 595-613, 715-748, Volume II; 1041-1042.
- Službeni list (1986): Pravilnik o obaveznom zdravstvenom pregledu usjeva i objekata, sjemena i sadnog materijala poljoprivrednoga i šumskog bilja, br. 52; 1548.
- Tempe de J. (1977): Testing Sugar Beet Seed for *Phoma betae*, 18th ISTA Congress Madrid, Preprint No. : 3-5 VII.
- Tomić Z. (1993): Gljivične bolesti šećerne repe u Hrvatskoj s posebnim osvrtom na njihovo suzbijanje, magistrski rad; 4-19, 42-45, 52-74.
- Ujević A., Kovačević J. (1972): ispitivanje sjemena, Zavod za ispitivanje sjemena Zagreb; 177, 210-219.