

IZLOČANJE CIST IZ TALNIH VZORCEV IN PREGLED REZULTATOV ANALIZ GEOGRAFSKE RAZPROSTRANJENOSTI CISTOTVORNIH OGORČIC ZA OBDOBJE 1992 - 1996

Gregor Urek*, Aleksander Hržič*

IZVLEČEK

Da bi ugotovili učinkovitost nekaterih ekstrakcijskih sistemov za izločanje cistotvornih ogorčic (Heteroderinae) smo izvedli primerjavo sistema KIS s Spearsovim in Schuilingovim sistemom. Ugotovili smo, da je bil ekstrakcijski sistem KIS učinkovitejši od obeh primerjanih sistemov. V prispevku prikazujemo tudi rezultate sistematičnega spremljanja geografske razširjenosti cistotvornih ogorčic v Sloveniji za obdobje 1992 - 1996. S skupne površine 1797,25 ha njiv iz območij Gorenjske, Dolenjske, Štajerske, Prekmurja in Koroške smo odvzeli 10.383 vzorcev tal v katerih smo našli skupno 14.867 cist vrst Heteroderinae in sicer: 682 cist *Heterodera galeopsidis* Goffart, 1936, 1 cisto *H. schachtii* Schmidt, 1871, 2.730 cist *H. trifolii* (Goffart, 1944) Oostenbrink, 1949, 160 cist *H. göttingiana* Liebscher, 1892, 818 cist *H. cruciferae* Franklin, 1945, 21 cist *H. carotae* Jones, 1950, 10.305 cist *H. humuli* Filipjev, 1934, 136 cist *Punctodera punctata* (Thorne, 1928) Mulvey & Stone, 1976 in 6 cist *Globodera achilleae* Golden, Klindić, 1973.

Ključne besede: ogorčice, Heteroderidae, geografska razširjenost, ekstrakcijske metode

ABSTRACT

EXTRACTION OF CYSTS FROM SOIL SAMPLES AND A REVIEW OF RESULTS OBTAINED BY ANALYZING GEOGRAPHICAL DISPERSAL OF CYST FORMING NEMATODES FOR THE 1992 - 1996 PERIOD

In order to find out the efficiency of particular extraction systems for the recovery of cyst-forming nematodes (Heteroderinae) comparison was made of the system developed at the Agricultural Institute of Slovenia with that by Spears and Schuiling. We came to a conclusion that the extraction system used at our Institute was more efficient than both the compared systems in the test. The article also presents the results of systematic monitoring of geographical dispersal of cyst forming nematodes in Slovenia for the 1992 - 1996 period. From the total surface of 1797,25 ha arable land situated in Gorenjska¹, Dolenjska², Štajerska³, Prekmurje⁴ and Koroška⁵, 10.383 soil samples were taken in which 14.867 cysts of the species Heteroderinae were found: 682 cysts of *Heterodera galeopsidis* Goffart, 1936, 1 cyst of *H. schachtii* Schmidt, 1871, 2730 cysts of *H. trifolii* (Goffart, 1944) Oostenbrink, 1949, 160 cysts of *H. göttingiana* Liebscher, 1892, 818 cysts of *H. cruciferae* Franklin, 1945, 21 cysts of *H. carotae* Jones, 1950, 10.305 cysts of *H. humuli* Filipjev, 1934, 136 cysts of *Punctodera punctata* (Thorne, 1928) Mulvey & Stone, 1976 and 6 cysts of *Globodera achilleae* Golden, Klindić, 1973.

Key words: nematodes, Heteroderidae, geographical dispersal, extraction system

* Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

¹ Upper Carniola

² Lower Carniola

³ Styria

⁴ region of Eastern Slovenia

⁵ Carinthia

1 UVOD

Gospodarski pomen nekaterih vrst cistotvornih ogorčic (*Heterodera schachtii* Schmidt, 1871, *H. glycines* Ichinohe, 1952, *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975, *G. pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975) zahteva čim natančnejšo opredelitev območij, v katerih so omenjene vrste zastopane oziroma prerasnjo. Ugotovitev dejanskega stanja zastopanosti in razširjenosti cistotvornih ogorčic temelji na primernem sistemu vzorčenja in na primernih laboratorijskih sistemih njihovega izločanja iz odvzetih talnih vzorcev. Tekom let so v nematoloških laboratorijih različnih držav razvili vrsto bolj ali manj učinkovitih ekstrakcijskih sistemov, ki so prilagojeni zmožnostim in potrebam posameznih laboratorijev.

Glede na posebnosti, ki se zaradi naše majhnosti, geografskega položaja in vse intenzivnejšega prometa z različnimi kmetijskimi pridelki zrcalijo neposredno v delu posameznih diagnostičnih laboratorijev, smo bili tudi mi prisiljeni v določena prilagajanja nekaterih analitskih in celo diagnostičnih metod. V skladu s povedanim ter s potrebami in zmožnostmi slovenske fitonematološke stroke smo v nematološkem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije med drugim ustrezno prilagodili sistem izločanja cist cistotvornih ogorčic iz vzorcev tal, ter ga s primerjavo učinkovitosti z nekaterimi, v svetu uveljavljenimi, ekstrakcijskimi sistemi tudi kvalitativno ovrednotili.

2 MATERIAL IN METODE DELA

2.1 Primerjava učinkovitosti ekstrakcijskih sistemov

Vzorci tal smo za primerjavo ekstrakcijskega sistema Kmetijskega inštituta Slovenije (KIS) s Schulingovim sistemom odvzeli iz hmeljišča blizu Celja (na temelju predhodnih talnih analiz smo ugotovili močno zastopanost hmeljeve ogorčice, *H. humuli*), za primerjavo sistema KIS s Spearsovim sistemom pa iz krompirišč z območja Gorenjske. Tla so bila ob vzorčenju v primernem fizikalnem stanju. Vzorce smo najprej zračno sušili, dokončno pa smo jih dosušili v termostatu pri 30°C (24 ur). Posušene talne vzorce smo presejali skozi 5 mm sito, da smo izločili večje skeletoidne delce, jih dobro premešali (homogenizirali) in od vsakega zatehtali 2 krat po 700 g oziroma 2 krat po 100 g tal (vsak vzorec smo razdelili na dva podvzorca). S pomočjo omenjenih ekstrakcijskih sistemov smo v nadaljevanju izločali ciste iz posameznih podvorcev. Medsebojno smo primerjali sistem KIS in Spearsov ekstrakcijski sistem oziroma sistem KIS in Schulingov sistem izločanja cist iz talnih vzorcev. V prvem primeru smo obdelovali 700 g podvorce (tla iz hmeljišč) - 20 ponovitev, v drugem primeru pa 100 g podvorce (tla iz krompirišč) - 30 ponovitev.

Z zgoraj omenjenimi postopki izločanja cist smo dobljeno naplavino s pomočjo pri nas ustaljenega postopka (nabiranje naplavine na robu kolobarja, izrezanega iz filter papirja, s premerom 12 cm) opazovali pod stereo mikroskopsko lupo in šteli izločene ciste.

2.2 Opis ekstrakcijskega sistema KIS

V nematološkem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije že vrsto let uspešno in učinkovito uporabljamo način izpiranja talnih vzorcev, ki smo ga razvili leta 1977 (Hrzič, 1980) in je po delovanju podoben Oostenbrinkovemu postopku izločanja cist iz talnih vzorcev, vendar se od njega razlikuje v nekaj pomembnih podrobnostih. Vzorec tal stremo na sito, ki ima premer

luknjic 1 mm in ga s pomočjo pomičnega pršilnika izpiramo v lijak. Dotok in odtok mešanice vode in tal, skupaj z organskimi delci, je uravnavan tako, da vzdržuje določeno raven te mešanice v cevi lijaka. Pretok omenjene mešanice vode in tal (3,5 l / minuto) omogoča razmerje cevi lijaka. (zgornji premer: 29 mm, spodnji premer: 25 mm), višina stolpca zmesi vode in tal (25 mm) in kontrolirani dotok in odtok skozi 4 okrogle odprtine na spodnjem delu iztočne cevi lijaka. Odprtine premera 6 mm so postavljene neposredno nad ravniyo vode izpiralne naprave. Vzporedno z vodo, ki priteka na opisan način od zgoraj, pa skozi odprtino (šobo) na dnu posode doteka voda (6,5 l/minuto) od spodaj. Premer posode je 20 cm. Voda, skupaj z lažjimi organskimi in anorganskimi delci tal, se preko pretočnega žleba, ki je nameščen na vrhnjem, stranskem delu posode preliva na sito z velikostjo luknjic 250 µm.

2.3 Pregled geografske razširjenosti cistotvornih ogorčic v Sloveniji

V petletnem obdobju, 1992 - 1996, smo z namenom ugotavljanja razširjenosti cistotvornih ogorčic odvzeli s skupne površine 1797,25 ha obdelovalnih tal 10.383 vzorcev iz različnih območij Slovenije (Gorenjska, Dolenjska, Štajerska, Prekmurje, Koroška). Vzorce smo jemali s posebnimi sondami, ko so bila tla v primernem fizikalnem stanju. S petdesetkratnim odvzemom, vsakokrat po 5 - 10 g smo sestavili mešane vzorce (8 vzorcev/ ha), jih zračno posušili in s pomočjo Schuilingovega ekstrakcijskega sistema iz njih izločili organsko naplavino, iz katere smo v nadaljevanju s pomočjo stereo mikroskopske lupe (25 x povečava) izločali in determinirali ciste.

Ciste limonastih oblik smo določali s pomočjo modelov distalnih delov cist in razmerja med dorzoventralno in bilateralno projekcijo vulvinega stožca (Hržič, 1992).

3 REZULTATI IN KOMENTAR

V smislu kvantitativnega in kvalitativnega ugotavljanja zastopanosti posameznih vrst cistotvornih ogorčic v tleh je za realne rezultate pomemben izbor učinkovitega ekstrakcijskega sistema. Sistemi za izločanje cist cistotvornih ogorčic iz talnih vzorcev so se skozi zgodovino nematologije razvijali in dopolnjevali, avtorji pa so jih bolj ali manj uspešno prilagajali lastnemu okolju in svojim potrebam. Danes obstoji več načinov izpiranja talnih vzorcev za pridobivanje cist cistotvornih ogorčic, večina teh načinov pa temelji na osnovi različnih specifičnih tež organskih in anorganskih delcev oziroma sestavin, ki se nahajajo v tleh.

Najenostavnejši način izločanja cist iz talnih vzorcev temelji na uporabi belih plastičnih skodelic v katerih zmešamo zračno posušen vzorec tal s primerno količino vode. Ciste, ki so lažje od večine drugih organskih in anorganskih delcev splavajo skupaj z drugim plavajočim materialom na površje in se zberejo ob steni skodelice. Na steni nabran organski material pregledamo in izločimo morebiti zastopane ciste. Leta 1954 je Kirchner za izločanje cist iz talnih vzorcev uporabil stekleni lijak z jedkano površino, Buhr (1954) je uvedel postopek izločanja cist iz vzorcev tal z uporabo filter papirja, v leto 1940 pa sega uvedba Fenwickovega načina za izločanje cist cistotvornih ogorčic iz talnih vzorcev (cit. po 5). V letu 1954 je Oostenbrink uvedel postopek, ki je bil najprej namenjen izločanju prosto živečih in fitofagnih ogorčic iz tal, po dodatku pretočnega žleba pa je postal uporaben tudi za izločanje cist iz zračno suhih in tudi vlažnih vzorcev tal (cit. po 5). Zanimiv je tudi Seinhorstov način izločanja cist, ki ga je omenjeni avtor uvedel leta 1964, s katerim lahko ciste izločamo tudi iz nekoliko vlažnejših vzorcev (cit. po 5). V ZDA je bil pred leti dokaj razširjen način izločanja cist, ki ga je leta 1968 uvedel Spears, na Nizozemskem pa je

Schuling razvil polavtomatski flotacijski sistem izločanja cist iz talnih vzorcev (Hietbrink & Ritter, 1982), katerega delovanje je zasnovano na izrabi sredotežnih sil.

Glede na to, da se v Sloveniji že vrsto let ukvarjamo s problematiko cistotvornih ogorčic je potrebno poudariti, da smo že zelo zgodaj ugotovili, da je za naše delo izredno pomemben dober ekstrakcijski sistem. V ta namen smo že leta 1977 (Hržič, 1980) razvili lasten ekstrakcijski sistem, katerega učinkovitost smo primerjali s Spearovim oziroma Schulingovim ekstrakcijskim sistemom, katerega smo v naš laboratorij uvedli leta 1988.

Iz rezultatov primerjave ekstrakcijskega sistema KIS s Spearovim sistemom za izpiranje talnih vzorcev je razvidno (tabela 1), da smo s prvim načinom izločanja cist cistotvornih ogorčic v vseh ponovitvah izločili več cist kot z drugim. Večjo učinkovitost sistema KIS smo izrazili s pomočjo koeficienta Q_1 ($Q_1 = a/b$; količnik med številom izločenih cist s sistemom KIS in številom izločenih cist s Spearovim sistemom; tabela 1).

Tabela 1: Rezultati primerjave ekstrakcijskega sistema KIS za izločanje cist cistotvornih ogorčic s Spearovim sistemom

Ponovitev	Sistem KIS	Spearsov sistem	Q_1
1	35	19	1,842
2	48	27	1,777
3	64	35	1,828
4	74	48	1,541
5	95	58	1,637
6	77	48	1,604
7	113	65	1,738
8	28	16	1,750
9	68	40	1,700
10	128	79	1,620
11	139	87	1,597
12	42	24	1,750
13	58	31	1,870
14	93	56	1,660
15	101	64	1,578
16	65	42	1,547
17	54	37	1,459
18	30	17	1,764
19	98	66	1,484
20	71	44	1,613
SKUPAJ	1481	903	$Q_1 = 1,64$

Do podobnih rezultatov smo prišli tudi s primerjavo sistema KIS in Schulingovega sistema (tabela 2). Z ekstrakcijskim sistemom KIS smo kar v 26 od skupno 30 medsebojnih primerjav (ponovitev) izločili več cist kot s Schulingovim sistemom, povprečni koeficient učinkovitosti znaša: $Q_2 = 1,22$ ($Q_2 = a/c$; količnik med številom izločenih cist s sistemom KIS in številom izločenih cist s Schulingovim sistemom; tabela 2).

Glede časa izvedbe in porabe vode pri posameznih sistemih pa se je izkazalo, da je Schuilingov sistem za manjše vzorce (do 200 g) ustrežnejši kot ostala dva, ki sta glede tega precej enakovredna (tabela 3).

Tabela 2: Rezultati primerjave ekstrakcijskega sistema KIS za izločanje cist cistotvornih ogorčic s Schuilingovim sistemom

Ponovitev	Sistem KIS	Schuilingov sistem	Q ₂
1	144	92	1,565
2	195	153	1,274
3	127	112	1,134
4	248	153	1,621
5	186	159	1,169
6	160	140	1,143
7	330	263	1,254
8	258	249	1,036
9	231	198	1,168
10	126	119	1,059
11	90	82	1,097
12	206	177	1,163
13	168	144	1,166
14	136	153	0,888
15	100	83	1,204
16	311	215	1,446
17	195	156	1,250
18	179	189	0,947
19	159	139	1,144
20	240	175	1,371
21	142	155	0,916
22	131	143	0,916
23	205	154	1,331
24	144	79	1,822
25	130	93	1,398
26	208	201	1,035
27	302	230	1,313
28	193	135	1,429
28	275	205	1,341
30	299	213	1,403
SKUPAJ	5818	4759	Q ₂ = 1,22

Tabela 3: Trajanje izvedbe in poraba vode pri primerjanih načinih izločanja cist iz talnih vzorcev

Način izločanja cist	Poraba vode (l)	Trajanje postopka (sekund)
Sistem KIS	23	180
Spearsov sistem	19,5	180
Schuilingov sistem	10	56

V obdobju 1992 - 1996 smo v različnih območjih Slovenije sistematično spremljali geografsko razširjenost cistotvornih ogorčic (Heteroderidae). Za to smo s skupne površine 1797,25 ha odvzeli 10.383 vzorcev tal iz katerih smo izločili skupno 14.867 cist in sicer: *Heterodera galeopsidis*, *H. schachtii*, *H. trifolii*, *H. göttingiana*, *H.*

cruciferae, *H. carotae*, *H. humuli*, *Punctodera punctata* in *Globodera achilleae* (tabele 3-5).

Tabela 4: Nematološka kontrola obdelovalnih tal - rezultati terenskega in laboratorijskega dela za obdobje 1992 - 1996

Območje vzorčenja	Leto	Število parcel	Površina	Število vzorcev	Število izločenih cist				Skupaj cist
					<i>bulata</i>	<i>abulata</i>	glob. tip	punct. tip	
Gorenska	1992	43	135,6	1004	699	120	2	21	842
	1993	-	-	-	-	-	-	-	-
	1994	5	44,9	359	148	66	0	0	214
	1995	75	88,45	484	283	48	4	6	341
	1996	69	90,8	706	439	79	0	0	518
SKUPAJ		192	359,75	2553	1569	313	6	27	1915
Dolenjska	1992	3	1,1	9	21	4	0	0	25
	1993	60	35,66	270	101	10	0	0	111
	1994	18	11,89	94	11	2	0	0	13
	1995	2	28	152	34	28	0	0	62
	1996	21	16,4	120	22	2	0	0	24
SKUPAJ		104	93,05	645	189	46	0	0	235
Štajerska	1992	22	224	713	369	10359	0	77	10805
	1993	5	112	886	184	213	0	0	397
	1994	15	67,1	1352	83	0	0	0	83
	1995	9	218	499	51	27	0	0	78
	1996	14	139,3	374	86	22	0	0	108
SKUPAJ		65	760,4	3824	773	10621	0	77	11471
Prekmurje	1992	7	19,7	149	196	126	0	9	331
	1993	7	153	1174	70	41	0	13	124
	1994	10	109,25	874	351	0	0	0	351
	1995	4	87,7	174	32	0	0	0	32
	1996	28	130,5	319	64	43	0	0	107
SKUPAJ		56	500,15	2690	713	210	0	22	945
Koroška	1992	-	-	-	-	-	-	-	-
	1993	53	37,05	297	22	38	0	0	60
	1994	29	19,75	162	153	17	0	0	170
	1995	-	-	-	-	-	-	-	-
	1996	38	27,1	212	57	14	0	0	71
SKUPAJ		120	83,9	671	232	69	0	0	301
SKUPAJ 1992 - 1996		537	1797,25	10383	3473	11259	6	126	14867

Tabela 5: Prikaz determiniranih cist po območjih

Območje	Število najdenih cist									skupaj
	<i>H. galeopsidis</i>	<i>H. schachtii</i>	<i>H. trifolii</i>	<i>H. göttingiana</i>	<i>H. cruciferae</i>	<i>H. carotae</i>	<i>H. humuli</i>	<i>P. punctata</i>	<i>G. achilleae</i>	
GOR.	226	0	1343	113	194	0	6	27	6	1915
DOL.	61	0	94	3	36	11	30	0	0	235
ŠTAJ.	369	1	403	26	367	7	10221	77	0	11471
PREK.	8	0	667	0	248	0	0	22	0	945
KOR.	14	0	218	18	0	3	48	0	0	301
Skupaj	678	1	2725	160	845	21	10305	126	6	14867

Iz predstavljenih rezultatov je razvidno, da je v Sloveniji geografsko najbolj razširjena vrsta *H. trifolii*, ki smo jo sorazmerno pogostokrat našli v vseh obdelovalnih

območjih. *H. humuli* smo zasledili povsod, razen v Prekmurju, njeno izrazito prerezno povečanje pa smo po pričakovanju ugotovili v hmeljiščih v Savinjski dolini. Sorazmerno pogoste vrste pri nas so tudi *H. galeopsidis* (najdena povsod), *H. cruciferae* (najdena povsod razen v Prekmurju) in *H. göttingiana* (najdena povsod razen na Koroškem). Ostale obravnavane vrste (*Heterodera carotae*, *H. schachtii*, *Punctodera punctata* in *Globodera achilleae*) se v slovenskih obdelovalnih tleh pojavljajo le redkokdaj.

4 SKLEPI

- Ekstrakcijski sistem za izločanje cist cistotvornih ogorčic iz talnih vzorcev, ki smo ga uvedli na Kmetijskem inštitutu Slovenije je glede izločenih cist učinkovitejši od obeh v poskusu primerjanih sistemov (Spearsov in Schuilingov).
- Ekstrakcijski sistem KIS je glede porabe časa in vode enakovreden Spearsovemu sistemu in neprimerno manj racionalen kot Schuilingov sistem.
- S skupne površine 1797,25 ha smo v obdobju 1992 - 1996 odvzeli 10383 vzorcev tal iz katerih smo izločili skupno 14867 cist.
- Geografsko najbolj razširjena vrsta cistotvornih ogorčic pri nas je *Heterodera trifolii*.
- *Heterodera humuli* je prerezno povečana v hmeljiščih Savinjske doline, kar je neposredno vplivalo na delež izločenih cist omenjene vrste v razmerju do vseh izločenih cist v obravnavanem obdobju.
- Sorazmerno razširjene vrste pri nas so poleg že omenjenih *H. trifolii* in *H. humuli* še *H. cruciferae*, *H. galeopsidis* in *H. göttingiana*, vrste *H. carotae*, *H. schachtii*, *Punctodera punctata* in *Globodera achilleae* pa smo v obravnavanem obdobju zasledili le redkokdaj.

5 SLOVSTVO

Hietbrink, H., Ritter, C. E., Separating cysts from dried soil samples by a new centrifugation and a flotation method.- Abstracts, 16th International Symposium, European Society of Nematologists, St. Andrews, 1982, s. 28 - 29

Hrzič, A., Correlation between anatomical structure and morphology of the distal region of cysts of *Heterodera* species.- ESN 21st International Nematology Symposium, Albufeira, Portugal, 1992

Hrzič, A., Raziskava korelacij med anatomsko zgradbo in morfologijo distalne regije cist nematod vrst *Heterodera*.- Doktorska disertacija Univerze v Ljubljani, BF, Agronomija, Ljubljana, 1980, 129 + 101 s.

Nematološka kontrola obdelovalne zemlje.- Poročilo o strokovnih nalogah v rastlinski proizvodnji, (KIS - Poročila o strokovnih nalogah za leta 1992 - 1996), Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije

Southey, J. F., Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes.- Ref. Book 402, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, 1986, 202 s.

Spears, J. F., The Golden nematode.- Agr. Handbook U. S. Dep. Agric., 353, 1968, 81 s.