



Detekcija *Ustilago nuda* (Jensen) Rostrup u semenu ozimog ječma

Maja Ignjatov · Dragana Petrović · Milka Vujaković ·
Ksenija Taški-Ajduković · Zorica Nikolić · Dušica Jovičić

received / primljeno: 01.11.2010. accepted / prihvaćeno: 07.12.2010.
© 2011 IFVC

Izvod: Ječam spada u najvažnija strna žita koja se gaje u našim agroekološkim uslovima. Prouzrokovač otkrivene gari ječma *Ustilago nuda* (Jensen) Rostrup javlja se često, jer su u proizvodnji zastupljene sorte osjetljive prema ovom patogenu. Simptomi bolesti se manifestuju na klasu. Parazit se prenosi semenom, a održava se u embrionu zaraženog semena u vidu mirujuće micelije. Prema preporuci International Seed Testing Association (ISTA) za detekciju *U. nuda* korišćen je metod brojanja zaraženih embriona. U ispitivanjima je korišteno 9 uzoraka prirodno zaraženog semena ječma (oko 1000 semena u zavisnosti od apsolutne mase semena). Posmatranje, ocena i fotografisanje zaraženih embriona obavljeno je pomoću Zeiss mikroskopa pri uveličanju od x 40. Konstatovana je micelija gljive debljine oko 3 μ , zlatno-mrke boje koja je vidljiva bez bojenja. Procenat zaraženosti embriona ispitivanih uzoraka semena ječma kretao se od 0,8% do 5,2%.

Ključne reči: ozimi ječam, seme, *Ustilago nuda*

Uvod

Pored pšenice, ječam spada u najvažnija strna žita koja se gaje u našim agroekološkim uslovima. Značaj ječma proizilazi iz njegove raznovrsne upotrebe u ljudskoj i stočnoj ishrani. Ječam ima veliki značaj u proizvodnji i industriji piva i slada, a takođe se koristi u tekstilnoj i farmaceutskoj industriji, u poslastičarstvu, pekarstvu, u proizvodnji sladnog mleka, alkohola, kvasca i dr. Jedan od patogena koji može u znatnoj meri uticati na prinos i kvalitet ječma je *Ustilago nuda* (Jensen) Rostrup prouzrokovač otkrivene gari ječma. *U. nuda* se pojavljuje svake godine, a razlog tome je zastupljenost sorata ječma osjetljivih prema ovom patogenu u proizvodnji (Jevtić i sar. 2003). Areal rasprostranjenja *U. nuda* je veoma širok. Sreće se u Evropi (Austrija, Rusija, Italija, Rumunija, Švajcarska, Ukrajina i dr.), Aziji (Kina, Indija, Turska, Iran), Severnoj Americi (Kanada), Južnoj Americi (Argentina) i Africi (Južna Afrika) (CABI 2004). U Bugarskoj je ovaj patogen uzrokovao velike štete (1970-1980) kada se na nekim parcelama intenzitet zaraze kretao od 15% do 20% (Nakov et al. 1994). Kod nas se otkrivena gar ječma često javlja na parcelama privatnih proizvo-

đača koji ne koriste deklarirano seme, ali podaci o velikim štetama nisu zabeleženi (Stojanović 2004). Veliki značaj *U. nuda* može da ima u proizvodnji sertifikovanog semena ječma viših kategorija.

Parazit se održava u kotiledonu zaraženog semena u vidu mirujuće micelije. Proces infekcije semena započinje teleutosporama sistemski zaraženih biljaka ječma koje se šire i inficiraju zdrave biljke. Teleutospore klijaju u promiceliju, a infektivna hifa prodire kroz zidove ovarijuma, zatim kroz nukleus i aleurone stiže do meristema embriona pretvarajući se u dormantnu miceliju koja će u narednoj godini pratiti tačku porasta biljke. Simptomi otkrivene gari se uočavaju na klasu koji je potpuno preobraćen u crnu masu teleutospora. Oboleli klasovi se pojavljuju istovremeno sa zdravim, teleutospore se šire na zdrave biljke, inficiraju ih i ciklus se ponavlja. U zaraženom klasu formiraju se teleutospore koje se vetrom raznose na zdrave biljke (Ivanović 1992). Neergard (1977) navodi da je optimalni momenat za infekciju u vreme oprašivanja, kao i jedan do dva dana nakon oprašivanja biljaka. Vetrovito vreme je takođe pogodno za širenje teleutospora u toku vegetacije (Tusa et al. 1988). Seme tretirano fungicidima daje manji procenat zaraženih biljaka (1%) u odnosu na netretirano seme koje daje i do 7% zaraženih biljaka u polju, koje predstavljaju primarni inokulum za infekciju (Reeves et al. 1994).

M. Ignjatov (✉) · D. Petrović · M. Vujaković · K. Taški-Ajduković · Z. Nikolić · D. Jovičić
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija
e-mail: maja.ignjatov@ifvcns.ns.ac.rs

S obzirom da se *Ustilago nuda* prenosi semenom i da simptomi na semenu nisu vidljivi uobičajenim metodama, za ispitivanja zdravstvenog stanja semena radi identifikacije ovog patogena preporučuje se metod brojanja zaraženih embriona (ISTA Rules 2008). Cilj rada je bio utvrđivanje procentualne zaraženosti semena ispitivanih uzoraka gljivom *U. nuda* navedenom metodom.

Materijal i metod

Za detekciju *U. nuda* korišćen je metod brojanja zaraženih embriona bez prethodnog bojenja (ISTA Rules method 7-013). U ispitivanjima je korišćeno 9 uzoraka prirodno zaraženog semena ječma (oko 1000 semena u zavisnosti od apsolutne mase semena), dobijenih od ISTA-e (*International Seed Testing Association*) u okviru kružnog testa akreditovanih laboratorija. Ispitivani uzorci obeleženi su brojevima od 1 do 9. Postupak ocene zaraženosti embriona sastoji se u prethodnom odvajanju embriona od ostatka semena pomoću 5% rastvora NaOH. Svaki uzorak, ponaosob potapan je u jedan litar sveže pripremljenog rastvora NaOH. Inkubacija potopljenih uzoraka izvršena je na temperaturi od 20°C tokom 24 časa. Uzorci su nakon inkubacije prebačeni u odgovarajuću posudu i ispirani toplom vodom radi razdvajanja embriona od perikarpa semena. Sakupljanje odvojenih embriona izvršeno je pomoću sita promera perforacija od 1 mm. Radi dodatnog prečišćavanja i odvajanja embriona od perikarpa semena, embrioni su prebačeni u prethodno pripremljen rastvor glicerola i vode u odnosu 1:1. Nakon toga izvršeno je zagrevanje prečišćenih embriona u rastvoru bezvodnog

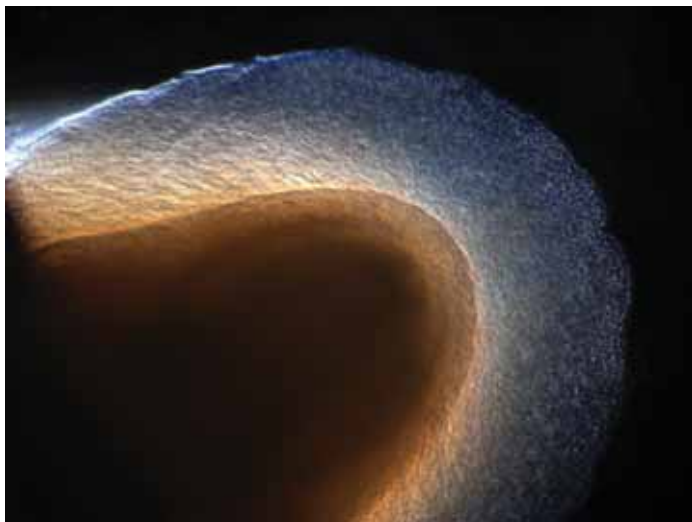
laktofenola do tačke ključanja, u trajanju od 30 sekundi. Nakon ključanja, radi lakšeg mikroskopiranja embrioni su potapani u svež rastvor glicerola. Nakon toga su pincetom pojedinačno postavljani na mikroskopsku pločicu i mikroskopirani. Posmatranje, brojanje i fotografisanje zaraženih embriona obavljeno je pomoću Zeiss mikroskopa pri uveličanju od x 40. Iz svakog uzorka pregledano je po 1000 embriona na prisustvo micelije gljive *U. nuda* a rezultati su izraženi u procentima.

Rezultati i diskusija

Na osnovu ispitivanja i posmatranja embriona proučavanih uzoraka semena ječma ustanovljeno je prisustvo gljive *Ustilago nuda* u svim ispitivanim uzorcima. Zapaženo je da gljiva formira karakterističnu razgranatu miceliju zlatno-mrke boje. Micelija je septirana, a oblik, veličina i boja micelije gljive najuočljivije su u skutelumu zaraženog embriona (Sl. 1). Nezaražen skutelum je potpuno proziran bez prisustva razgranate micelije (Sl. 2). Procenat infekcije ispitivanih uzoraka semena ječma kretao se od 0,8% do 5,2% (Sl. 3). Najveći procenat zaraze od 5,2% zabeležen je u uzorku pod brojem 3, dok je najniži procenat infekcije od 0,8% utvrđen u prvom uzorku. S obzirom da se procenat zaraze ocenjuje na osnovu ukupnog broja zaraženih embriona bez obzira na količinu prisutne micelije u embrionu, zapaženo je da prožetost skuteluma hifama i micelijom nije bio ujednačen. Pored procenta infekcije embriona, prisustvo micelije gljive u skutelumu i intenzitet infekcije ocenjen je kao slab (prisustvo retkih, kratkih hifa gljive), srednji (prožetost skuteluma micelijom do 1/3) i jak ukoliko je



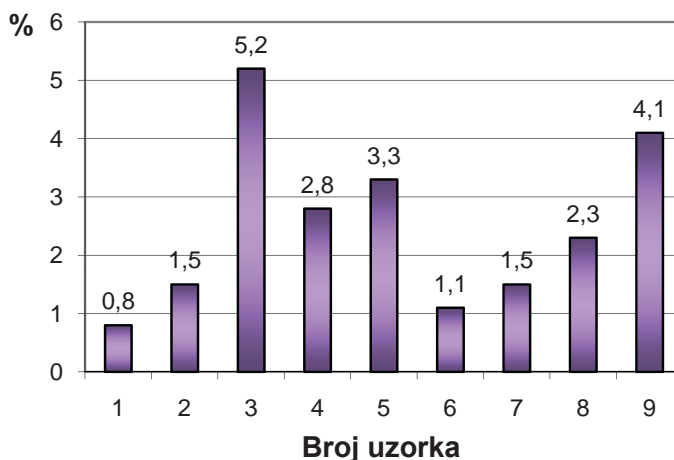
Slika 1. Izgled micelije u skutelumu inficiranog embriona gljivom *Ustilago nuda*
Fig. 1. Infected embryo, smut mycelium of *Ustilago nuda* in scutellum



Slika 2. Izgled zdravog embriona semena ječma
Fig. 2. Healthy barley seed embryo (non-infected)

prožetost skuteluma bila veća od 1/3 do celog skuteluma. Rezultati ocene u uzorcima 2 i 4 ukazuju da je prožetost skuteluma bila slaba sa prisustvom retkih, kratkih hifa. Kod uzoraka pod brojevima 1, 3, 5 i 9 prisustvo micelije u skutelumu bilo je ocenjeno kao srednje, dok je u uzorcima pod brojevima 6, 7 i 8 intenzitet zaraze micelijom gljive *U. nuda* bio najveći uz jaku prožetost većeg dela skuteluma. Dobijeni rezultati o procentualnoj prirodnoj zaraženosti semena gljivom *U. nuda* su u saglasnosti sa podacima o prosečnoj zaraženosti semena u prirodnim uslovima tokom vegetacije ozimog ječma koju navode Girsch & Weinhappel (1996). Ispitivanjem semena ječma u Velikoj Britaniji korišćenjem metode brojanja zaraženih embriona, autori Cockerell & Rennie (1996) su ustanovili da je 25% ispitivanih uzoraka ozimog ječma bilo inficirano

gljivom *U. nuda* u procentu većem od 0,5 dok su Jevtić i sar. (1997) korišćenjem iste metode utvrdili da je 10% semena ječma bilo zaraženo patogenom *U. nuda* kod nas. Jones (1999) je primenom ove metode u svojim istraživanjima detektovao 24,2% semena ozime sorte ječma (Panda) prirodno zaraženog gljivom *U. nuda*. Hewett & Damgaci (1986) su metodom brojanja embriona detektovali veoma nizak procenat zaraze od 0,1% i ocenili ovaj metod kao pouzdan, dovoljno osetljiv i pogodan za rutinske analize radi detekcije *U. nuda*. Postoje podaci o korišćenju seroloških testova (ELISA) i molekularnih metoda (PCR) u detekciji ove gljive. Međutim, Eibel et al. (2005) su u svojim istraživanjima zaključili da je ELISA test manje pouzdan i osetljiv metod za rutinske analize identifikacije ovog patogena u odnosu na metod brojanja embriona.



Slika 3. Procenat infekcije embriona ispitivanih uzoraka semena ječma
Fig. 3. Percentage of infected embryos investigated in samples of barley seed

Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanih uzoraka konstatovano je pristustvo gljive *U. nuda* u svim uzorcima metodom brojanja embriona. Procenat zaraze ispitivanih uzoraka kretao se od 0,8% do 5,2% uz neujednačen intenzitet infekcije skuteluma. Slabu infekciju karakteriše prisustvo retkih, kratkih hifa dok je kod nekih uzoraka konstatovana potpuna prožetost skuteluma hifama gljive *U. nuda*. S obzirom na širok areal rasprostranjenja i mogućnost širenja novih rasa patogena semenom, ovaj metod detekcije *U. nuda* u semenu ječma pruža zadovoljavajuću pouzdanost.

Literatura

- CABI (2004): Crop protection compendium CAB International, CD-ROM
- Cockerell V, Rennie W (1996): Survey of seed-borne pathogens in certified and farm-saved cereal seed in Britain between 1992 and 1994. HGCA Project Rep. 124: 40
- Eibel P, Wolf G, Koch E (2005): Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of loose smut of barley (*Ustilago nuda*). Europ. J. Plant Pathol. 111: 113-124
- Girsch L, Weinhappel M (1996): Health testing of seed - basis for determining a targeted seed treatment. Förderungsdienst 44:416-417
- Hewett P, Damgaci E (1986): New procedure to detect a low incidence of *Ustilago nuda* in seed barley. Plant Pathol. 35: 377-379
- ISTA Rules (2008): Handbook on Seed Health. Zurich, Switzerland: International Seed Testing Association
- Ivanović M (1992): Mikoze biljaka. Nauka, Beograd
- Jevtić R, Stojanović S, Dopuđa M, Matijević D, Milošević M (1997): Glavnica i garš ponovo aktuelne bolesti strnih žita u Srbiji. Rezime radova sa XIX Seminara iz zaštite bilja, 13-14, Beograd
- Jevtić R, Marić A, Stojanović S (2003): Paraziti semena strnih žita. Biljni lekar 6: 557-564
- Jones P (1999): Control of loose smut (*Ustilago nuda* and *U. tritici*) infections in barley and wheat by foliar applications of systemic fungicides. Europ. J. Plant Pathol. 105: 729-732
- Nakov B, Karov S, Popov A, Nešev G (1994): Specijalna fitopatologija. Akademika Press, Plovdiv
- Neergaard P (1977): Seed Pathology. Volume 1. London, UK: Macmillan Press Ltd., 839
- Reeves J C, Wray M W, Martin T (1994): Seed treatment: progress and prospects: Proceedings of a Symposium held at the University of Kent, Canterbury, 5-7 January Monography 57: 37-46
- Stojanović S (2004): Poljoprivredna fitopatologija. Srpsko biološko društvo „Stevan Jakovljević“, Kragujevac
- Tusa C, Miclaus D, Damian V, Constantin L, Paulian F (1988): Capacity for spread of *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr. on some winter barley cultivars. Probleme de Protectia Plantelor, 16: 175-193

Detection of *Ustilago nuda* (Jensen) Rostrup in Winter Barley Seed

Maja Ignjatov · Dragana Petrović · Milka Vujaković ·
Ksenija Taški-Ajduković · Zorica Nikolić · Dušica Jovičić

Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkov 30, 21000 Novi Sad, Serbia

Summary: Barley is one of the most important cereals grown in our agroecological conditions. The causal agent of loose smut on barley *Ustilago nuda* (Jensen) Rostrup occurs frequently as varieties susceptible to this pathogen are present in the production. Disease symptoms are manifested on barley head (spike). Parasite is transmitted by seed (seedborne) and stays in the embryo tissue of the infected kernel as dormant mycelium. Recommended method for detection of *U. nuda* is given by ISTA Rules (method 7-013). In tests, nine samples (weighing 120 g each) of naturally infected barley seed (about 1000 seeds, depending on the absolute mass of seed) were examined, observed and described using a Zeiss microscope with sub stage illumination with magnification range x 40 or higher. Mycelium of the fungus approximately 3 μ thick, golden brown in colour was detected and visible without a stain. The percentage of infected embryos in the examined samples of barley seeds ranged from 0.8% to 5.2%.

Key words: seed, *Ustilago nuda*, winter barley