

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ,
НАУКИ И КАДРОВ**

**Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

Е. В. Равков

ИММУНИТЕТ РАСТЕНИЙ И СЕЛЕКЦИЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ

*Рекомендовано учебно-методическим объединением
по образованию в области сельского хозяйства в качестве
учебно-методического пособия для студентов учреждений высшего
образования, обучающихся по специальностям
1-74 02 02 Селекция и семеноводство*

**Горки
БГСХА
2011**

ПРЕДИСЛОВИЕ

Потери, которые несет сельское хозяйство в мире в результате поражения сельскохозяйственных растений болезнями и повреждения вредителями, огромны.

Эффект от создания и возделывания устойчивых сортов в десятки раз выше, чем при использовании химических средств защиты, применение которых, кроме того, ведет к загрязнению окружающей среды. В Беларуси, являющейся зоной достаточного увлажнения, применение химических средств защиты сельскохозяйственных культур связано с определенными трудностями, и, в первую очередь, с необходимостью повторных обработок полей ядохимикатами, что не способствует улучшению экологической обстановки. Поэтому введение в производство устойчивых сортов сельскохозяйственных растений становится жизненно важной необходимостью.

Цель настоящего лабораторного практикума – обучение студентов высших учебных заведений методам оценки и отбора селекционного материала на устойчивость к наиболее вредоносным болезням сельскохозяйственных культур.

Данный лабораторный практикум в первую очередь предназначен для студентов, обучающихся по специальности 1-74 02 02 – Селекция и семеноводство, при изучении дисциплины «Иммунитет растений и селекция на устойчивость», а также будет полезен для студентов специальности – 1-74 02 03 – Защита растений и карантин при изучении отдельных тем предмета «Фитопатология и основы иммунитета растений».

Лабораторный практикум составлен в соответствии с программой по курсу «Иммунитет растений и селекция на устойчивость». Он охватывает все разделы курса, предназначенные для изучения на лабораторных занятиях.

Учебный материал объединен в пять глав. В первой главе изложены общие вопросы микроскопирования и организации проведения лабораторных работ. Вторая глава посвящена вопросам изучения защитных функций растений от болезней и вредителей. В третьей главе рассматриваются вопросы специализации и изменчивости патогенов и их оценка. Четвертая глава посвящена созданию и использованию инфекционных фонов в селекции сельскохозяйственных растений к наиболее вредоносным патогенам. В пятой главе приведены основные методы оценки селекционного материала на устойчивость, определения вредоносности и установления толерантности к наиболее вредоносным болезням и вредителям.

В процессе проведения лабораторных занятий студенческая группа разбивается на подгруппы. Лабораторная работа каждым студентом выполняется самостоятельно. Объектом исследования служит исход-

ный и селекционный материал, характеризующийся различной устойчивостью к заболеваниям.

Для активизации работы студента и развития логического мышления результаты исследований каждого фиксируются в виде итоговой таблицы в рабочей тетради. По окончании лабораторной работы студент должен сделать выводы о результатах проведенных исследований и обсудить их с преподавателем.

При проведении лабораторных работ следует обращать внимание студентов на точность соблюдения ими всех параметров и условий методики, в противном случае могут искажаться конечные результаты оценки.

Настоящий практикум включает гораздо больше лабораторных работ, чем предусмотрено учебным планом, что позволит преподавателю более дифференцированно подходить к составлению тематического плана выполнения лабораторных работ для студентов с учетом наличия необходимого селекционного или исходного материала и патогенного начала возбудителей болезней и вредителей.

Глава 1. ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ ПО ИММУНИТЕТУ РАСТЕНИЙ И СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ

1.1. Правила охраны труда и техники безопасности при работе в лаборатории

Создание необходимых условий работы в учебных лабораториях, строгое соблюдение правил техники безопасности и методики проведения анализа – основные предпосылки предупреждения несчастных случаев.

При работе в лаборатории используются разнообразные приборы и оборудование, газовые горелки, различные химические реактивы. Требуется особое внимание, аккуратность, осторожность и ответственность при выполнении лабораторных работ.

Основными причинами несчастных случаев, происходящих в лабораториях, является неподготовленность студентов к выполнению данной аналитической работы и нарушение правил техники безопасности из-за технологии выполнения работ и методики проведения анализа по небрежности или незнанию. В связи с этим очень важна заинтересованность студентов в выполнении конкретной лабораторной задачи как можно точнее. При выполнении работы студенты должны иметь четкое представление о значимости анализа, принципе метода и технологической последовательности выполнения лабораторной работы.

Приступая к работе в лаборатории, студенты вначале должны изучить методические указания по проведению лабораторной работы, изучить устройство приборов и оборудования, порядок работы с ними и меры предосторожности. Хорошо подготовленный студент работает всегда аккуратно и без суеты.

За каждым студентом закрепляется рабочее место, на котором должны находиться только необходимые для выполнения данной лабораторной работы приборы, посуда и реактивы, указанные для каждого задания. Реактивы и приборы общего пользования, а также реактивы и приборы, надобность в которых уже отпала, должны находиться в специально отведенных местах.

Все результаты анализов, расчетов и выводы заносятся в рабочую тетрадь.

Студенты несут дисциплинарную ответственность за несоблюдение перечисленных ниже правил.

1. До окончания опыта не разрешается отлучаться из лаборатории.
2. Необходимо работать в лаборатории в спецодежде.
3. Химические реактивы в той или иной мере ядовиты. При работе с ними необходимо соблюдать осторожность, избегать попадания веществ на руки, не трогать лицо и глаза руками, не принимать в это

время пищи, после работы тщательно мыть руки. Все работы проводить только в вытяжном шкафу при хорошо действующей тяге.

4. Категорически запрещается пробовать химические вещества на вкус.

5. При определении запаха вещества все вещества следует нюхать крайне осторожно, не наклоняясь над сосудом и не вдыхая полной грудью, а направляя к себе небольшое количество пара или газа легким движением руки.

6. Нельзя проводить опыты в грязной посуде. Ее нужно мыть сразу после опыта.

7. Нельзя наклоняться над сосудом, в котором что-либо кипит или в который наливается жидкость, так как брызги могут попасть в глаза. Запрещается при работе держать или встряхивать колбы или другие склянки с кислотами и щелочами выше или на уровне глаз.

8. Щелочи, кислоты и другие едкие или ядовитые вещества необходимо набирать в пипетку при помощи резиновой груши, специальных автоматических пипеток или шприца. Недопустимо засасывать едкие и ядовитые жидкости в пипетку ртом, так как при этом возможны химические ожоги полости рта или отравления.

9. Чтобы предохранить руки от порезов, надо осторожно обращаться со стеклянными приборами и посудой. При закрывании колб пробками не следует прилагать больших усилий.

10. При смешивании жидкостей, взаимодействие которых вызывает сильное разогревание, необходимо соблюдать осторожность, так как раствор может закипеть и разбрызгаться. Смешивание жидкостей необходимо производить небольшими порциями, постоянно помешивая, и избегать чрезмерного нагревания.

11. В опытах с использованием электроприборов следует точно соблюдать правила работы с ними. Не допускается оставлять их включенными без присмотра.

12. Запрещается переносить или ремонтировать оборудование самостоятельно – без разрешения преподавателя или лаборанта.

13. При работе с зажженными газовыми горелками нужно, чтобы сгорание газа было полным и он не попадал в помещение лаборатории. Газовые горелки должны размещаться в вытяжном шкафу.

О всех несчастных случаях, произошедших в лаборатории, немедленно ставят в известность заведующего кафедрой и оказывают первую медицинскую помощь.

В начале семестра со студентами должен быть проведен инструктаж по технике безопасности при работе в лаборатории.

1.2. Оптические приборы, правила и техника микроскопирования

Для проведения микроскопического анализа необходимо иметь соответствующие оптические приборы и принадлежности для микроскопирования, а также объекты для анализа.

Основными оптическими приборами являются световые микроскопы. В настоящее время для лабораторно-практических занятий широко используют микроскопы МБР-1 (рис. 1), Биолам-С и др.

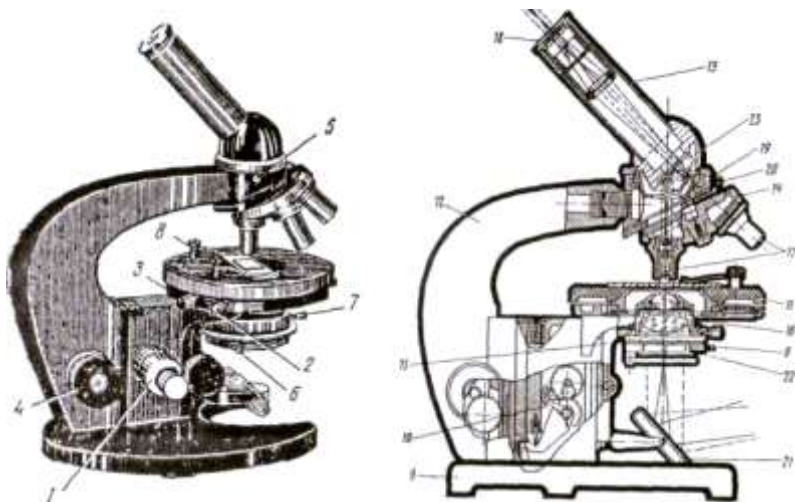


Рис. 1. Схема микроскопа МБР-1.

Световой микроскоп – сложный оптический прибор, предназначенный для изучения в сильно увеличенном изображении мельчайших организмов и структур тканей, не видимых невооруженным глазом.

Микроскоп называется световым, так как он обеспечивает возможность изучать объект в проходящем свете в светлом и темном поле зрения, проводить фазово-контрастную, люминесцентную и другие виды микроскопии.

Основные элементы конструкции современных световых микроскопов – механическая и оптическая части. Механическая часть микроскопа состоит из подковообразного башмака 9, коробки с микромеханизмом 10, предметного столика 11, револьвера на салазках 14, кронштейна конденсора 15. Коробка микромеханизма несет, с одной стороны, направляющую для кронштейна конденсора, а с другой –

направляющую для тубусодержателя. Внутри коробки находится механизм фокусировки микроскопа. На боковых поверхностях коробки расположены рукоятки микромеханизма 1, служащего для точной фокусировки объектива. Слева на оси рукояток закреплен барабан со шкалой, разделенной на 50 частей. Цена одного деления барабана 0,002 мм. Один оборот барабана соответствует перемещению тубуса на 0,1 мм. Микромеханизм перемещает тубус вместе с механизмом грубой фокусировки. При вращении рукояток грубой и тонкой фокусировки по часовой стрелке тубус микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается.

Предметный столик 11 находится на специальном кронштейне, закрепленном на верхней части коробки микромеханизма. С помощью винтов 2, находящихся справа и слева на корпусе кронштейна, столик перемещается (центрируется) на 8 мм, что позволяет подвести нужный участок препарата в поле зрения. На поверхности столика расположено семь отверстий. Четыре крайних отверстия служат для установки пружинных клемм 8, прижимающих препарат, а три средних отверстия предназначены для крепления накладного препаратоводителя.

Дугообразный тубусодержатель в нижней своей части имеет рукоятку макровинта 4, служащую для грубой фокусировки микроскопа. Верхняя часть тубусодержателя имеет снизу головку 19 для крепления револьвера, а сверху специальное посадочное гнездо для крепления сменных тубусов: наклонного – для визуальных исследований и прямого – для фотографических работ. Револьвер 14 имеет гнезда с резьбой для крепления объективов. Вращением револьвера осуществляется смена объективов 18. Конденсатор крепится в гильзе винтом 7, расположенным сбоку кольца кронштейна. Под кронштейном конденсора в коробке микромеханизма укреплена вращающаяся вилка для зеркала.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительной и наблюдательной систем. Осветительная система находится под предметным столиком. Она состоит из зеркала 21 и конденсора 16 с ирисовой апертурной диафрагмой 22.

Наблюдательная система состоит из объективов 17, призмы 23 и окуляра 18, соединенных в тубусе микроскопа 13.

Объективы составляют самую важную, наиболее ценную и хрупкую часть микроскопа. Они представляют собой систему взаимно центрированных линз, заключенных в металлическую оправу. На верхнем конце оправы имеется резьба, при помощи которой объектив крепится в гнезде револьвера. Самая маленькая, передняя (ближайшая к объекту) линза в объективе называется фронтальной. Это единственная в объективе линза, производящая увеличение. Все остальные линзы объектива называются коррекционными и служат для устранения недостатков оптического изображения. Каждый объектив характеризуется собственным увеличением, ограничением, разрешающей способно-

стью и некоторыми другими константами.

Все объективы разделяются на сухие и иммерсионные, или погружные. Сухим называется такой объектив, между фронтальной линзой которого и рассматриваемым препаратом находится воздух. При этом ввиду разницы показателя преломления стекла (1,52) и воздуха (1,0) часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. Объективы сухой системы имеют обычно большое фокусное расстояние и дают малое (8^x) или среднее (40^x) увеличение.

Погружными, или иммерсионными, называют такие объективы, между фронтальной линзой которых и препаратом помещается жидкая среда с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. В качестве иммерсионной среды используют обычно кедровое масло. Можно использовать также воду, глицерин, прозрачные масла и др. При этом между фронтальной линзой объектива и препаратом устанавливается однородная (гомогенная) среда (стекло препарата – масло – стекло объектива) с одинаковым показателем преломления. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не изменяя направления, попадают в объектив, создавая условия наилучшего освещения препарата. Величина (n) показателя преломления равна для воды 1,33, для кедрового масла – 1,515.

Окуляры Гюйгенса наиболее распространены среди других оптических систем. Они состоят из двух плосковыпуклых линз, смонтированных в металлическую оправу. Окуляр по своему назначению можно сравнить с лупой. Он строит мнимое изображение и увеличивает его, не выявляя подробностей рассматриваемого объекта. Детали строения препарата раскрывает объектив, давая увеличенное действительное изображение предмета. Окуляр же только увеличивает эти детали. Благодаря объективу и окуляру получают изображение предмета в микроскопе дважды увеличенное, мнимое, обратное по отношению к препарату.

Собственное увеличение окуляра выгравировано на оправе глазной линзы.

Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива $V_{об}$ на увеличение окуляра $V_{ок}$:

$$V = V_{об} \cdot V_{ок}.$$

Если объектив дает увеличение 90^x , а окуляр – 15^x , то общее увеличение равно 1350. Для более полного использования разрешающей способности микроскопа и наилучшего просмотра структуры препарата необходимо использовать оптимальные сочетания объектива и окуляра, дающих так называемое полезное увеличение.

Установлено, что полезное увеличение микроскопа не может превышать числовую апертуру объектива более чем в 1000 раз. Допустим,

что имеется объектив с увеличением 90^{\times} и апертурой 1,25. Полезное увеличение составит: $1000 \times 1,25 = 1250$ раз. Исходя из полезного увеличения, подбирают оптимально подходящий данному объективу окуляр. Разделив найденную величину полезного увеличения на увеличение использованного объектива, находят величину максимального увеличения окуляра, нужного для работы. Так, $1250 : 90 = 14^{\times}$, или даже лучше с окуляром 10^{\times} . Использование более сильного окуляра, например 20^{\times} , не даст ожидаемого результата.

Большое увеличение окуляра не выявляет новых деталей на изображении. В результате несоответствия угла зрения в окуляре углу зрения в объективе появится дифракция света, освещенность изображения станет меньше, а детали структуры препарата окажутся расплывчатыми.

При дневном освещении микроскоп устанавливается так, чтобы на зеркало не попадали прямые солнечные лучи. При недостаточном естественном освещении пользуются специальными осветителями или используют микроскопы с подсветкой.

При электрическом освещении в держатель под столиком микроскопа вставляют светло-синий фильтр из матового стекла. При далеко расположенном источнике света пользуются плоским зеркалом или слабовогнутым.

Степень освещения поля зрения микроскопа регулируют диафрагмой.

При микроскопировании препарат помещают на предметный столик и при помощи макроскопического винта опускают тубус до тех пор, пока не станет видна верхняя поверхность стекла с препаратом. Глядя в микроскоп и медленно поднимая тубус, отыскивают нужный объект. Затем при помощи винтов предметного столика его переводят в центральное положение поля зрения микроскопа и, вращая макроскопический винт, достигают четкого изображения.

Начинают микроскопирование всегда при малом увеличении (120^{\times} (окуляр 15^{\times} , объектив 8^{\times}), затем переводят на большое увеличение.

При выполнении лабораторных работ довольно часто требуется идентифицировать возбудителя, и при неясных симптомах проявления патологического процесса или установления морфологических различий возникает необходимость микроскопических измерений. С этой целью к микроскопу необходимо иметь вспомогательные принадлежности: окулярные и объективные микрометры.

Окулярный микрометр – круглая стеклянная пластинка со шкалой, на которой 1 см разделен на 100 равных делений (рис. 2).

Объективный микрометр – это стеклянная пластинка, в центре которой 1 мм ее длины разделен на 100 равных частей. Следовательно, одно деление объективного микрометра равно 0,01 мм, или 10 мкм.

С помощью окулярного микрометра производят линейное измере-

ние микроскопических объектов. Прежде чем пользоваться окулярным микрометром, следует определить цену одного его деления, т.е. какое количество делений расположено в определенном количестве объективного микрометра.

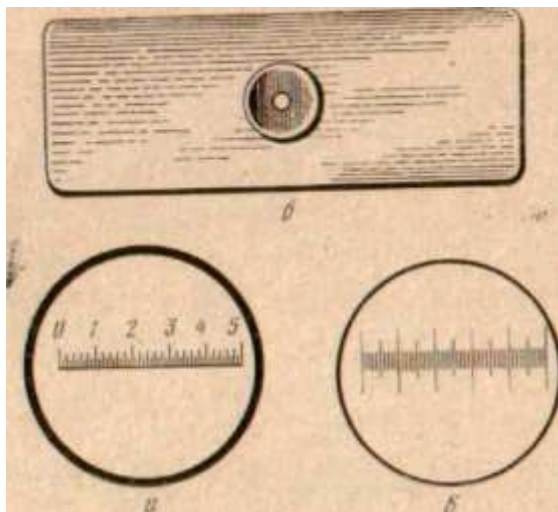


Рис. 2. Окулярный (а) и объективный (б) микрометры.

Для сравнения микрометров отвинчивают верхнюю линзу окуляра, помещают на круглую диафрагму делением вниз окулярный микрометр и осторожно завинчивают линзу. Объективный микрометр помещают на столик микроскопа, который наводят на фокус и, когда видны обе линейки (объективная и окулярная), устанавливают их так, чтобы левые крайние линии обоих микрометров совпадали. Если при этом, например, четыре деления объективного микрометра совпали с 20 делениями окулярного, то, зная, что каждое деление объективного микрометра равно 10 мкм, а четыре его деления – 40 мкм, определяют, что одно деление окулярного микрометра равно 2 мкм. Определив цену деления окулярного микрометра, объективный микрометр заменяют исследуемым препаратом и производят его измерение.

Глава 2. ЗАЩИТНЫЕ ФУНКЦИИ РАСТЕНИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ

У растений различают два основных вида иммунитета: врожденный (наследственный) и приобретенный (ненаследственный). Под врож-

денным иммунитетом понимают присущее данному виду или сорту свойство не поражаться тем или иным заболеванием. Это свойство передается по наследству, однако под влиянием внешних факторов и приспособительных особенностей паразитов оно может изменяться.

Приобретенным (индуцированным) иммунитетом называется свойство растений не поражаться болезнью, получаемое в процессе индивидуального развития (онтогенеза). В зависимости от причин, вызвавших приобретенный иммунитет, его подразделяют на инфекционный и неинфекционный. Приобретенный инфекционный иммунитет возникает в результате перенесенного заболевания. Неинфекционный приобретенный иммунитет, его называют индуцированным, возникает под влиянием внешних факторов, действия агроприемов или синтетических, или природных биологически активных соединений, индуцирующих устойчивость растений, но не приводящих к изменению генома растений. Чаще всего эта устойчивость не передается по наследству, но в некоторых случаях приобретенный иммунитет может передаваться по наследству. Индуцированный иммунитет играет важную роль в практике сельского хозяйства и считается одним из способов защиты растений от болезней.

Разная степень проявления иммунитета называется устойчивостью. Устойчивость больше свойственна сорту, чем виду.

В зависимости от характера факторов, определяющих устойчивость, принято разделять иммунитет на две категории: пассивный и активный. При пассивном иммунитете в растениях существуют защитные механизмы еще до нападения вредных организмов. Активным иммунитетом называют свойство растения активно реагировать на внедрение паразита. Защитные механизмы у растения возникают в ответ на проникновение патогена.

2.1. Факторы пассивного иммунитета

Пассивный иммунитет представляет собой совокупность конституционных свойств растений, способных препятствовать внедрению паразита и развитию его в тканях. Они существуют независимо от наличия паразита и определяются генотипом растения. К таким свойствам растений относятся анатомо-морфологические и физиологические особенности строения, химический состав тканей растений, наличие фитонцидов (фитоантицепинов).

2.1.1. Структурно-морфологические факторы иммунитета

К свойствам растений, способным препятствовать проникновению вредных организмов, относятся анатомо-морфологические особенности строения тканей и органов.

Габитус растения (форма, облиственность, число побегов) оказывает существенное влияние на степень поражения патогенами и поврежденность вредителями. Например, сорта картофеля, имеющие более плотный куст, где удерживается капельно-жидкая влага, сильнее поражаются фитофторозом. Кусты, где имеет место загущенность, интенсивнее заселяются переносчиками микоплазменных заболеваний – цикадками и др.

Опушенность и восковой налет являются факторами, препятствующими проникновению патогенов. Восковой налет может быть преградой для проникновения возбудителей.

Пробковый слой часто служит препятствием для механического внедрения патогена.

Количество и строение устьиц и чечевичек оказывают влияние на уровень заражения, они препятствуют проникновению патогенов через естественные ходы. Закрытые устьица и чечевички задерживают заражение растений патогенами. Виды и сорта растений с более редким расположением устьиц на листьях менее поражаются грибной и бактериальной инфекцией.

Анатомические особенности строения внутренних тканей растений влияют на устойчивость. Например, если у сортов пшеницы склеренхима близко подходит к эпидермису, разделяя паренхиму на пучки, то возбудитель ржавчины дает малое спороношение и сорт является слабопоражаемым.

Строение цветка. Сорта зерновых с большим количеством открытых цветков сильнее поражаются головней, спорыньей, фузариозом.

Толщина кутикулы оказывает влияние на возбудителей болезней, которые через нее проникают. Чем толще наружная стенка эпидермиса и ее кутикулярный слой, тем меньше возможностей для проникновения гриба.

При заражении растений во время прорастания имеет значение быстрота прохождения этого периода, а также как проросток выходит из почвы в период прорастания. Например, у твердой пшеницы, если проросток выходит через разрыв корешками ткани в зоне зародыша, то они сильнее поражаются твердой головней, чем те, у которых проросток проходит вдоль зерна под семенной оболочкой и пробуравливает ее или на середине, или в конце – у вершины зерна.

Задание 1. Определить роль воскового налета при зараженности зерновых культур мучнистой росой (*Erysiphe graminis* D. C. f. *tritici*).

Цель задания: определить роль воскового налета при заражении растений мучнистой росой.

Материал и оборудование: ящики с растениями пшеницы в фазе двух листьев; пульверизатор; микроскопы и принадлежности для микроскопирования; тампоны; инфекционный материал. Восковой налет на вегетативных органах придает растению голубовато-сизый оттенок.

Этот налет состоит из зернистой массы воска, который пронизывает (пропитывает) кутикулу и выступает наружу в виде крупинок. Капли воды с конидиями патогена скатываются с поверхности воскового налета.

Мучнистую росу к занятиям поддерживают следующим образом. Выкапывают растения восприимчивого сорта озимой пшеницы осенью, высаживают в вегетационные сосуды и продолжают выращивать в условиях теплицы или лаборатории.

Выполнение задания рассчитано на 4 часа. В первые 2 часа выполняют следующие процедуры:

- снимают влажным тампоном восковой налет;
- подготавливают суспензию конидий;
- просматривают под микроскопом суспензию;
- проводят искусственное заражение (опрыскивают с пульверизатора растения);
- накрывают растения полиэтиленовыми пакетами.

На следующем занятии, через 6–7 дней, подсчитывают число подушечек и записывают результаты по форме табл. 1.

В первый день занятий листья с признаками мучнистой росы помещают в стакан с водопроводной водой и взбалтывают. В капле воды должно быть не менее 15 конидий (инфекционный материал).

Просмотрите суспензию конидий под микроскопом. Если спор (среднее с десяти полей зрения) меньше 15 (увеличение 7×40), добавьте в суспензию еще зараженных листьев, если больше – добавьте воды.

Расставьте на столы по два вегетационных сосуда или ящика. Приготовьте влажные тампоны (вата или марля) и снимите с растений в одном ящике или сосуде восковой налет. В контрольном ящике (сосуде) на растениях налет не снимают. Растения в одном и втором ящиках (сосудах) опрыскивают суспензией конидий мучнистой росы. Затем надевают на сосуды или ящики полиэтиленовые пакеты.

Таблица 1. Роль воскового налета в заражении пшеницы мучнистой росой

Сорт	Вариант	Номер листьев	Число подушечек, шт.	Размер подушечек, мм	Примечание
	Контроль				
	Без налета				

Обычно спустя 5–6 дней на растениях начинают появляться подушечки с мицелием и конидиальным налетом. Учет поражения мучнистой росой следует проводить у десяти растущих подряд листьев растений. Результаты учета заносят в таблицу.

Задание 2. Провести анатомический анализ толщины кутикулярно-

го слоя и размера прилегающих клеток паренхимы восприимчивых и устойчивых к парше сортов яблонь.

Цель задания: установить влияние толщины кутикулы различных сортов яблонь на восприимчивость к парше.

Материал и оборудование: плоды яблонь, восприимчивых (Боровинка, Победа) и устойчивых (Заславское, Имант, Весялина) к парше *Venturia inaequalis*; микроскопы; судан III; лезвия бритв; объективный и окулярный микрометры.

Механическим защитным приспособлением, препятствующим проникновению патогена в ткань растения, может быть утолщенная кутикула.

Конидии возбудителя парши ябллок *Venturia inaequalis* (Кооке) Винт, попадая на листья и плоды, прорастают. Проросток внедряется в ткань через кутикулу. Кутикула может быть барьером на пути внедрения проростка в ткань. Толщина кутикулы и способность к быстрому образованию раневой перидермы на месте повреждения наружных тканей могут быть различными у разных сортов. По этому признаку наблюдается сортовая устойчивость. Задание включает выполнение следующих операций:

- определение цены деления окулярного микрометра;
- приготовление препарата (срезы через кутикулу и эпидермис плода, окрашивание красителем судан III);
- измерение толщины кутикулы и эпидермиса под микроскопом;
- оформление и обсуждение результатов измерения.

Чтобы измерить кутикулу, необходимо определить цену деления окулярного микрометра. Вычисление цены деления окулярного микрометра проводят следующим образом. Используют объект-микрометр, цена деления которого равна 0,01 мм, или 10 мкм. Объект-микрометр имеет в центре шкалу длиной 1 мм, разделенную на 100 равных частей. Объект-микрометр кладут на столик микроскопа. Окулярный микрометр представляет круглое стекло с нанесенными делениями (1 см разделен на 100 равных частей). Отвинчивают верхнюю линзу окуляра, кладут в него микрометр делением вниз и снова ввинчивают линзу. Рассматривая в микроскоп, стараются увидеть линейки объективного и окулярного микрометров. Накладывают линейки так, чтобы левые крайние линии обеих шкал совпадали. Отсчитывают число делений шкалы окулярного микрометра, укладываемое на шкале объективного микрометра до следующего совпадения линии.

Вычисляют цену деления окулярного микрометра по формуле

$$\frac{B \times 10 \text{ мкм}}{A},$$

где A – число делений шкалы окулярного микрометра, соответствующих делениям объективного микрометра;

V – число делений объективного микрометра, находящихся между совмещенными делениями.

Например, 50 делений окуляра-микрометра укладывается в 20 делений объект-микрометра. Одно деление окуляра-микрометра (цена деления) составит:

$$\frac{20 \cdot 10}{50} = 4 \text{ мкм.}$$

Затем приготавливают препараты. Делают 10 срезов с каждого сорта яблок в определенной части плода. Срезы помещают (под номером, соответствующим сорту) на предметное стекло в каплю воды и окрашивают красителем судан III. Измеряют в 10 местах каждого среза кутикулу и поверхностный слой клеток паренхимы. Средние данных умножают на цену деления. Результаты анализа записывают по форме табл. 2.

Следует обсудить результаты, ответив на следующие вопросы. У плодов каких сортов толщина кутикулы больше и увязывается ли это свойство с устойчивостью сорта? Увязывается ли устойчивость с размерами клеток паренхимы?

Задание 3. Определить строение устьиц и их количество у устойчивых и восприимчивых сортов пшеницы к бурой ржавчине.

Цель задания: установить взаимосвязь между количеством устьиц и устойчивостью сортов пшеницы к бурой ржавчине.

Материал и оборудование: микроскопы; окулярные и объективные микрометры; предметные и покровные стекла; тонкие стеклянные палочки; пинцеты; раствор киноплёнки в ацетоне; инфекционный материал; листья пшеницы устойчивых и восприимчивых к бурой ржавчине сортов.

Для осуществления газообмена у растений имеются устьица. Через устьица проникает углекислота внутрь растения и выходит наружу кислород. Устьица и другие естественные ходы могут являться входом для проникновения в растение многих патогенов. Через устьица в листьях проникают ростковые трубки эцидиоспор и урединиоспор ржавчинных грибов, многие бактерии. Урединиоспоры бурой ржавчины *Russinia triticea* прорастают и образуют гифы на поверхности эпидермиса, а затем проникают в устьице. Чем больше на поверхности устьиц, чем шире открыта устьичная щель, тем больше возможностей для проникновения патогена.

К занятиям необходимо подготовить свежий материал – листья пшеницы устойчивых и восприимчивых к бурой ржавчине сортов.

Перед занятием вегетационные сосуды с растениями на 2–3 часа закрывают светонепроницаемым изолятором (черной бумагой или тканью).

Таблица 2. **Влияние размеров кутикулы и поверхностных клеток паренхимы плодов яблоки на устойчивость сортов к парше**

Сорт	Толщина кутикулы, мм										Размер поверхностных клеток паренхимы, мкм										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Таблица 3. **Результаты связи между количеством устьиц и устойчивостью сортов пшеницы к бурой ржавчине**

Номер растения	Номер листьев	Номер поля зрения микроскопа	Сорт 1				Сорт 2				Примечание		
			Число устьиц		Размер устьиц		Число устьиц		Размер устьиц				
			в поле зрения	в 1 мм ²	в делениях окулярного микрометра	в микрометрах	В поле зрения	в 1 мм ²	в делениях окулярного микрометра	в микрометрах			
		1											
		2											
		...											
		10											
		Среднее											

Определение состояния устьиц (метод Г.Х. Молошковского).

Для определения количества устьиц на 1 мм^2 площади поверхности листа необходимо знать площадь одного поля зрения микроскопа и цену деления окулярного микрометра.

Площадь поля зрения вычисляют по формуле

$$S_0 = \pi r^2.$$

Радиус поля зрения микроскопа (r) измеряют с помощью объективного микрометра. Каждое деление объективного микрометра равно $0,01 \text{ мм}$, или 10 мкм . Измеряем диаметр в делениях объективного микрометра и выражаем его в миллиметрах. Вычисляем радиус и подставляем в формулу. Узнаем, какое количество устьиц приходится на 1 мм^2 поверхности листа. Для этого среднее число устьиц в поле зрения микроскопа нужно разделить на площадь поля зрения микроскопа.

Вычисление цены деления окулярного микрометра было описано в задании 2. Вначале необходимо приготовить раствор киноплёнки или использовать уже готовый. Киноплёнку промывают горячей водой с добавлением щелочи. Затем помещают в теплую воду и хорошо прополаскивают. Плёнку нарезают мелкими кусочками и заливают уксусом, взбалтывают до полного ее растворения. Раствор помещают в банку с притертой пробкой и хранят в холодильнике.

На верхнюю поверхность листа стеклянной палочкой наносят каплю сиропообразной массы уксуса и быстро размазывают тонким слоем. Засохшую плёнку снимают и переносят на предметный столик микроскопа. На плёнке при большом увеличении микроскопа будут видны отпечатки устьиц. Подсчитывают число устьиц и измеряют их ширину и длину. Подсчеты устьиц (в десяти полях зрения) и измерений записывают по форме табл. 3.

2.1.2. Фитонциды (фитоантицепины)

Фитонциды (фитоантицепины) впервые были открыты Б.П. Токиным в 1928 г. Фитонцидность – универсальное свойство всех растений, которым могут обладать различные химические соединения, находящиеся в растениях. Фитонцидные свойства непостоянны. Они меняются в зависимости от вида, сорта и возраста растения. Фитонциды рассматриваются как антибиотические вещества, которые всегда присутствуют в здоровой растительной ткани, механически поврежденной или зараженной. Они обладают свойствами тормозить развитие или убивать бактерии, грибы, простейшие и некоторых насекомых.

Фитонциды (фитоантицепины) присущи всем видам растений, но их активность неодинакова. Она может меняться в зависимости от вида, сорта и возраста растений, а также от времени дня, фазы развития растений, погодных условий и т.п. Более эффективно действие фитонцидов на сапротрофные микроорганизмы, чем на облигатных парази-

тов, которые приобрели устойчивость к ним. Фитонциды определенно-го растения не действуют на патогены, специализированные на этом растении. В большинстве случаев их действие распространяется на микроорганизмы, не поражающие данное растение. Например, фитонциды лука и чеснока подавляют развитие фитотрофы на клубнях картофеля; на споры возбудителя серой гнили овощей влияют фитонциды хрена и редьки. Фитонцидность тканей растений может служить фактором устойчивости сорта к возбудителям, поражающим данный вид растения. Установлено, что период активной защитной реакции совпадает с максимальной фитонцидностью растения.

Фитонциды (фитоантицепины), которые образуются в растении, встречаются как в летучем, так и жидком состоянии. Известны летучие фитонциды черемухи, лука, хрена, чеснока и др. Они хорошо изучены, известны и их химические свойства. Большой интерес представляют жидкие фитонциды, которые находятся в растении. Многие из них применяются для лечения болезней человека, животных и растений.

Задание 1. Изучить действие фитонцидов на простейшие и насекомых.

Цель задания: установить влияние фитонцидов на простейшие и насекомых.

Материал и оборудование: пробирки с плодовыми мухами, тлями, клещами, личинками плодовой моли, жуками-долгоносиками; чашки Петри с суспензией инфузорий; микроскопы; предметные и покровные стекла; мезга чеснока, лука, хрена, листья табака, листья томата, плодов апельсина и др.

Инфузории следует размножить за 2–3 дня до начала занятий. Для этого используют невсхожие зерна пшеницы или сennую труху. Готовят суспензию в чашках Петри. Насекомых помещают в пробирки, тлю можно помещать в пробирки вместе с листьями или побегами. Необходимо выяснить действие фитонцидов двух-трех растений на два объекта. Листья, стебли, плоды, корни, луковички измельчают на терке или в ступке. Мезгу (5–6 г) помещают в пробирку и прикрывают плотной ватной пробкой. Фиксируют время начала опыта.

Объекты изучения – листья или веточки с клещами, тлями предварительно рассматривают при малом увеличении микроскопа или под бинокулярной лупой. Подсчитывают плотность особей в одном поле зрения микроскопа, фиксируют их подвижность и отмечают сосредоточенность на том или ином участке листа. После этого лист свертывают заселенной стороной внутрь и погружают в пробирку с мезгой. Сверху пробирку закрывают мезгой.

Инфузории – подвижные микроорганизмы. На 2–3 предметных стекла наносят по капле суспензии с инфузориями, накрывают покровным стеклом и наблюдают в микроскоп за их подвижностью, под-

считывают их количество в поле зрения. Затем пипеткой набирают сок из 2–3 видов растений и по одной капле сока и суспензии помещают на предметное стекло. Рассматривают вновь препараты и устанавливают, какая подвижность инфузорий, когда их подвижность прекращается.

В процессе наблюдений отмечают быстроту, направление движения и гибель изучаемых насекомых. Все результаты индивидуальных исследований отмечают в рабочей тетради. Затем составляют сводную таблицу по данным всех студентов подгруппы. Результаты оформляют по форме табл. 4.

Таблица 4. Действие фитонцидов растений на инфузории и насекомых

Объект исследования	Фитонциды							
	Лук		Чеснок		Томаты		Хрен	
	Всего	В т. ч. погибших	Всего	В т. ч. погибших	Всего	В т. ч. погибших	Всего	В т. ч. погибших

Задание 2. Определить действие фитонцидов (фитоантисепинов) на прорастание телиоспор твердой головни *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. пшеницы или конидий *Helminthosporium sativum* на ячмене.

Цель задания: установить действие фитонцидов (фитоантисепинов) на прорастание телиоспор головневых грибов и конидий гельминтоспориума.

Материал и оборудование: головневые мешочки твердой головни пшеницы или спороношение гельминтоспориозной корневой гнили на ячмене; чашки Петри; фильтровальная бумага; микроскопы; предметные и покровные стекла; зараженные зерна ячменя с налетом гельминтоспориума; мезга лука и чеснока в закрытых бюксах; пипетки; вазелин; парафин; дистиллированная вода; кусочки марли и пинцеты для выжимания сока; 5–7-дневные растения зерновых.

Для изучения влияния фитонцидов на прорастание телиоспор головневых грибов следует выполнить следующие операции:

- подготовить сок из молодых растений пшеницы, ржи, ячменя, алое и др. Зерновые должны для этой цели быть высеяны за 6–7 дней до занятий;

- растения измельчить, мезгу поместить в марлю и при помощи пинцета выжать сок в колбочки, затем добавить дистиллированную воду до концентрации 1:1;

- вычленив из пораженных колосьев головневые мешочки и поместить их в колбочки;

- подготовить влажные камеры. Для этого в чашки Петри поместить на низ два фильтровальных кружка, на верх – по одному и увлажнить дистиллированной водой. В каждую чашку поместить по два предметных стекла;

– поместить споры в капли воды и сока. На одно стекло в качестве контроля наносят по концам по капле водопроводной воды, на второе – капли любого сока, предварительно пометив стекла буквами. Например, сок алоэ – А, сок пшеницы – П и т. д. На крышках чашки Петри также делают надписи;

– провести посев телиоспор. Для этого прокаливают препаративную иглу, смачивают ее в дистиллированной воде и погружают в головневый мешочек, а затем слегка отряхивают над каплями. Чашки Петри с посевом спор головневых грибов ставят на 4–5 дней в термостат для прорастания при температуре 15–18 °С;

– провести через 4–5 дней учет проросших телиоспор. Для этого капли покрывают покровными стеклами и изучают прорастание спор. Результаты оформляют по форме табл. 5.

Таблица 5. Влияние фитонцидов сока растений на прорастание спор

Споры патогена	Номер поля зрения	Прорастание спор в соке							
		контроль (вода)		пшеницы		ячменя		алоэ	
		всего	проросших	всего	проросших	всего	проросших	всего	проросших

Таким же образом изучают влияние фитонцидов сока на прорастание конидий возбудителя гельминтоспориозной корневой гнили (*Helminthosporium sativum*). Для получения спороношения пораженные зерна ячменя выдерживают 4–5 дней во влажной камере в термостате при температуре 22–26 °С. Пораженные зерновки покрываются темным спороношением патогена. Снимают препаративной иглой конидии и переносят в капли воды и сока. Конидии *H. sativum* темные, лодочкообразные с поперечными перегородками, прорасти могут из каждой клетки.

Задание 3. Изучить влияние сока различных по устойчивости сортов и видов люпина на прорастание конидий *Ceratophorum setosum* Kirchn.

Цель задания: установить влияние сока различных видов люпина и их сортов на прорастание конидий *Ceratophogum*.

Материал и оборудование: чашки Петри; кружки фильтровальной бумаги; микроскопы; предметные и покровные стекла.

Цератофороз – грибное заболевание, которое на листьях образует крупные черные пятна с темным конидиальным налетом конидий гриба. Конидии крупные, темные с поперечными и продольными перегородками.

Для получения конидий *Ceratophogum* необходимо вызвать споро-

ношение патогена, поместив пораженные листья или бобы во влажную камеру. Для изучения влияния фитонцидов различных видов люпина и их сортов на прорастание конидий необходимо выполнить операции, аналогичные описанным в задании 2.

Конидии для прорастания поместите в водопроводную воду, а также в сок устойчивых и восприимчивых сортов различных видов люпина. Выдержать для прорастания в термостате при температуре 22–24 °С.

Провести учет проросших конидий и результаты занести в табл. 6.

Таблица 6. Влияние сока различных видов люпина и их сортов на прорастание конидий *Ceratophorum setosum*

Сок растений		Всего конидий в поле зрения	В т.ч. проросших	% прорастания
вид люпина	сорт			
контроль (вода)				

2.2. Факторы активного иммунитета

Активным иммунитетом называют свойство растения активно реагировать на внедрение паразита. Защитные механизмы возникают в ответ на проникновение патогена в растение. К факторам активного иммунитета относят реакцию сверхчувствительности, активизацию и перестройку деятельности ферментных систем, образование фитоалексинов, проявление фагоцитоза.

2.2.1. Реакция сверхчувствительности

Реакция сверхчувствительности – один из наиболее эффективных и распространенных механизмов устойчивости. Она протекает очень быстро, и происходит гибель клеток растения-хозяина в местах проникновения патогена.

Благодаря сверхчувствительной реакции растения паразит не может проникнуть дальше, чем в первую или первые несколько клеток хозяина. В силу повышенной чувствительности клетка погибает, а ее гибель влечет за собой гибель проникающего патогена. Следовательно, сверхчувствительность – это ответная реакция растения на заражение, приводящая к отмиранию клеток в месте внедрения инфекции и в локализации патогена. Особенно эффективна реакция сверхчувствительности против биотрофов. У факультативных паразитов и факультативных сапротрофов гибель наступает в результате отравления образующимися токсинами.

Сверхчувствительность выражается в проявлении некроза или хло-

роза в месте заражения. Размер пятен колеблется от микроскопических до достаточно крупных. Сверхчувствительность – это общий защитный механизм растений, проявляющийся при заражении их грибами, бактериями и вирусами. Активные реакции растения на нападение паразита начинаются после внедрения его в клетку. Если сорт устойчив, клетки отмирают и паразит не успевает распространиться на соседние клетки. Это приводит к образованию некроза, часто без спороношения. Может быть и медленное течение процесса вплоть до образования мелких пустул или малого количества спор.

Задание 1. Изучить реакцию сверхчувствительности.

Цель задания: установить проявление реакции сверхчувствительности на листьях различных сортов пшеницы или тритикале при естественном и искусственном заражении стеблевой или бурой ржавчиной.

Материал и оборудование: растения пшеницы или тритикале различных по устойчивости сортов; гербарные листья, собранные в фазе колошения; лупы; цветная таблица, изображающая некрозы на листьях.

При заражении сортов пшеницы (тритикале) стеблевой или бурой ржавчиной могут образовываться различные типы некрозов, спороношений или некрозов вместе со спороношением. Если сорт устойчив и в его ткани проник росток патогена, то в месте внедрения образуется некротическое или хлоротическое пятно или кольцо вокруг пустулы.

При 0-й и 1-й степени устойчивости пустулы гриба совсем не развиваются, а на листьях в месте внедрения гриба образуются некрозы. Таким образом, формируется барьер из мертвых клеток, который является препятствием для распространения патогена в ткани. По величине некротического кольца вокруг пустулы судят также о степени устойчивости (2-я, 3-я степень), а совершенно восприимчивый сорт обычно не образует некротической зоны вокруг пустулы (рис. 3).

Каждому студенту выдается набор листьев различных сортов пшеницы или тритикале, пораженных стеблевой или бурой ржавчиной. На основе их необходимо установить степень устойчивости и результаты оформить по форме табл. 7.

Таблица 7. Симптомы стеблевой или бурой ржавчины на листьях различных сортов пшеницы

Сорт	Степень устойчивости						Внешнее проявление ржавчины
	0-я	1-я	2-я	3-я	4-я		

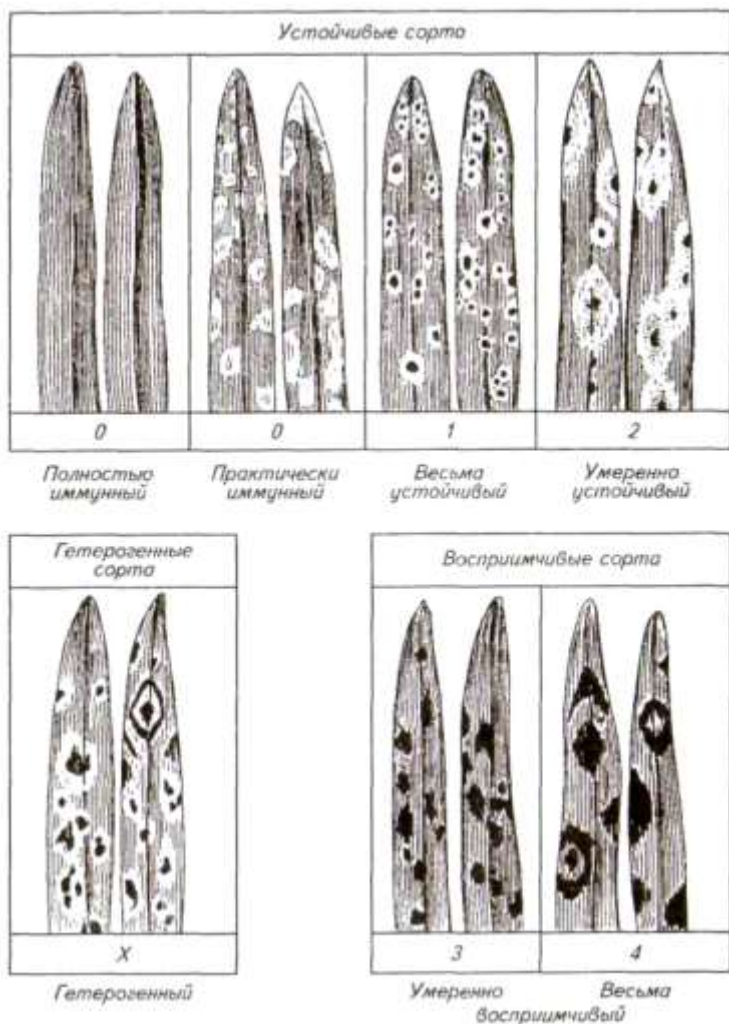


Рис. 3. Типы реакций пшеницы на заражение *Puccinia graminis*.

2.2.2. Фагоцитоз

В конце XIX века И.И. Мечников, работая в Пастеровском институте в Париже, открыл фагоциты – особые клетки, пожирающие чуже-

родные включения. Установлено, что все организмы, начиная с амёбы, обладают способностью к фагоцитозу – внутриклеточному перевариванию. У одноклеточных организмов путем фагоцитоза происходит как питание, так и защита. У многоклеточных существует обычно функция иммунной защиты. Защита животного организма от проникающей в него инфекции осуществляется по двум направлениям. Первое направление иммунохимическое, где для подавления инфекции образуются специальные защитные вещества в крови типа агглютининов, лизинов и др. Второе направление основывается на фагоцитозе.

В растениях нет специальных клеток – фагоцитов. Однако рядом ученых установлено, что болезнетворные организмы способны перевариваться и в растении. Следовательно, и в растениях наблюдаются явления фагоцитоза. Фагоцитоз можно проследить на так называемом микоризном сожительстве, при котором в основе взаимоотношения партнеров (растения и гриба) лежит паразитизм гриба. Переваривание гиф паразитов хорошо изучено на эндотрофной микоризе, когда гриб в основном развивается внутри корней растений.

Способность к перевариванию – активная защитная реакция растения, не позволяющая грибу вызывать существенные повреждения или даже гибель хозяина. Фагоцитарными свойствами обладают не все клетки (за некоторым исключением). Гифы гриба не проникают в клетки, где идут активные физиологические процессы, здесь осуществляется фагоцитоз клетки на самом сильном уровне.

Фагоцитоз не приводит обычно к полному очищению растений от патогена, но он ослабляет возбудителя и этим предохраняет растение от гибели.

Задание 1. Ознакомиться с проявлением фагоцитоза у животных и насекомых.

Цель задания: ознакомиться с проявлением фагоцитоза на примере насекомых и животных.

Материал и оборудование: дефибринированная кровь кролика, личинки майского жука или гусеницы белянки, улитки; микроскопы и все принадлежности для них.

Готовую дефибринированную (свободную от фибрина) кровь кролика или другого животного ввести малым шприцем (0,1 мм) под кожу личинки капустной белянки, личинки майского жука или улитки. Фибрин – белковое вещество, образующееся в крови при ее свертывании и выпадающее в виде клубка волокон; дефибринированный – освобожденный от фибрина. Спустя 6 часов выделить каплю гемолимфы на предметное стекло. Рассмотреть под микроскопом. Найти лейкоциты, поглотившие красные кровяные тельца, зарисовать.

Следовательно, лейкоциты умеют распознавать чужеродный объект и способны его ликвидировать.

Задание 2. Ознакомиться с явлением фагоцитоза или физиологического иммунитета у растений.

Цель задания: ознакомиться с фагоцитозом у растений.

Материал и оборудование: 13–14-дневные растения пшеницы, выращенные из зерен, заспoreнных телиоспорами твердой головни *Tilletia caries* (D. C.) Tul.; микроскопы; предметные и покровные стекла; препаровальные иглы; дистиллированная вода, 1%-ный раствор анилин-блау.

Растения не способны образовывать фагоциты и антитела, но им, как и всему живому, присуща способность распознавать чужеродные ткани, клетки и вещества. Для наблюдения за явлением фагоцитоза у растений, или иначе его называют физиологическим иммунитетом, предлагаем использовать ткани колеоптиле проростков пшеницы устойчивого и восприимчивого сортов к твердой головне.

Работа выполняется за два лабораторных занятия с промежутком между ними в 14 дней. На первом занятии необходимо:

- инфицировать семена телиоспорами твердой головни (1 % спор от веса семян);

- подготовить вегетационные сосуды, заполнив их смесью кварцевого песка (одна часть песка и $\frac{2}{3}$ части почвы). Вегетационные сосуды должны быть заполнены смесью на $\frac{1}{3}$ их высоты. Влажность должна составлять 60 % от полной влагоемкости;

- выровнять поверхность почвы и разложить пинцетом семена (30 шт. на один вегетационный сосуд) пшеницы, засыпать почвой, чтобы глубина заделки была 7 см;

- сосуды отмечают этикетками, где указывают сорт, контроль (семена высеяны без заsporeния головней).

Прораstание пшеницы должно проходить при температуре 10–12 °С. Через 14–18 дней на втором занятии выполняют следующее:

- 20 проростков аккуратно вынимают из почвы, тщательно промывают и раскладывают в чашки Петри;

- снимают препаровальной иглой колеоптиле, помещают на 5–6 мин в 1%-ный раствор анилин-блау, затем промывают;

- помещают прозрачные кусочки на предметное стекло в каплю воды, покрывают покровным стеклом и рассматривают вначале при малом увеличении, затем – при большом.

Окрашенный мицелий в виде продолговатых нитей голубовато-фиолетового цвета распространяется обычно межклеточно, но заходит и в клетки. Мицелий может быть нормальный, вакуолизированный, дегенерированный, лизированный.

Результаты оформляются в табл. 8. Обычно анализу подвергают по 10 колеоптиле каждого сорта.

Таблица 8. Состояние грибкицы *Tilletia caries* Tul. в проростках пшеницы

Вариант	Количество просмотренных колеоптиле	Обнаружено грибкицы, шт.	Грибкица локализована	Состояние грибкицы
Контроль (без заспорения)				
Устойчивый сорт				
Восприимчивый сорт				

2.2.3. Фитоалексины растений

Фитоалексины – это низкомолекулярные антибиотические вещества, которые возникают в растении в ответ на заражение. В отличие от фитонцидов, фитоалексины отсутствуют в здоровой ткани и синтезируются растением в ответ на инфекцию или повреждение. Впервые образование фунгистатических веществ, синтезируемых растением в ответ на инфекцию, установил К.О. Мюллер (1939). Им был предложен и термин «фитоалексины». Спустя 20 лет был идентифицирован первый фитоалексин. В настоящее время из различных растений выделено более 200 фитоалексинов. При взаимодействии патогена с растением может образовываться не один, а несколько фитоалексинов. При заражении клубней картофеля образуются три фитоалексина: ришитин, любимин и фитуберин. Способность растения продуцировать не один, а несколько фитоалексинов позволяет ему успешно противостоять различным патогенам. Устойчивые формы растений синтезируют фитоалексины быстрее и в больших количествах, чем восприимчивые сорта.

По химической природе одни фитоалексины относятся к фенольным соединениям, например, пизатин из гороха, фазеолин из фасоли, трифолиризин из корней красного клевера. Такие фитоалексины, как ришитин, любимин из картофеля имеют не фенольную природу. Синтез одного и того же фитоалексина, характерного для данного растения, может быть вызван разными грибами: как патогенными, так и непатогенными. Те патогены, которые паразитируют на определенном растении, более устойчивы к фитоалексинам, чем непатогенные для этого растения виды.

К.О. Мюллером (1939) и его сотрудниками установлены следующие закономерности образования фитоалексинов:

- фактор, тормозящий развитие гриба в сверхчувствительной ткани (фитоалексин), образуется или активизируется только в тех тканях, где клетки хозяина вступают в контакт с паразитами;
- защитные реакции наблюдаются только в живых клетках;
- фитоалексины представляют собой продукт некробиоза клеток

хозяина;

– фитоалексины неспецифичны в своем действии на грибы, хотя разные виды грибов могут характеризоваться неодинаковой к ним чувствительностью;

– защитная реакция устойчивых и восприимчивых хозяев одинакова, различия между ними заключаются преимущественно в темпах образования фитоалексинов;

– защитные реакции проявляются лишь в пораженных грибом и прилегающих к ним тканях;

– устойчивость растений к заболеваниям наследуется, она развивается только при заражении грибом; чувствительность клеток хозяина специфична для данного генотипа.

Выявление фитоалексинов осуществляется по ингибированию (замедлению) прорастания спор самых различных грибов. Для этого используют методы определения фитоалексинной активности. Под фитоалексинной активностью понимается различие в фунгитоксичности экстрактов инфицированной и здоровой ткани.

Задание 1. Определить фитоалексинную устойчивость картофеля.

Цель задания: определить фитотоксическое действие диффузатов по ингибированию прорастания конидий *Fusarium solani*.

Материал и оборудование: клубни картофеля различной степени фитотроустойчивости; суспензия спороношения возбудителя фитотрозы картофеля; культура гриба *Fusarium solani*; скальпели; чашки Петри; предметные и покровные стекла; пипетки Пастера; фильтровальная бумага; микроскопы; дистиллированная вода.

Фитоалексины обычно образуются в некротизированной ткани растения-хозяина, т.е. в процессе реакции сверхчувствительности. Чтобы обнаружить в растении фитоалексины, исследуемое растение заражают несовместимым с ним патогеном. Затем пораженную ткань экстрагируют различными растворителями. Каждый экстракт испытывают на фунгитоксичность, т.е. на способность подавлять развитие грибов.

Для картофеля это проводится следующим образом. Тщательно моют клубни картофеля, обсушивают и нарезают на ломтики толщиной 3 см. На свежей поверхности ломтика клубня скальпелем вырезают лунки диаметром 1 см и глубиной 0,5 см. В лунки контроля заливают воду, в другие вносят суспензию зооспор возбудителя фитотрозы. Ломтики помещают в чашки Петри, где ложечкой увлажняют фильтровальную бумагу. Чашки помещают для инкубации в термостат на 24–48 ч при температуре 22–24 °С. Следующий этап – это проверка фунгитоксичности образовавшегося диффузата. Пипеткой из лунки выбирают жидкость (инфекционный диффузат), наносят на предметное стекло и на это же стекло, обычно с другого конца, наносят каплю воды (контроль). В каплю инфекционного диффузата и воды препаративной иглой вносят конидии *Fusarium solani*. Предмет-

ные стекла с диффузатами помещают, предварительно пометив, во влажную камеру на сутки в термостат при температуре 22–24 °С. За этот период конидии начинают прорастать. Через сутки проводится анализ количества конидий и длины гиф. Результаты выражают в процентах. Полученные данные ингибирования записывают в табл. 9.

Таблица 9. Фитоалексинная активность клубней сортов картофеля, характеризующихся различной фитотроустойчивостью

Сорт картофеля	Всего конидий в поле зрения	Из них проросших	Проросших, %	Длина гиф

Задание 2. Определить фитоалексинную активность клубней картофеля с различной устойчивостью к патогенам.

Цель задания: установить образование фитоалексинов у различных по устойчивости к патогенам сортов картофеля.

Материал и оборудование: диффузат из лунок клубней картофеля; мерный цилиндр на 20 мл; колбы емкостью 50 мл; стеклянные палочки; гексан; фарфоровые чашки; пипетки.

Методика подготовки клубней и получения спороношения патогена аналогична описанной в задании 1.

Ученые В.Г. Иванюк и В.Т. Михальчик предложили следующую методику изучения фитоалексинной активности клубней картофеля с различной устойчивостью к фитопатогенам. Собирают диффузат из лунок в колбы отдельно по вариантам. Лунки промывают 2–3 раза стерильной водой, соскабливая верхний слой клеток. Промывную воду сливают в соответствующую колбу. В контрольные и опытные колбы доливают по 20 мл гексана. Колбы встряхивают в течение 5 мин, соблюдая осторожность (возможно вспенивание жидкости). После отстаивания (5 мин) и расслоения жидкости в колбах верхний слой осторожно сливают в фарфоровые чашки. Чашки подписывают и ставят в вытяжной шкаф для выпаривания гексана.

На следующем занятии после испарения гексана к осадку на дне чашки добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты. Стеклянной палочкой помешивают кислоту в чашке, соскребая осадок со дна, и наблюдают реакцию окрашивания.

Интенсивность окраски (покраснения) является показателем фитоалексинной активности клубней и степени устойчивости сорта. В контроле окрашивание отсутствует.

Полученные данные записывают по форме табл. 10.

Полученные результаты используют для сравнительной оценки фитоалексинной активности разных по устойчивости к патогенам сортов картофеля.

Таблица 10. Интенсивность образования фитоалексинов

Сорт картофеля	Вариант	Интенсивность окрашивания	Степень устойчивости сорта
	Контроль		
	Опыт		

Задание 3. Провести обнаружение фитоалексинов методом капельных диффузатов бобовых.

Цель задания: установить образование фитоалексинов у гороха.

Материал и оборудование: створки бобов различных по устойчивости к фузариозу сортов гороха; зерна ячменя со спороношением *Helminthosporium sativum* или *Fusarium oxysporum*; чашки Петри с фильтровальной бумагой; колбы емкостью 100 мл; дистиллированная вода; культура гриба на питательной среде; предметные и покровные стекла; микроскопы; скальпели; центрифуга.

Фитоалексины интенсивно образуются в свежих тканях растений, поэтому створки бобов из естественных условий – наиболее подходящий материал для их образования.

За 3–4 дня до занятия необходимо получить спороношение конидий *Helminthosporium sativum*. Зараженные семена ячменя помещают в чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой и выдерживают 3–4 дня в термостате при температуре 22–26 °С. Зерновки покрываются после инкубации темным налетом спороношения гриба.

Свежие бобы устойчивого и восприимчивого к заболеванию сорта (по 20 шт. каждого на студента) расчленяют продольно и удаляют из них семена. Помещают расчлененные створки в чашки Петри и готовят суспензию конидий гельминтоспориума.

Следует помнить, что реакцию сверхчувствительности и образование фитоалексинов вызывают патогены, которые не способны заразить этот вид растений. В этом опыте грибок гельминтоспориум не вызывает болезни бобовых. Зараженные семена ячменя (200 зерновок) помещают в сосуд с 50 мл воды и хорошо взбалтывают. В результате этого образуется инфекционная суспензия. Данная суспензия должна нести определенную нагрузку спор. При проверке такой суспензии в поле зрения при малом увеличении микроскопа должно быть не менее 10 конидий.

Внутренние створки бобов выстилают эндокарпий. Его инокулируют, т.е. в семенные впадины помещают инфекционную каплю (0,2 мл) и выдерживают в термостате 24 часа. За этот период происходит следующее. В инфекционной капле прорастают конидии, накапливаются метаболиты – продукты обмена веществ гриба. Метаболиты воздействуют на ткань растения, в результате образуются фитоалексины. Происходит реакция сверхчувствительности в зоне соприкосновения

ткани с инфекционной каплей, и ткань приобретает некротическую окраску. Через 24 часа капли жидкости в семенных впадинах бобов собирают пипеткой и для удаления конидий и обрывков грибницы центрифугируют. Прозрачную жидкость используют для проверки ее фунгитоксичности. Для этого в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу помещают предметные стекла, помеченные номерами снизу.

На каждое стекло помещают каплю дистиллированной воды (контроль) и каплю диффузата. В капли (контроль и диффузат) препаративной иглой вносят конидии патогена. Предметные стекла покрывают покровными стеклами, чашки Петри закрывают и ставят на 24–42 ч в термостат при температуре 20–22 °С. Через сутки начинают изучать влияние диффузата на прорастание конидий и длину гиф в опытных и контрольных каплях.

Под микроскопом рассматривают и подсчитывают число проросших конидий. Конидии у гелиментоспориума крупные, темно-оливковые с поперечными перегородками, могут прорасти с любой клетки. Измеряют длину гиф.

Результаты оформляют по форме табл. 11.

Таблица 11. Прорастание конидий и длина гиф в диффузатах бобовых восприимчивых и устойчивых к грибным болезням сортов

Сорт	Устойчивость	Вариант опыта	Количество конидий в поле зрения микроскопа	% проросших конидий	Длина гиф	% пораженных растений фузариозом	Коэффициент корреляции
	Восприимчивый	Контроль					
		Инфекционный диффузат					
	Устойчивый	Контроль					
		Инфекционный диффузат					

Образование фитоалексинов происходит в тканях устойчивых и неустойчивых сортов. Однако на ряде культур установлено, что фитоалексинная активность диффузатов с неустойчивых сортов меньше, чем устойчивых. В тканях устойчивых сортов образуется больше фитоалексинов. Поэтому этот метод может быть использован для оценки устойчивости к болезням. Для такой оценки предлагаем изучить высокоустойчивые и восприимчивые в различной степени к фузариозу сор-

та люпина.

Так как объем приведенного задания велик, предлагаем его разбить на три занятия.

На первом занятии необходимо выполнить следующее:

- пронумеровать чашки Петри;
- приготовить суспензию спор;
- продольно разделить бобы и удалить семена;
- поместить расчлененные створки в чашки Петри;
- провести инокуляцию створок, а в створки бобов, служащие контролем, внести такое же количество капель воды;
- поместить закрытые чашки Петри в термостат.

Второе занятие:

- собрать жидкость инфекционного диффузата и воды (контроль) пипеткой;
- инфекционный диффузат процентрифугировать;
- на предметные стекла поместить по капле инфекционного диффузата и воды (контроль). Предварительно стекла снизу должны быть помечены;
- в капли препаративной иглой внести конидии *Fusarium oxysporum* f. *lupini*, закрыть покровным стеклом;
- закрыть чашки Петри и поместить в термостат при температуре 20–22 °С.

Третье занятие:

- под микроскопом подсчитать количество конидий в контроле и инфекционном диффузате;
- подсчитать количество проросших конидий и измерить длину гиф;
- оформить результаты в табл. 11.

Для определения коэффициента корреляции между поражением растений фузариозом и процентом проросших конидий в диффузате воспользуйтесь данными по поражаемости растений сорта на инфекционном фоне.

Глава 3. СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ И ПАТОГЕННОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ

Взаимоотношения патогенов и растений-хозяев сложны и многообразны. Различные способности патогенов к паразитизму определяются их генетическими и физиологическими свойствами. Большое значение имеют наличие генов вирулентности и эффективность действия их продуктов.

Важнейшими свойствами паразитов являются патогенность, вирулентность и агрессивность.

3.1. Специализация и изменчивость патогенов

Важным фактором, определяющим характер проявления иммунологических реакций у растений, является биологическая специализация патогена.

Специализация патогенов – это приуроченность их к определенному питающему субстрату, способность паразитировать на одном или нескольких растениях-хозяевах.

Филогенетическая специализация – это избирательная способность патогенов паразитировать на определенном круге питающих растений.

Она может быть широкой (патоген может поражать разные роды, семейства и порядки) и узкой специализации (родовой – патоген, поражающий растения только одного рода, видовой – вызывает заболевания у одного какого-либо вида растений). Кроме этого различают другие типы специализации.

Органотропная – это поражение патогеном определенных органов растений.

Гистотропная (тканевая) – это приуроченность к паразитированию на определенных тканях растения.

Возрастно-физиологическая (онтогенетическая) специализация характеризуется приуроченностью патогена к поражению растений в определенные возрастные фазы их развития.

У одного и того же патогена может наблюдаться несколько типов специализации. Наибольшее значение в иммунитете растений имеет филогенетическая специализация, проявляющаяся в приспособленности патогенов поражать определенный род, вид и даже сорт растений. К узкоспециализированным патогенам относится большинство облигатных паразитов и факультативных сапротрофов. Они избирательно приспособлены для поражения конкретных (нередко близкородственных) видов растений-хозяев.

Такие специализированные формы, которые различаются между собой по способности вызывать заражение определенных сортов растения-хозяина, называются физиологическими расами, т.е. различия между расами основываются на различии в физиологии заражения. Способность одной и неспособность другой расы вызывать заражение одного и того же сорта могут быть связаны только с различными способами воздействия этих рас на атакуемое растение.

Установлено, что расы неоднородны и состоят из биотипов (патотипов). Это можно установить по особенностям их проявления (например, более мелкие размеры пустул) при поражении сорта.

В связи с периодической сортосменой культур в естественных условиях наблюдается постоянное изменение расового состава возбудителей болезней. Одни расы получают преимущественное развитие,

другие подавляются. Физиологические расы принято обозначать цифрами в соответствии с содержанием в них генов вирулентности (0; 1; 2; 3; 1,2; 1,3; 2,3; 1,2,3 и т.д.). Для определения рас используют тест-сорты (сорты-дифференциаторы), обладающие различными генами устойчивости, контролирующими реакцию на заражение. Каждая вновь обнаруженная раса получает свой порядковый номер в соответствии с характером ответных реакций растений сортов-дифференциаторов. В расах присутствуют факторы вирулентности, в дифференциаторах – факторы вертикальной устойчивости. Между расой паразита и сортом растения-хозяина происходит избирательное взаимодействие. Если та или иная раса паразита преодолевает устойчивость сорта, то наблюдается реакция совместимости. На пораженных органах проявляются симптомы болезни. При этом реакции на заражение бывают разнообразными, и их подразделяют на отдельные классы (типы), которые определены для каждого патогена.

Если раса сталкивается с устойчивостью сорта, то на органах растения наблюдается реакция сверхчувствительности, что проявляется в виде мелких некрозов в местах внедрения возбудителя.

Преодолеть устойчивость сорта с фактором или факторами вертикальной устойчивости вирулентная раса может в том случае, если они будут полностью соответствовать фактору или факторам вертикальной устойчивости. Если этого соответствия не будет хотя бы по одному из факторов, то раса паразита не сможет преодолеть устойчивость сорта.

Генетические факторы вирулентности определяются *vir*-генами (*virulence* – вирулентность), а факторы вертикальной устойчивости – *R*-генами (*resistance* – устойчивость).

Образование в природе многочисленных рас и форм патогенов с разнообразными морфологическими и физиологическими свойствами происходит в результате комбинационной и мутационной изменчивости.

Появление специализированных видов, форм, рас связано со способностью патогена преодолевать защитные механизмы данного растения. В основе возникновения новых форм патогенов лежит изменчивость.

Задание 1. Установить расы *Phytophthora infestans*, поразившие сорта картофеля.

Цель задания: приобрести навыки по определению расового состава фитофтороза картофеля.

Материал и оборудование: застекленные стеллажи; фильтровальная бумага; марля для поддержания увлажнения листа в норме; кюветы с водой; листья сортов-дифференциаторов; культура фитофторы (моноспоровая).

В 1953 г. У. Блеком с сотрудниками была разработана в соответствии с теорией Флора по принципу комплементарности международ-

ная схема взаимодействия генов устойчивости картофеля и генов вирулентности рас *Phytophthora infestans*.

Для изучения и идентификации рас были подобраны растения-дифференциаторы среди гомозиготных линий *S. demissum* и *S. stoloniferum* (Шик, 1959) и гомозиготных образцов *S. tuberosum* (Блек, 1960).

В основу системы взаимодействия генов картофеля и физиологических рас *P. infestans* была положена реакция листьев, так как характер устойчивости клубней в большинстве случаев не соответствует устойчивости ботвы.

На стеллажах размещают стекла, покрытые фильтровальной бумагой, а затем слоем марли. Концы марли с двух сторон опускают в кюветы с водой (для поддержания увлажнения листа в норме, при которой не происходит их загнивания). Стекла помещаются в шкафы или фанерные ящики, стенки которых выстланы изнутри оберточной или фильтровальной бумагой, обильно политой до полного смачивания.

Листья сортов-дифференциаторов берут с третьего яруса, считая вниз от вершины стебля, с хорошо сформировавшейся пластинкой. На каждый изолят берется по два листа. К черешку листа прикрепляется этикетка, где в правом верхнем углу пишется номер дифференциатора. Листья на стекла раскладываются нижней стороной вверх в один ряд по горизонтали. Для контроля в каждую инокулируемую партию листьев на стекла дополнительно кладут по два листа заведомо сильно восприимчивого сорта.

Инокулюм готовится заранее. Выделяется моноспоровая культура, которая затем размножается в нужном количестве на ломтиках клубня восприимчивого сорта картофеля. Для активизации выхода зооспор из конидий инокулюм выдерживают при температуре 10–20 °C в течение 20–30 мин.

Для заражения листьев пипеткой с остро оттянутым концом наносят по две капли суспензии на каждую дольку листа, располагая каждую из них сбоку от центральной жилки. Капли при этом должны быть не скатывающиеся. После этого стекла с листочками помещают в условия влажной камеры на одни сутки. Через сутки влажная камера убирается и стекла оставляют стоять открытыми на 4–5 дней до появления некротических пятен. Затем стекла с листьями помещают снова в условия влажной камеры на сутки – до появления спороношения, после чего проводится учет результатов заражения. Образование спороношения контролируется под лупой или микроскопом.

Определение рас проводится на основе характера поражений тест-сортов. При инфицировании листья на стекле располагают в порядке усложнения генотипа растения-дифференциатора, с которых они взяты. Так, вначале кладут листья от растений с генотипом *r*, затем – *R*₁;

Таблица 12. Схема определения рас фитотторы

Генотип дифференциатора	Расы фитотторы																
	0	1	2	3	4	1.2	1.3	1.4	2.3	2.4	3.4	1.2.3	1.2.4	1.3.4	2.3.4	1.2.3.4	
r	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R ₁	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
R ₂	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
R ₃	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
R ₄	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
R ₁ R ₂	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
R ₁ R ₃	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
R ₁ R ₄	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
R ₂ R ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
R ₂ R ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
R ₃ R ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
R ₁ R ₂ R ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
R ₁ R ₂ R ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
R ₁ R ₃ R ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
R ₂ R ₃ R ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
R ₁ R ₂ R ₃ R ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Примечание. (-) – устойчивость, (+) – восприимчивость.

R₂; R₃; R₄; R₁R₂; R₁R₃; R₁R₄; R₂R₃; R₂R₄; R₃R₄; R₁R₂R₃ и так далее для каждого изолята гриба. Концентрация инокулюма должна составлять не менее 15–20 конидий в поле зрения микроскопа при 120^x. Генотипическая характеристика расы устанавливается на основе наличия или отсутствия поражения отдельных сортов, по способности изолята поражать ту или иную группу, входящую в набор тест-сортов. Поражаемыми считаются те растения, на которых наблюдается спороношение гриба. Образование спороношения только на некротической зоне пятна принимается за отсутствие поражения, так как развитие возбудителя в таких случаях идет за счет его способности расти на участках отмершей ткани.

При учете типы реакций отмечаются знаком «+» – поражение и «-» – отсутствие поражения.

По международной номенклатуре каждая раса обозначается индексом того генотипа растения, который она способна поражать.

Так, если испытываемый изолят дал поражение только сорта с генотипом R₁, то и раса соответственно обозначается индексом 1. Если изолят заразил сорт с генотипом R₃, то и раса будет обозначена цифрой 3. Если он вызвал поражение обоих сортов (генотипа R₁ и генотипа R₃), то он должен быть зарегистрирован как раса 1.3 и т. д. Изоляты, способные заражать только растения генотипа г, представляют собой расу 0. Сорта других генотипов раса 0 не заражает.

Для быстрого ориентирования, с какой именно расой имеем дело, нужно вначале проверить на поражение сорта, характеризующиеся наличием одного доминантного гена устойчивости (сорта генотипов R₁; R₂; R₃; R₄ и т.д.). Но сорта этого типа могут поражаться и расами, имеющими в своем индексе две цифры. Так, раса 1.3 будет поражать сорта генотипа R₁ и R₃, равно как и генотипа R₁R₃. Раса, имеющая индекс из трех цифр, например, 1.3.4, будет заражать сорта генотипов R₁; R₃; R₄; R₁R₃; R₁R₄; R₃ R₄; R₁R₃R₄ (табл. 12).

Дальнейшее развитие селекционной работы и изучение специализации *Ph. infestans* позволило выявить гены устойчивости R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ и соответствующие им расы патогенов, но принцип построения остался прежний. В настоящее время отмечается усложнение расового состава. Все чаще в популяции патогена стали встречаться расы, включающие от 5 до 9 генов вирулентности.

Результаты определения рас занесите в табл. 13.

Таблица 13. Результаты определения рас фитофтороза на сортах картофеля

Сорт картофеля	Номер расы

Задание 2. Определить расовый состав возбудителя *Fusarium*

oxysporum f. lupini по системе Хабгуда.

Цель задания: установить расовый состав популяции возбудителя фузариозного увядания люпина по системе Хабгуда.

Материалы и оборудование: вегетационные сосуды с сортами-дифференциаторами люпина; изоляты чистой культуры возбудителя.

Род *Fusarium* по характеру взаимоотношений с высшими растениями относится к наиболее широко распространенным паразитам с различной степенью паразитизма. Наблюдаются различия в поражении различных видов и сортов люпина, т.е. местные популяции возбудителя обладают качественным составом.

Физиологические расы по системе Хабгуда (К.М. Nabgood) определяются следующим образом. Сорта-дифференциаторы следует располагать только в строго определенном порядке. Каждому сорту присваивается бинарный номер от 2^0 до 2^n . Ряд сортов-дифференциаторов по желанию исследователя можно продлевать, добавляя их в левой стороне табл. 14.

Для того чтобы определить номер расы, необходимо суммировать числа бинарных номеров сорта, которые проявили реакцию восприимчивости к клонам (штаммам). Так, раса 5, например, вирулентна к сортам Старт и Академический 1, сумма их бинарных номеров составляет $4 + 1 = 5$. Раса, не вызвавшая гибели растений ни у одного сорта, дифференцируется как 0 – авирулентная.

При обозначении типа реакции сорта на поражение пользуйтесь следующей шкалой:

У – гибель растений отсутствует (реакция устойчивости);

В – гибель растений наблюдается (реакция восприимчивости).

Учет пораженности проводить нужно в фазе бутонизации – начала цветения.

Результаты занесите в табл. 14.

Таблица 14. Реакция тест-сортов на заражение

Изолят (штамм) патогена	Тест-сорта (поражено растений, %)			Дифференциация рас			Раса (номер)
	Старт (белый)	Немчиновский 846 (узколистный)	Академический 1 (желтый)	Старт 2^2-4	Немчиновский 846 2^1-2	Академический 1 2^0-1	

3.2. Патогенность, вирулентность и агрессивность возбудителей болезней

Патогенность – это способность вредных микроорганизмов преодолевать защитные механизмы растения, вести паразитический образ жизни и вызывать патологический процесс.

Вирулентность – это качественная мера патогенности. Патогенный вид может быть неоднороден по признаку вирулентности, т.е. способности поражать определенный круг (сортов или видов) растений. Контролируется она генами и определяется взаимодействием между генами устойчивости у растения-хозяина и генами вирулентности у патогена. На основании неоднородности проводится внутривидовая дифференциация патогенных видов. Степень паразитической специализации у разных групп паразитов может быть разной. Для облигатных паразитов (биотрофов) характерны специализированные формы, поражающие растения определенного рода. В отношении других родов этого семейства данная форма не вирулентна, и растения не поражаются ни при каких условиях, т.е. у биотрофов признак вирулентности относительно постоянен. У некротрофов, не нуждающихся в живых клетках хозяина, нет такой жесткой специализации, и признак вирулентности у них выражен менее четко.

Агрессивность – это количественная мера патогенности, которая определяет возможность вызывать заболевание минимальным количеством инокулюма. Проявление агрессивности зависит от характера поражения: продолжительности инкубационного периода, интенсивности спороношения, скорости распространения на расстояния и т.д.

Агрессивность зависит и от условий внешней среды, поэтому может изменяться в значительных пределах. Вирулентность, наоборот, слабо подвержена влиянию окружающей среды и может изменяться только в результате изменений в генетическом аппарате возбудителя.

Задание 1. Определить вирулентные и агрессивные свойства возбудителя *Helminthosporium teres* сетчатого гельминтоспориоза ячменя.

Цель задания: определить вирулентные и агрессивные свойства изучаемых изолятов сетчатого гельминтоспориоза на районированных сортах ячменя.

Материал и оборудование: чашки Петри с чистой культурой различных изолятов возбудителя сетчатого гельминтоспориоза ячменя; растения ячменя районированных сортов в фазе одного листа, выращенные в кюветах на двух слоях фильтровальной бумаги или в рулонах; чашки Петри или кюветы; пипетки; полиэтиленовые пакеты.

В чашки Петри или кюветы на увлажненную фильтровальную бумагу раскладывают отрезки листьев исследуемых сортов. Длина листовой пластинки должна составлять 1,5–2,0 см.

Отрезки листьев инокулируют различными изолятами возбудителя, нанося микропипеткой по две капли конидиальной суспензии гриба на каждый отрезок. Кюветы закрывают стеклом и оставляют на свету. Через 5–7 суток после инокуляции определяют реакцию на заражение патогеном по пятибалльной шкале:

- 1 – точечные некрозы без хлороза: высокоустойчивый сорт;
- 2 – коричневые некротические пятна с хлоротичным окаймлением или без хлороза, не распространяющиеся по листу: относительно устойчивый сорт;
- 3 – некротические коричневые пятна с хлорозом, распространяющиеся по отрезку листа: восприимчивый сорт;
- 4 – коричневый некроз занимает весь отрезок листа: высоковосприимчивый сорт.

Балл «0» в шкале не приведен, поскольку в лабораторных условиях абсолютно непоражаемых сортов выявить не удастся.

По результатам заражения определяется вирулентность изучаемых изолятов. Результаты опыта записываются по форме табл. 15.

Таблица 15. Вирулентность изолятов возбудителя сетчатого гельминтоспориоза (*Helminthosporium teres*) на сортах ячменя

Название сорта	Реакция сорта на поражение изолятами					Средний балл поражения
	1	2	3	...	n	

По количеству инфекционных пятен на единицу площади листа ячменя при одинаковой инфекционной нагрузке определяют агрессивность, которая проявляется в увеличении числа поражений и объясняется скоростью прорастания спор и их внедрения в ткани растений.

Для определения агрессивности изолятов сетчатого гельминтоспориоза поступаем следующим образом. Листья проростков ячменя раскладываем в чашки Петри или на стекла вплотную друг к другу и опрыскиваем конидиальной суспензией гриба. Каждый изолят должен иметь одинаковую споровую нагрузку и расход суспензии спор в миллилитрах. На одну чашку Петри, например, достаточно для опрыскивания 0,5 мл суспензии спор. После инокуляции чашки Петри закрывают, выдерживают сутки на рассеянном свету, а затем на дно наливают дистиллированную воду. Учет количества инфекционных пятен на листьях проводим на третьи сутки после инокуляции.

Вместо чашек Петри можно воспользоваться обыкновенными стеклами. Стекло размерами с растителью предварительно опрыскивают 1 мл суспензии спор изолята сетчатого гельминтоспориоза, а затем сплошным зеленым газоном раскладывают листья ячменя одного сорта и покрывают вторым стеклом. Все это помещают в целлофановый па-

кет, на краю кладут смоченный ватный тампон и выдерживают на рассеянном свете. Учет проводят через трое суток.

Сравнительным показателем агрессивности служит число инфекционных пятен на одном и том же сорте при заражении (инокуляции) его разными изолятами возбудителя. Результаты заносят в табл. 16.

Таблица 16. Сравнительная агрессивность изолятов возбудителя сетчатого гельминтоспориоза ячменя

Показатели	Номер изолята					
	1	2	3	4	...	n
Число инфекционных пятен						

Задание 2. Установить проявление агрессивных свойств расы Ph. infestans при заражении ломтиков клубней картофеля.

Цель задания: установить, как влияют условия питания (различные питательные среды) на агрессивные свойства Ph. infestans.

Материал и оборудование: чашки Петри; восприимчивый к фитофторозу сорт картофеля, не обладающий полевой устойчивостью с генотипом г (Приекульский ранний, Берлихенген, Северная роза, Кобблер, Мурманский, Волховский); чистая культура расы Ph. infestans, выращенная на горохо-овсяной смеси, среде Хелла и ломтиках клубней картофеля; дистиллированная вода; микропипетки; бумажные фильтры.

В лабораторных условиях готовят суспензию конидий, используя для этого в одном случае пробирку с чистой культурой расы на различных питательных средах и в другом – культуру гриба на ломтиках картофеля. Для приготовления суспензии в пробирку с культурой гриба заливают стерильную воду, слегка встряхивают пробирку и воду сливают в колбу по каждой питательной среде отдельно.

Для приготовления суспензии конидий с культуры гриба на ломтиках картофеля препаративной иглой осторожно снимают мицелий и опускают его в колбу с водой. В воде мицелий сильно встряхивают для отделения конидий от конидиеносцев. Полученную суспензию фильтруют через двухслойную марлю.

Под микроскопом проверяют концентрацию конидий в суспензиях. Необходимо добиться одинаковой концентрации конидий во всех вариантах опыта – не менее 20 конидий в поле зрения микроскопа при малом увеличении. Для этого разбавляют стерильной водой (в случае повышенной концентрации) или добавляют дополнительно инокулюм из пробирки с чистой культурой либо с ломтиков картофеля соответственно.

В чашки Петри помещают по три небольших ломтика картофеля сорта с генотипом г. Ломтики должны быть надрезаны толщиной

1,5–2,0 см.

Затем в каждый ломтик через надрез вносят стерильной пипеткой суспензию конидий, чтобы в одной чашке один ломтик был заражен суспензией конидий из чистой культуры, выращенной на горохо-овсяной смеси, второй – на среде Хелла, третий – суспензией конидий с ломтиков картофеля.

Чашки Петри с зараженными ломтиками закрывают сверху крышкой, на внутренней стенке которой помещен кружочек увлажненной фильтровальной бумаги. Чашки подписывают, завертывают в бумагу и ставят в термостат при температуре 20 °С.

Учет поражения проводят через 7 суток. При учете отмечают размер поражения по наибольшему диаметру (в мм) и интенсивность спороношения визуалью (в баллах) по следующей шкале:

- 1 – единичные конидиеносцы;
- 2 – конидиеносцы в массе просматриваются невооруженным глазом;
- 3 – интенсивное спороношение.

По результатам учетов – размеру поражения и интенсивности спороношения дают заключение о сравнительной агрессивности изолятов расы с разных питательных сред.

Результаты опыта записывают по форме табл. 17.

Таблица 17. Сравнительная характеристика агрессивности гриба *Ph. infestans* в зависимости от условий культивирования

Условия культивирования	Размеры поражения, мм	Интенсивность спороношения, балл	Агрессивность
Горохо-овсяная смесь			
Смесь Хелла			
Ломтики картофеля			

Глава 4. СОЗДАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ И ИНВАЗИЙНЫХ ФОНОВ В СЕЛЕКЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Сохранить на земном шаре многие ценные сельскохозяйственные культуры удалось только благодаря выведению болезнеустойчивых (иммунных) сортов и видов этих культур.

Выявление признака устойчивости проводят в условиях, способствующих развитию заболеваний, и при наличии контакта патогена с изучаемым растением. В селекции для этой цели часто используют естественные источники инфекции.

Оценку селекционного материала целесообразно проводить в районах массового развития тех или иных болезней и вредителей. И даже в

этом случае оценка в естественных условиях не лишена недостатков. В естественных условиях в определенной местности могут отсутствовать расы патогена, способные поражать изучаемый сортообразец, гибрид или сорт. В естественных условиях на небольших делянках трудно добиться равномерного распределения инфекционной нагрузки. Поэтому кроме изучения селекционного материала в естественных условиях при оценке устойчивости и для отбора соответствующих биотипов растений пользуются искусственными инфекционными фонами.

Инфекционный фон – это наличие инфекции (патогена) и внешних условий, обеспечивающих успех заражения. В зависимости от способа его создания различают естественный и искусственный фоны.

При испытании в условиях естественного инфекционного фона посевы ведут на участках (полях, делянках), где в почве накопилось значительное количество инфекции. Часто это происходит при многолетнем бессменном возделывании культуры на одном и том же месте. При создании искусственного инфекционного фона в почву или на растения вносят культуру размноженного в условиях лаборатории инфекционного материала.

Естественные и искусственные инфекционные фоны могут быть созданы внесением в почву, на растения (листья, стебли, цветки, плоды) грибов, бактерий, вирусов. При энтомологических оценках создают инвазийные фоны.

Приемы принудительного заражения разнообразны. Их выбор зависит от биологических особенностей патогена или вредителя и растения. Создание условий, способствующих заражению растений, называется провокационным фоном.

Для изучения соответствующего инфекционного фона необходимо знать инфекционную нагрузку и условия для заражения. Под *инфекционной нагрузкой* понимают количество инфекции, приходящееся на определенную площадь растения или почвы.

4.1. Инфекционная нагрузка и методы ее определения

В зависимости от возбудителя и характера болезни методы определения инфекционной нагрузки могут быть различными. Для возбудителей, которые вызывают поражение вегетативных органов, определяют число спор в одной инфекционной капле; если болезни способны заражать растения через семена и сохраняются на семенах, то пользуются определением числа спор на одно зерно; при почвенных возбудителях – на 1 г почвы.

Различают минимальную, оптимальную и максимальную величины инфекционной нагрузки. Оптимальная инфекционная нагрузка дает наибольшее число случаев поражения при заданных условиях.

Задание 1. Определить инфекционную нагрузку на одно зерно те-

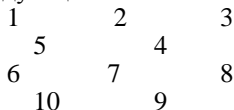
лиоспор твердой головни пшеницы.

Цель задания: определить инфекционную нагрузку телиоспор твердой головни пшеницы на одно зерно.

Материал и оборудование: микроскопы и все принадлежности для микроскопирования; ручная или электрическая центрифуга; центрифужные пробирки; пробирки объемом 15 см³; пипетки; разборные доски и шпатели; образцы семян, заспоренные телиоспорами возбудителя твердой головни пшеницы.

Определение наличия спор на семенах проводят обычно методом центрифугирования с включением следующих операций: отбор проб семян, смыв с семян телиоспор, центрифугирование суспензии, разбавление осадка водой, перерасчет количества спор на одно зерно.

Из образца семян берут две пробы по 100 семян, помещают каждую в пробирку и взбалтывают в течение 5 мин, предварительно залив каждую пробу 10 мл воды. Суспензию спор сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 3 мин при 50 об/мин. После центрифугирования сцеживают воду до осадка и доливают 0,5 мл воды (15 капель). Пипеткой взбалтывают осадок и одну каплю жидкости наносят на предметное стекло. При малом увеличении микроскопа подсчитывают число спор в поле зрения микроскопа не менее чем в десяти полях зрения по следующей схеме:



Результаты подсчетов записывают в табл. 18 и определяют среднее количество спор из десяти полей зрения микроскопа.

Таблица 18. Результаты подсчета среднего числа спор в поле зрения микроскопа

Сорт, сортообразец	Число спор в поле зрения микроскопа										Среднее число спор в поле зрения (А)	Количество спор на одно зерно (Х)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

Для определения заспоренности семян телиоспорами используют следующую формулу:

$$X = \frac{A \cdot K}{100},$$

где А – среднее число спор в одном поле зрения;

К – коэффициент (число полей покровного стекла, умноженное на

число капель воды, добавленных в осадок после центрифугирования);

100 – число зерен в пробе.

Площадь одного поля зрения вычисляют по формуле πr^2 . Радиус поля зрения можно определить и с помощью окулярного микрометра, на котором выгравирована линейка с делениями в 0,1 мм. Окулярный микрометр кладут на столик микроскопа или на предметное стекло. При малом увеличении микроскопа подсчитывают число делений окулярного микрометра, располагающихся по диаметру поля зрения, затем выражают это число в миллиметрах путем умножения числа делений на 0,1 мм и делят его на 2. Полученное число (r) подставляют в формулу для расчетов площади поля зрения.

Площадь стандартного покровного стекла составляет $18 \times 18 = 324 \text{ мм}^2$. Число полей зрения микроскопа получают делением площади покровного стекла на площадь одного поля зрения микроскопа. Число спор в одной капле узнают путем умножения среднего количества спор в одном поле зрения на число полей зрения.

Мы приводим примерные величины, характерные для биологических микроскопов: диаметр поля зрения микроскопа равен 1,7 мм; площадь зрения микроскопа – $3,14 \times (0,85)^2 = 2,27 \text{ мм}^2$; число полей зрения в одном покровном стекле – $324 : 2,27 = 142,7$.

Результаты анализа оформляют в табл. 19.

Таблица 19. Инфекционная нагрузка телоспор возбудителя твердой головни пшеницы на семенах различных сортов

Сорт, сортообразец	Число спор на одно зерно по повторениям				Среднее
	I	II	III	IV	

За одно повторение можно брать нагрузку спор на зерно из пробы данного образца. Чем выше заспоренность семян, тем выше инфекционная нагрузка и вероятность для заражения при благоприятных условиях в период прорастания семян, тем выше процент поражения растения твердой головней.

Кроме инфекционной нагрузки, существует зависимость между пораженностью семян и метеорологическими факторами. При сравнительно низких почвенных температурах (6–13 °C) затягивается процесс прорастания, проросток дольше обычного находится в почве и более подвержен поражению. На пораженность твердой головней оказывают влияние влажность, кислотность почвы, внесение удобрений, крупность семян и глубина их заделки.

Поэтому при создании инфекционных фонов к болезням необходимо обеспечивать оптимальную инфекционную нагрузку с благоприятными условиями для развития патогенов.

Задание 2. Определить инфекционную нагрузку патогена (*Helminthosporium sativum*) гельминтоспориозной корневой гнили в почве.

Цель задания: определить инфекционную нагрузку (количество зачатков возбудителя) гельминтоспориозной корневой гнили в 1 г почвы различными методами.

Материал и оборудование: листья ячменя, выращенные в растильнях в течение 14–16 дней в хорошо освещенном помещении; образцы почвы; стекла размером 20×25 см; шпатели; марганцевокислый калий; сито с ячейками в 1 мм; весы лабораторные; полиэтиленовые пакеты размером 29×40 см; минеральное масло; колбы.

Инфекционную нагрузку спор гельминтоспориозной корневой гнили определяют различными способами: методом разведения, флотации, приманочным и т.д. Рекомендуем изучить два способа.

1. Приманочный метод. Этот метод включает подготовку листьев (приманочного материала), подготовку почвы, раскладку и инкубацию листьев, анализ.

Подготовка семян. Семена ячменя, предварительно продезинфицированные термически при температуре 47 °С в течение 2 часов или химически рекомендованным протравителем, замачивают в остуженной кипяченой воде. В растильни кладут деревянные планки размером 1×1×10 см, на них – покрытые фильтровальной бумагой стекла размером 12×19,5 см. В растильни наливают водопроводную воду до уровня стекол, на фильтровальную бумагу насыпают сплошным слоем семена. Затем растильни сверху покрывают стеклами и выдерживают в термостате или в лабораторных условиях 4 дня при температуре 22–24 °С. После появления проростков стекла снимают. По мере испарения воды ее доливают с добавлением на 1 л 1 г аммиачной селитры и выращивают 14–16 дней в хорошо освещенном помещении при температуре 20–24 °С.

Подготовка почвы. Из среднего образца воздушно-сухой почвы, просеянной через сито с ячейками в 1 мм, выделяют две навески по 1 г. В навеску почвы добавляют 0,5 мл раствора 0,002%-ного марганцевокислого калия, тщательно перемешивают и наносят равномерно шпателем на стекло размером 20×25 см.

Раскладка и инкубация листьев. На мазок сплошным слоем накладывают листья ячменя верхней стороной, покрывают вторым стеклом, слегка прижимают и помещают для создания влажной камеры в полиэтиленовый пакет размером 29×40 см. Пакеты размещают горизонтально в светлом помещении и выдерживают 5–7 дней при температуре 22–26 °С.

Анализ. В конце инкубации на зеленом фоне листьев образуются коричневые овальные пятна, иногда со светлым окаймлением, хорошо различимые при визуальном просмотре. Каждый зачаток инфекции в

почве при заражении листовых пластинок дает одно пятно. Высчитывают среднее количество пятен на листьях, размещенных на двух стеклах, что соответствует численности инфекционных зачатков в 1 г почвы.

В связи с тем, что указанным способом нельзя проанализировать почву за одно занятие, целесообразно разбить весь процесс на несколько этапов, дополняя каждый к другим занятиям.

Результаты анализа оформляют в табл. 20.

Таблица 20. Результаты анализа наличия инфекции в почве

Номер образца почвы	Количество инфекционных зачатков в 1 г почвы		Среднее
	1	2	

2. Метод флотации. Из среднего образца воздушно-сухой почвы берут 10 навесок по 10 г. Навеску почвы слегка увлажняют и тщательно перемешивают с 5 мл минерального масла (машинное, дизельное топливо и др.). Полученную смесь помещают в колбочку (100 мл) и добавляют 50 мл водопроводной воды. После встряхивания в течение 5 мин колбочку ставят в вертикальное положение и выдерживают 1,5 ч. Спустя это время большая часть почвы оседает на дно, а на поверхности отстаивается эмульсия. Берут 6 мл эмульсии и просматривают каплями (объем 0,02 мл) на предметном стекле под микроскопом (увеличение 80^x). Подсчет проводят не менее чем в 10 каплях (в каждой десять полей зрения). После этого определяют общее количество конидий в объеме эмульсии одного образца.

Конидии *Helminthosporium sativum* веретенообразные, слегка изогнутые, темно-оливковые с 2–13 перегородками, на концах закругленные. Длина конидий 50–134 мкм, ширина 15–30 мкм.

Пример расчета. В ста полях зрения, или в 2 мл эмульсии, оказалось 137 конидий, а в 60 мл эмульсии число конидий определяем с помощью отношения

$$\begin{array}{r} 2 \quad - \quad 137 \\ 60 \quad - \quad X; \end{array}$$

$$X = \frac{137 \times 60}{2} = \frac{8220}{2} = 4110 \text{ конидий в } 100 \text{ г почвы.}$$

Следовательно, в 1 г почвы содержится 41,1 конидий.

Запись анализа проводится по форме табл. 21.

Сравните результаты анализа зараженности почвы возбудителем гельминтоспориозной корневой гнили двумя методами.

Таблица 21. Результаты анализа наличия инфекции методом флотации

Единицы споровой эмульсии (капли)	Повторение (поле зрения)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
Итого:										

4.2. Методы создания инфекционных фонов путем заражения (инокуляции) посевного и посадочного материала

При оценке устойчивости многих культур к болезням (если патоген может передаваться с семенным материалом) проводят искусственное заражение или заспорение семян. Споры этих заболеваний собирают с пораженных растений с посевов, где наблюдалось заражение, или используют полученные в чистой культуре. При этом учитываются биологические особенности культуры и патогена. В одном случае споры наносят непосредственно на семена (твердая головня пшеницы), в другом зерновки предварительно освобождают от пленок (пыльная и твердая головня овса). Возбудителями пыльной головни ячменя и пшеницы растения заражают во время цветения. В тех случаях, когда заболевание проявляется на проростках, применяют проращивание семян во влажной камере (снежная плесень).

Задание 1. Провести инокуляцию семян сортообразцов пшеницы спорами твердой головни (*Tilletia caries* (D C.) Tull.).

Цель задания: заспорить семена телиоспорами твердой головни для оценки на устойчивость сортов и сортообразцов пшеницы.

Материал и оборудование: телиоспоры твердой головни или пораженные колосья; семена сортообразцов яровой или озимой пшеницы; фарфоровые ступки; колбы емкостью 10 мл; микроскопы и принадлежности для микроскопирования; весы лабораторные.

Споры могут быть готовыми для лабораторных работ или их необходимо приготовить из больных колосьев. Для этого из больных колосьев пинцетом выделяют головневые мешочки, помещают их в фарфоровые ступки. Пестиком или пинцетом осторожно разрушают мешочки и просеивают их через сито. Твердую головню могут вызывать два вида патогена: *Tilletia caries* и *Tilletia levis*. У первого вида телиоспоры

светло- или темно-коричневые, округлые, с сетчатыми утолщениями, размером от 16 до 22 мкм в диаметре; у *T. levis* они светло-коричневые, гладкие, овальные или продолговатые, размером 17–25 × 14–19 мкм, оболочка толстая, нешипованая.

Определите вид головни под микроскопом. Для заражения 100 г семян образца пшеницы в зависимости от погодных условий и, в первую очередь, от температуры требуется от 0,1 до 1 г спорowego материала. Отвесьте сортообразцы: по 100 г семян и требуемое количество спор согласно заданию. Все это поместите в стеклянную банку, закройте пластмассовой крышкой и встряхивайте в течение 3–4 мин. Такой инфекционный материал храните до посева. Заспороженные семена озимой пшеницы высевают в поздний срок, а яровой – как можно раньше. Чтобы усилить заражение, семена заделывают на глубину до 8 см.

В дальнейшем инфицированный материал высеивается на изолированных и удаленных от селекционных и семеноводческих посевов участках, а затем убирается и анализируется при выполнении лабораторной работы (раздел 4.1, задание 1).

Задание 2. Провести инокуляцию сортообразцов пшеницы или ячменя спорами пыльной головни и определить устойчивость селекционного материала ускоренным методом.

Цель задания: овладеть различными методами инокуляции зерновых культур пыльной головней во время опытно-селекционной практики и освоить методы ускоренной диагностики в условиях лаборатории.

Материал и оборудование: колосья пшеницы или ячменя в фазе цветения; телиоспоры патогена пыльной головни; пинцеты; кисточки; ножницы малые; вакуум-прибор Кривченко; колбы; семена, зараженные пыльной головней; набор лабораторных сит; реактивы для фитоэкспертизы семян: 3%-ный раствор NaOH или KOH; 15%-ный раствор NaOH и KOH; 0,1%-ный раствор анилинового синего красителя в 45%-ной уксусной кислоте или в 45–50%-ной молочной кислоте; микроскопы и принадлежности для микроскопирования.

Заражение пыльной головней происходит в период цветения. Телиоспоры, попадая на рыльце цветков, прорастают и образуют грибку, которая проникает в завязь. Достигнув завязи, грибок приостанавливает свое развитие. Зерно формируется нормально и ни внешне, ни по товарным качествам не отличается от здоровых, но для семенных целей оно уже не пригодно. При посеве зерна трогается в рост мицелий патогена, который диффузно распространяется по всему растению и к фазе цветения вызывает разрушение колоса, кроме центрального стержня. Основываясь на биологии патогена, существует целый ряд методов создания инфекционного фона по пыльной головне пшеницы или ячменя. Наиболее простой метод – *метод рассеивания (инокуля-*

цши) пыльной головни происходит за счет распыления телиоспор в период цветения злаков из марлевых мешочков или срезанных пораженных колосьев.

Следующий эффективный метод – *метод подрезания* – это натирание головневыми колосьями колосьев изучаемых сортов, у которых предварительно подрезают на уровне основания зубца колосковые чешуи. Индивидуальное заsporение цветков осуществляют с помощью пинцетов, груши, кисточек. Метод высокоэффективен и применяется при небольших объемах выполнения работ.

В селекционной практике для инокуляции используют вакуумный метод, применяя для этих целей вакуумный аппарат В.И. Кривченко (1960).

Вакуумный прибор конструкции В.И. Кривченко состоит из следующих основных частей: стеклянного цилиндра, соединенного шлангом с насосом для откачивания воздуха; вакуумной пробки с надрезами для стеблей с колосьями и вмонтированной в нее металлической трубки, на которую надевается шланг для подачи в цилиндр суспензии спор; колбы для суспензии (рис. 4).

Суспензию спор пыльной головни готовят из расчета 0,4–0,5 г на 1 л воды (в колбу наливают 200–300 мл воды, всыпают приготовленную навеску спор, взбалтывают и доливают воду до нужного объема). Для заражения растений отбирают 5–10 колосьев, удаляют у них по два верхних недоразвитых колоска, помещают колосья в разрез вакуумной пробки и надевают на нее вакуум-цилиндр. Зажимают пальцами отверстие (трубку) для пуска воздуха в верхней части цилиндра. С помощью насоса разрежают воздух в цилиндре, после чего суспензия спор заполняет цилиндр, покрывая колосья. Затем сжимают шланг, который соединяет цилиндр с колбой, в результате прекращается подача суспензии в цилиндр. Если отпустить пальцы с отверстия трубки и шланга, то под действием струи воздуха суспензия устремляется обратно в колбу.

Обслуживают прибор 2–3 человека. В течение рабочего дня можно инокулировать до 2 тыс. колосьев пшеницы и 1 тыс. колосьев ячменя. Для получения достоверных данных достаточно заразить 6–10 колосьев одного сорта, а при оценке семей и линий гибридов – не менее трех колосьев. С методом В.И. Кривченко студенты могут ознакомиться в полевых или лабораторных условиях, пользуясь срезанными для этого колосьями.

В практике селекционных и семеноводческих работ очень часто возникает необходимость в анализе семян на зараженность пыльной головней. Для ускоренной оценки на устойчивость к пыльной головне исходного и селекционного материала и проверки на зараженность

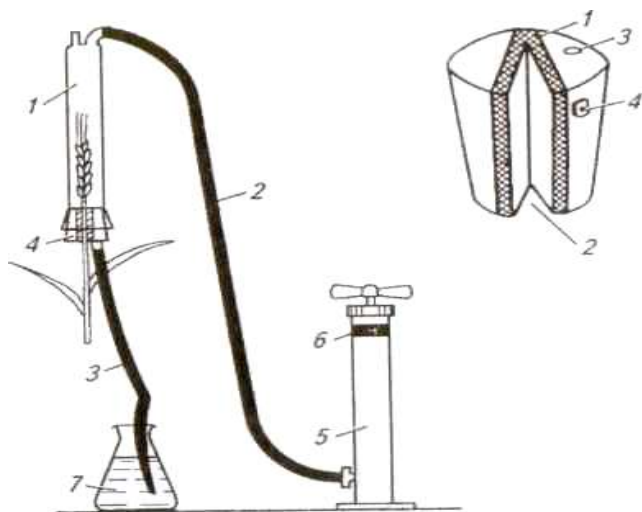


Рис. 4. Вакуум-прибор для инокуляции пшеницы и ячменя возбудителем пыльной головни (конструкция В.И. Кривченко): *слева* – общая схема устройства прибора: 1 – цилиндр; 2 – шланг для откачивания воздуха; 3 – шланг для подачи суспензии спор; 4 – вакуумная зажимная пробка; 5 – откачивающий насос; 6 – резиновое кольцо; 7 – сосуд для суспензии спор; *справа* – вакуумная зажимная пробка: 1 – мелкопористый слой резины; 2 – разрез в мелкопористом слое; 3 – сквозное отверстие в пробке; 4 – упор.

семян используют лабораторный метод (В.И. Кривченко, 1961).

Анализ сводится к следующим этапам:

- отделение зародыша от эндосперма;
- окрашивание зародышей;
- просмотр зародышей под микроскопом.

Для отделения зародышей семян от эндосперма отбирают среднюю пробу – 1000 естественно зараженных зерен или 100–120 искусственно инокулированных, а затем кипятят (50–60 мин) их в 3%-ном растворе щелочи до полного отделения зародышей. Содержимое следует мешать стеклянной палочкой. На 1000 семян используют 800 мл 3%-ной щелочи, на 100–120 инфицированных семян – 250 мл. Для этих целей используют колбы объемом 1000 и 500 мл. Во время кипячения зародыши отделяются от эндосперма. После кипячения содержимое колбы выливают в набор лабораторных сит с отверстиями в диаметре 5, 3 и 1 мм и промывают проточной водой. На лабораторных ситах в струе воды происходит разделение составных частей семени. Более крупные по размеру части зерновки остаются в верхних решетках, зародыши осе-

дают на решетке с диаметром отверстий 1 мм. Отделенные зародыши переносят в колбу емкостью не менее 250 см³, заливают 15%-ным раствором щелочи (200 мл) и кипятят 40 мин, затем их тщательно промывают проточной водой на сите с диаметром отверстий 1 мм или на капроновой сетке. Переносят в сосуд емкостью 500–800 см³, заливают горячей водой (50–60 °С) и промывают 5–10 мин от следов щелочи в тканях.

Отмытые зародыши помещают в стеклянную колбу, заливают 0,1%-ным раствором анилинового синего красителя в кислоте и кипятят 10–20 с до появления в зародышах синей окраски. После кипячения зародыши переносят в другую стеклянную емкость, заливают молочной или уксусной кислотой и снова кипятят 20–30 с для удаления излишка красителя.

Затем просматривают зародыши под микроскопом. Для этого на предметное стекло в каплю остуженной кислоты помещают по 10 зародышей и просматривают без покрытия покровными стеклами при малом увеличении микроскопа (или под бинокляром). На желтом или слабо-голубом фоне тканей зародыша отчетливо видна темно-синяя грибница возбудителя пыльной головни. Зародыши просматривают с лицевой стороны, т. е. со стороны зародышевой почки, корешков и колеоптиле. Если зародыши оказались уложенными тыльной стороной и в щитке обнаруживается грибница возбудителя, их необходимо перевернуть. Грибница головни при малом увеличении микроскопа представляет собой комочки спутанных нитей в щитке или вытянутые, сильно извитые гифы в зародышевой почке и корешках. По поражению зародышевых почек и щитка определяют поражение партии семян.

Пораженность семян устанавливают путем подсчета числа инфицированных зародышей и глубины инфекционного процесса по следующей шкале:

- 0 – мицелий отсутствует во всех частях зародыша;
- 1 – зародышевые почки свободны от инфекции, поражение щитка до 20 и 50 % соответственно у яровых и озимых сортов;
- 2 – заражение зародышевых почек до 20 % и щитков до 100 %;
- 3 – заражение зародышевых почек до 40 %;
- 4 – заражение зародышевых почек больше 40 %.

Подсчитайте и оформите результат в табл. 22.

Таблица 22. Поражение зародышей зерна пыльной головней

Сорт, сортообразец	Пораженность зародышей по баллам					Всего
	0	1	2	3	4	

Задание 3. Провести искусственное заражение клубней картофеля

патогеном черной ножки в лабораторных условиях.

Цель задания: провести искусственное заражение клубней картофеля и дать лабораторную оценку сортам картофеля по устойчивости к черной ножке.

Материал и оборудование: клубни по 10 шт. каждого сорта; пипетки; 1–2-суточная культура патогенного штамма; эксикаторы; фильтровальная бумага; линейки.

Черная ножка поражает стебли, клубни и корни картофеля. При позднем появлении клубни поражаются внутри черной гнилью, которая всегда начинается в столонной части клубня. Патогены могут находиться в клубнях и в скрытой (латентной) форме. Вредоносность черной ножки картофеля в значительной мере связана с отсутствием устойчивости к ней у большинства районированных сортов и целенаправленной селекции на этот признак.

Учеными Белорусского НИИ картофелеводства разработан метод искусственного заражения целых клубней. Для этого необходимо отобрать клубни без признаков повреждений, хорошо промыть в воде и простерилизовать их путем поверхностного обтирания 96-градусным спиртом и обжиги на спиртовке. Патогенную культуру возбудителя выращивают 1–2 суток на картофельном агаре. Для лабораторных занятий дают готовую культуру. Бактериальную суспензию получают смывом бактерий со скошенного агара и последующим разведением в 500 мл стерильной воды (инфекционная нагрузка 10 млн. бактериальных клеток в 1 мл стерильной дистиллированной воды).

Подготовленные таким образом клубни картофеля механически повреждаются специальным устройством (штампом) на глубину 10 мм в пуповинной части, а затем в полученное углубление пипеткой вводится 0,3 мл бактериальной суспензии. В контрольный образец с механическим повреждением вводится стерильная вода. Зараженные клубни укладываются в выстланные увлажненной фильтровальной бумагой эксикаторы или специальные ящики, укрываются крышкой или стеклом и выдерживаются 8–10 дней при температуре 25–26 °С.

Затем клубни разрезают вдоль, измеряют глубину и ширину зоны загнивания. На основании этого рассчитывается индекс поражения по формуле

$$x = \frac{d \cdot h}{100},$$

где x – индекс поражения;

d – диаметр зоны загнивания, мм;

h – глубина зоны загнивания, мм.

В зависимости от индекса поражения устанавливается балл поражения и группа поражаемости клубней сортов картофеля по следую-

щей шкале.

**Характеристика поражаемости сортов картофеля черной ножкой
в зависимости от индекса поражения**

Балл поражения	Характеристика заражения	Индекс поражения	Группа поражаемости
0	Отсутствует	0	Абсолютно устойчивые
1	Очень слабое	До 2,0	Высокоустойчивые
2	Слабое	2,1–3,0	Относительно устойчивые
3	Среднее	3,1–5,0	Среднеустойчивые
4	Сильное	5,1–7,0	Восприимчивые
5	Очень сильное	Более 7,0	Сильно восприимчивые

Результаты анализа оформите в табл. 23.

Таблица 23. Устойчивость сортов картофеля к черной ножке

Сорт	Количество клубней, балл						Средний балл	Устойчивость
	0	1	2	3	4	5		

Примечание. Средний балл поражения находят по средней арифметической взвешенной.

Для этого с помощью сверл (трубок) и прибора (шприца-бура) вырезают из клубней цилиндры диаметром 15 мм, которые разрезают на диски толщиной 10 мм.

Для инокуляции берут от каждого сортообразца по 40 кусочков. Заражение ломтиков проводят уколом препаровальной иглы, предварительно погруженной на 5 мм в суспензию односуточной культуры, плотностью $0,5 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл на глубину 2–3 мм. Контрольные кусочки накалываются иглой, смоченной в стерильной воде. Степень поражения сорта определяется через сутки (температура 25 °С) путем измерения площади загнившей зоны на поверхности каждого диска и вычисления средней площади поражения образца. Сорта по устойчивости распределяют на пять групп:

0 баллов – абсолютно устойчивые (загнивание инфекционных кусочков отсутствует);

1 балл – повышено устойчивые (площадь загнившей зоны до 10 мм²);

2 балла – относительно устойчивые (от 10,1 до 15 мм²);

3 балла – среднеустойчивые (от 15,1 до 25 мм²);

4 балла – неустойчивые (свыше 25 мм²).

Сорт считают сравнительно устойчивым при балловой оценке, рав-

ной 0–2.

В качестве стандарта необходимо обязательно использовать сорта картофеля, обладающие заведомо известной устойчивостью или неустойчивостью к патогену.

При оценке селекционного материала или сортов картофеля этим методом результаты заносят в табл. 24.

Таблица 24. Устойчивость селекционного материала картофеля к черной ножке

Сортообразец	Площадь загнившей зоны, мм ²	Характер устойчивости

Задание 4. Определить зараженность семян озимой ржи возбудителем фузариозной снежной плесени.

Цель задания: установить влияние семенной инфекции возбудителя фузариозной снежной плесени на зараженность всходов озимой ржи.

Материал и оборудование: семена сортов и сортообразцов озимой ржи, выращенные на инфекционном фоне, или с сильно пораженных участков; растильни; шпатели; песок; термостат-холодильник; пинцеты; микроскопы и принадлежности для микроскопирования.

Снежную плесень вызывает комплекс грибов. Наиболее распространенный среди них возбудитель – *Fusarium nivale*.

При поражении фузариозной плесенью на листьях и побегах озимой ржи и пшеницы образуются розовые пятна. Пораженные листья и целые растения склеиваются бело-розовым мицелием гриба. Если растения ржи заболели с осени, то они погибают, при позднем поражении – отравляются. Переболевшие растения медленнее отрастают, вегетация их затягивается, наблюдается снижение урожая. Возбудитель может зимовать в форме мицелия и конидий в почве, на пораженных растительных остатках и семенах.

В Финляндии разработан метод определения заразного начала в семенах. Для этого прокаливается песок, затем он увлажняется кипяченой водой до 60 % от полной влагоемкости. Ящики или растильни засыпают вначале песком на высоту 2 см, разравнивают и слегка утрамбовывают. Затем высевают семена изучаемого образца по 50 шт. в четырехкратной повторности. Расстояние между семенами должно быть не менее 1 см. Затем семена засыпают песком так, чтобы глубина заделки их была 2 см. Вначале для сохранения влаги в песке ящики покрывают пленкой. Когда появятся всходы, пленку снимают. После появления на всходах 2–3 листочков их помещают в темную камеру (термостат-холодильник) и выдерживают 4 дня при температуре 5–7 °С. В этих условиях болезнь проявляется в виде белого паутинного налета, который со временем сереет и нередко приобретает розовый оттенок,

особенно у основания стебля.

Для уточнения заболевания пользуются микроскопическим методом. Под микроскопом видна бесцветная грибница с тонкими гифами. На грибнице формируются спороношии-споророгии, а в них – бесцветные серповидные конидии. Могут образовываться и другие формы споророгии: хламидоспоры, микроконидии.

Зарисуйте споророгию патогена. Подсчитайте количество пораженных всходов, если заболевание распространилось на листьях. Интенсивность поражения учитывают по следующей четырехбалльной шкале.

Балл	Поражено листьев на растении, %
0	Отсутствие признаков болезни
1	До 10
2	До 30
3	До 70
4	Все листья и побеги поражены, растения погибли

Процент развития болезни (R) вычисляют по следующей формуле:

$$R = \frac{\sum(a \cdot b)}{K \cdot N} \cdot 100,$$

где R – развитие болезни, %;

a – число больных растений соответствующего балла поражения;

b – балл поражения;

K – высший балл шкалы учета;

N – общее количество учтенных растений (больных и здоровых).

Результаты анализа оформите в табл. 25.

Таблица 25. Устойчивость сортов и сортов образцов озимых культур к снежной плесени

Сорт, сортобразец	Количество пораженных растений, балл					Всего учтенных растений	Устойчивость
	0	1	2	3	4		

Для оценки устойчивости используют шкалу, составленную с учетом развития болезни.

Развитие болезни, %

До 25

26–45

46–65

65–85

85–100

Устойчивость сорта

Высокоустойчив

Устойчив

Среднеустойчив

Восприимчив

Высоковосприимчив

Задание 5. Определить зараженность семян ячменя возбудителем сетчатой пятнистости (*Helminthosporium teres* Sacc.).

Цель задания: определить зараженность семян селекционного материала ячменя.

Материал и оборудование: семена сортов и сортообразцов ячменя; растильни; микроскопы и принадлежности для микроскопирования; пинцеты; чашки Петри; бумага для этикеток.

Первые симптомы болезни наблюдаются в период появления третьего листа, а сильное развитие ее – во время цветения и налива зерна. На листьях появляются овальные бурые пятна с бледно-желтым ободком и сетчатым рисунком из продольных и поперечных полосок. На пятнах образуется конидиальный налет. Возбудитель сетчатой пятнистости может зимовать в форме конидий, мицелия на зерне и пораженных остатках. Чем выше зараженность листового аппарата, тем большая возможность заражения семян. Семена анализируют путем их проращивания во влажной камере на свету. Для анализа используют четыре пробы семян по 100 шт. каждая. Семена предварительно замачивают (одну пробу образца в одной чашке Петри) в течение 3 ч.

Обертывают керамические плитки фильтровальной бумагой, помещают их в растильни и наливают воду, следя за тем, чтобы вода не затопила ячейки. Раскладывают семена в ячейки, помещают или наклеивают этикетку с названием сортообразца. Во время инкубации воду подливают, не допуская подсыхания бумаги и семян. Первые 48 ч проводят инкубацию при освещении лампами дневного света ЛД-40 и ЛБ-40 при температуре 22–25 °С. Для меньшего испарения воды растильни закрывают стеклами. Последующую инкубацию в течение суток проводят в темноте в закрытых растильнях при температуре 12–16 °С.

Просмотр семян проводят на четвертые сутки со дня закладки во влажную камеру. Каждое зерно просматривают под микроскопом типа МБС-2. Около зараженных семян делают отметку на бумаге цветным карандашом, а затем подсчитывают число отметок.

Сухие больные зерновки внешне практически не отличаются от здоровых. Гриб образует спороношение на зерновках во влажной камере непосредственно на свету (солнечный свет или лампы дневного освещения) как в растильнях, покрытых стеклом, так и без них. Конидиеносцы на зерновках чаще одиночные размером 88–189 × 8–10,5 мкм, с 4–9 перегородками.

Конидии цилиндрические, количество перегородок от 2 до 8, в начале бесцветные, в зрелом состоянии зеленовато-буроватые или желтоватые, размером 46–134 × 12,6–21 мкм.

Оценка зараженности семян сетчатой пятнистостью проводится по формуле

$$X = \frac{N_1}{N} \cdot 100,$$

где X – зараженность сетчатой пятнистостью, %;

N – всего зерновок в анализе;

N_1 – количество зерновок, зараженных сетчатой пятнистостью.

Если имеются данные по зараженности листьев сетчатой пятнистостью, можно провести корреляционный анализ между зараженностью растений в полевых условиях и зараженностью семян. Результаты анализа оформите в табл. 26.

Таблица 26. Зараженность семян селекционного материала ячменя возбудителем сетчатой пятнистости и взаимосвязь между пораженностью семян и листьев

Сорт, сортобразец	Зараженность семян по пробам, %					Пораженность листьев, %	Коэффициент корреляции
	1	2	3	4	Всего		

Задание 6. Провести инокуляцию корнеплодов свеклы и моркови возбудителями гнилей при их хранении.

Цель задания: изучить методы искусственного заражения корнеплодов, пригодные для оценки устойчивости к возбудителям гнилей.

Материал и оборудование: чашки Петри; мезга моркови и свеклы, простерилизованная в автоклаве; чистые культуры возбудителей серой и белой гнили; препаровальные иглы; петли для посева чистой культуры на питательные среды; сорта и сортобразцы корнеплодов свеклы и моркови.

Для оценки устойчивости корнеплодов моркови и свеклы к гнилям используют искусственное их заражение в лабораторных условиях. Для этого готовят за 2–3 дня до занятия мезгу из моркови и свеклы, предварительно отваренных, обычно путем раздробления корнеплода на терке. Эту мезгу помещают в чашки Петри и стерилизуют в автоклаве (питательная среда). Мезга должна занимать не более $\frac{1}{2}$ высоты нижней крышки. Разравнивают поверхность мезги шпателем и помещают чашки в автоклав для стерилизации при температуре 110–115 °С на 20 мин. Заранее приготавливают чистую культуру *Botritis cinerea* (возбудителя серой гнили) и *Sclerotinia*.

Посев возбудителя серой гнили осуществляют на питательную свекловичную среду спорами. При заражении возбудителем белой гнили можно на питательную среду класть кусочки мицелия. Чашки Петри с инфицированной питательной средой выдерживают в термостате 2–3 дня при температуре 20–24 °С.

Тщательно моют корнеплоды. Делают вырезки совковым ножом на границе между головкой и шейкой корнеплода. Вырезки и пинцеты подвергают стерилизации методом фламбирования, т.е. пропускают над пламенем горелки.

На созданный инфекционный фон в чашках Петри раскладывают пинцетом кусочки корнеплодов. Чашки Петри на верхней стороне этикетировывают, указывают название образца, повторность, возбудителя, дату заражения. Чашки Петри помещают в термостат и выдерживают 3–4 дня при температуре 20 °С. Затем дают оценку степени поражаемости всех вырезок, используя следующую шкалу.

Балл	Пораженная часть вырезки
0	Нет
1	¼ (25 %)
2	½ (50 %)
3	¾ (75 %)
4	100 %

Результаты анализа записывают в табл. 27.

Таблица 27. Устойчивость корнеплодов свеклы и моркови к возбудителям гнилей при хранении

Сорт, сортообразец	Номер-корнеплода	Повторность										Средняя пораженность, %
		I					II					
		Пораженность вырезок по баллам										
0	1	2	3	4	0	1	2	3	4			

4.3. Искусственное заражение вегетирующих растений

Для заражения вегетативных органов растений используются в качестве инфекционного материала споры, выращенные в культуре, сухие споры, суспензии, экстракты и гомогенаты. В зависимости от вида заболевания и растения инокулюм наносят на растение путем опыливания, опрыскивания или натирания. Опыливание сухими спорами проводят на увлажненные листья. Суспензии готовят из культуры, выращенной на соответствующей питательной среде, чаще путем смыва.

Используют для подготовки суспензии настоек из пораженных листьев и других частей растений с признаками спороношения патогена. После обработки инокулированные растения для лучшего заражения помещают во влажные камеры.

Заражение вирусами, которые передаются контактно, проводят с помощью натирания листьев, предварительно опыленных карборундом, экстрактами, соком из больных растений. При инфицировании неконтактовыми вирусами используют их переносчиков (тли, цикады, нематоды, клещи) и прививки частей больных растений.

Задание 1. Провести заражение сортообразцов пшеницы бурой ржавчиной (*Puccinia recondita* Roberg. Desm.).

Цель задания: провести заражение пшеницы бурой ржавчиной (*Puccinia recondita* Roberg. Desm.).

Материал и оборудование: микроскопы и принадлежности для микроскопирования; ампулы с урединиоспорами; растения сортообразцов, выращенные в вегетационных сосудах до появления второго листа; тальк; приспособления для создания влажной камеры; пульверизатор.

Урединиоспоры многих видов ржавчины собирают с районированных сортов металлическими циклонами, смонтированными с пылесосом. Затем урединиоспоры очищают от механических примесей, просушивают, запаивают в стеклянные ампулы и хранят при температуре 3–5 °С. Хранятся урединиоспоры недолго. Их жизнедеятельность падает после полугода до 40 %. Накопление урединиоспор для заражения осуществляют также в теплицах на сильнопоражаемом сорте. Инфекционным материалом могут служить зараженные листья и стебли, которые хранят при температуре 3–5 °С и относительной влажности 40 %.

Перед заражением необходимо провести определение жизнеспособности урединиоспор. Для этого урединиоспоры за сутки до проведения инокуляции помещают в капли воды на предметные стекла, которые ставят во влажную камеру (чашки Петри) и выдерживают 20–24 часа при температуре 18–23 °С. К жизнеспособным относят споры, образовавшие гифы, длина которых превышает диаметр спор. Вычисляют процент проросших спор. Показатель жизнеспособности спор учитывается в определении нагрузки инокулюма. Используют для инокуляции растения, высеченные в вегетационные сосуды или ящики, в период появления второго листа. Готовят суспензию урединиоспор в 0,1%-ном растворе водного агара из расчета 40–50 спор в капле. Снимают восковой налет с листьев (пропуская каждый лист между двумя влажными пальцами). Увлажняют почву и листья водой. Затем наносят с помощью пульверизатора суспензию тонким распылом. Зараженные (инокулированные) растения помещают на 24 часа во влажную камеру.

Влажная камера – это каркас из деревянных планок, обтянутых полиэтиленовой пленкой. Одну из стенок камеры покрывают влажной фильтровальной бумагой. Основание камеры плотно притирают к почве. Температура в помещении должна быть 15–18 °С. Создают интенсивное освещение (5–7 тыс. люксов) с помощью ламп. Поддерживают высокую влажность и температуру :21–23 °С днем и не ниже 18,5 °С ночью.

После появления урединиоспор приступают к анализу результатов заражения.

Для определения устойчивости сортообразцов пшеницы к бурой ржавчине используйте комбинированную шкалу, предложенную Т. Д. Страховым (рис. 5).

Титы иммунитета

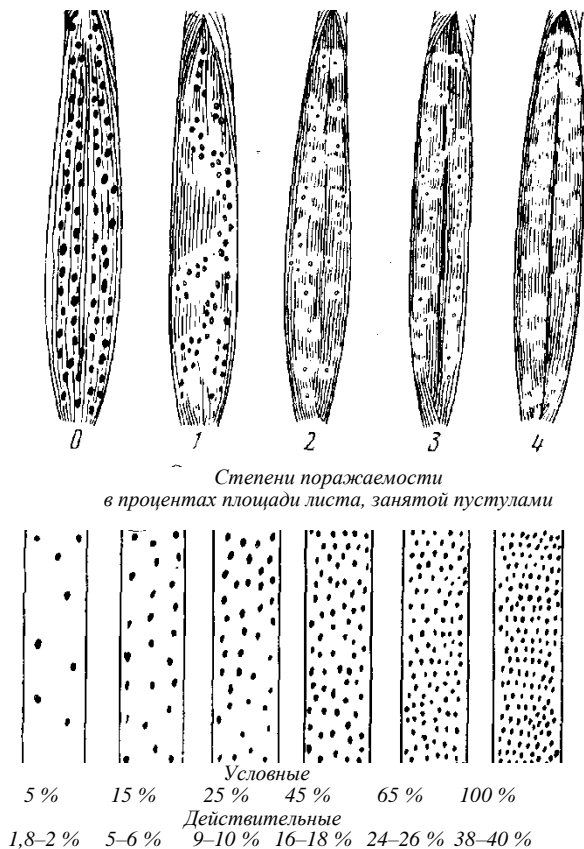


Рис. 5. Комбинированная шкала Т.Д. Страхова.

Она состоит из двух частей: шкалы для определения типов иммунности (рисунки пораженных листьев сверху) и шкалы для учета степени поражаемости (схематическое изображение листьев снизу). Шкалу иммунности широко используют при селекционной работе с пшеницей. Эта шкала основана на качественных различиях, количественные различия учитываются по нижней шкале.

Даем описание шкалы иммунности. Лист, обозначенный цифрой 0, отражает полное отсутствие иммунитета к бурой ржавчине. Номером 1 обозначен лист, где пустул меньше, чем на первой листовой пластинке, они часто скапливаются группами. В местах скопления пустул имеются хлоротические зоны.

Шкала иммунитета (по Т.Д. Страхову)

Тип им-мун-ности	Признаки, характеризующие цифровые показатели иммунитета
0	Отсутствие признаков иммунитета. Пустулы ржавчины крупные, бархатистые, легко порошачиесь, хорошо раскрывающиеся при созревании. Эпидермис листа при созревании легко разрывается и обычно хорошо заметен по краям пустул в виде прозрачных пленок. Обесцвечивание ткани вокруг пустул обычно отсутствует. Восприимчивые сорта
1	Пустулы мельче, чем в предыдущем типе, нередко собраны группами. Большинство пустул обычно вскрывается, а часть пустул не в состоянии прорвать эпидермис. В местах скопления пустул ткань листа обесцвечивается (хлоротические зоны в местах скопления пустул). Сорта ниже средней устойчивости
2	Пустулы мелкие, рассеянные по поверхности листа. Некоторые пустулы вскрываются, большинство же не могут прорвать эпидермис. Вокруг пустул хорошо заметны обычно округлые зоны обесцвеченной ткани листа. Сорта средней устойчивости
3	Пустулы очень мелкие, рассеянные по поверхности листа (как в предыдущем типе), но они, как правило, не вскрываются и урединиоспоры в них часто недоразвиты. Наряду с недоразвитыми пустулами, скрытыми в ткани листа, имеются разной формы и величины светлые пятна (места внедрения гриба). Вокруг недоразвитых пустул в местах заражения хорошо видны зоны светлой и светло-желтой ткани листа (некрозы). Устойчивые сорта
4	Полное отсутствие пустул гриба. Места заражения обнаруживаются лишь по мелким обесцвеченным участкам листа (мелкая точечность, хлорозы и некрозы). Высший тип иммунитета. При этом типе иммунитета некрозы могут вовсе отсутствовать. Высокоустойчивые (иммунные) сорта

На листовых пластинках под номерами 2, 3 показаны различные градации иммунитета. Высшая степень иммунитета обозначена цифрой 4. Внешне это проявляется в виде мелких светлых пятен или некрозов, рассеянных по листовой пластинке.

Для учета измененной сортовой иммунитета при селекционной работе пользуются шкалой Т.Д. Страхова.

Расчет ведется по формуле

$$R = \frac{\sum(a \cdot b)}{n},$$

где R – степень пораженности;

a – балл поражения (или %);

b – число больных листьев с соответствующей степенью поражения;

n – всего листьев.

Результаты заносят в табл. 28.

Таблица 28. Устойчивость сортообразцов пшеницы к бурой ржавчине

Сортообразец	Количество анализируемых листьев	В том числе листьев										Характеристика образца		
		по баллам иммунности					по степени пораженности, %							
		0	1	2	3	4	5	15	25	45	65		100	

Расчет среднего балла иммунности и степени пораженности проводится следующим образом: в числителе каждый балл иммунности умножают на соответствующее количество растений, суммируют и делят на знаменатель – общее число растений в образце. Аналогично вычисляется средняя степень пораженности изучаемого образца.

Пример. В результате анализа получены следующие результаты по баллам иммунности: 0 – 0 растений; 1 – 10; 2 – 20; 3 – 20; 4 – 50 растений; по степени пораженности: 5 – 60 растений; 15 – 20; 25 – 10; 45 – 10; 65 – 0; 100 – 0. Средний балл иммунности составит:

$$\frac{(0 \cdot 0) + (1 \cdot 10) + (2 \cdot 20) + (3 \cdot 20) + (4 \cdot 50)}{100} = 3,1.$$

Средняя степень пораженности:

$$\frac{(5 \cdot 60) + (15 \cdot 20) + (25 \cdot 10) + (45 \cdot 10) + (65 \cdot 0) + (100 \cdot 0)}{100} = 3,1.$$

Характеристика сортообразца – $\frac{3,1}{13}$

Задание 2. Провести искусственное заражение листьев ячменя или пшеницы возбудителем мучнистой росы.

Цель задания: определить устойчивость сортообразцов пшеницы или ячменя к мучнистой росе при искусственном заражении в лаборатории.

Материал и оборудование: микроскопы и принадлежности для микроскопирования; пораженные листья мучнистой росой с хорошо выраженными точками (клейстотециями); всходы ячменя или пшеницы.

Для заражения растений используют свежесобранный материал (пораженные листья) с хорошо выраженными точками (клейстотециями) или конидиальным налетом. Листья до заражения хранят при температуре 1–3 °С.

Перед заражением листья с плодовыми телами помещают в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и выдерживают их 2–3 дня при температуре 18–20 °С для дозревания спор.

Перед подготовкой суспензии под микроскопом просмотрите плодовые тела и содержащиеся в них сумки и сумкоспоры. Если заражение проводится при помощи конидий, следует ознакомиться с ними

под микроскопом. Затем готовят суспензию спор. Инфекционная нагрузка для заражения мучнистой росой должна составлять 55 тыс. конидий или спор в 1 мл.

Для оценки устойчивости используют шкалу (рис. 6).

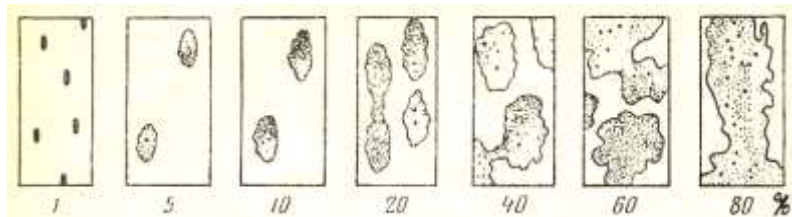


Рис. 6. Шкала учета поражения мучнистой росой.

Ниже приводим описание типов устойчивости к мучнистой росе.

Шкала типов реакций к мучнистой росе

Обозначение устойчивости, балл	Характеристика реакций
0	Высокая устойчивость. На листе нет никаких признаков гриба
1	Растение очень устойчиво. На листе небольшое количество некротических пятен
1,5	Субинфекция, т. е. следы поражения. Одиночные, вскоре исчезающие конидиеносцы
2	Умеренная устойчивость. Слабое развитие гриба
3	Умеренная восприимчивость. Заметное развитие гриба
4	Растение очень восприимчиво. Сильное развитие гриба

Перед заражением необходимо снять восковой налет, пропуская листья всходов между пальцами. Всходы опрыскивают суспензией, прикрывают ящики стеклом или пленкой и оставляют в комнате при температуре 20 °С. Ежедневно в течение 16 ч поддерживают освещение в 13–14 тыс. люксов.

Результаты учета оформляют в табл. 29.

Таблица 29. Устойчивость зерновых к мучнистой росе

Сортообразец	Интенсивность поражения листьев, %							Среднее	Тип реакции
	1	5	10	20	40	60	80		

4.4. Инфицирование почвы

Инфицирование растений через почву применяют главным образом к обитающим в почве возбудителям болезней и патогенам, способным длительное время сохраняться в ней в жизнеспособном состоянии. Инфекционное начало вносят в почву или постепенно накапливают в ней посредством возделывания на одном и том же месте восприимчивого сорта. Обязательное условие при внесении инокулюма или пораженных остатков – тщательное и равномерное распределение их в почве.

Задание 1. Приготовить инфекционный материал для изучения устойчивости образцов люпина к фузариозному увяданию.

Цель задания: приобрести навыки приготовления инфекционного материала в лабораторных условиях для создания искусственного инфекционного фона в полевых условиях и оценки устойчивости селекционного материала люпина к возбудителю фузариозного увядания.

Материал и оборудование: чистые культуры возбудителя фузариозного увядания *Fusarium oxysporum* f. *lupine* на суловом агаре; семена люпина; ящики; почва; микроскопы и принадлежности для микроскопирования; семена овса для создания инфекционного материала.

Для испытания люпина на устойчивость к фузариозному увяданию могут быть применены различные методы искусственного заражения растений. Наиболее простым является метод заражения через почву. Он основан на искусственном внесении в почву размноженного на питательной среде гриба и затем естественном инфицировании растений.

Питательную среду готовят следующим образом. В посуду (колбы, банки, бутылки и др.) насыпают отмытые или очищенные семена овса, заливают водой (на один объем зерен овса 1,5 объема воды), закрывают ватными пробками и оставляют на 6–8 ч для замачивания. Затем полчаса стерилизуют в автоклаве текучим паром, потом давление доводят до 2 атм. Через сутки стерилизуют повторно. После охлаждения в стерильных условиях в каждую колбу с овсом переносят гриб из пробирок. Для этого в пробирку до половины наливают стерильную воду, стерильной палочкой смывают мицелий и споры гриба, взбалтывают и выливают в посуду с овсом из расчета на 1 кг питательного субстрата содержимое одной пробирки. Колбу с инфицированным зерном встряхивают и помещают в термостат, где выдерживают 12 суток. Это и есть инфекционный материал. Для придания сыпучести его смешивают с торфокрошкой в соотношении 1:3, высыпают в ящики, выстланные полиэтиленовой пленкой и выдерживают при температуре 22–24 °С 10–12 дней. Инфекционный материал, смешанный с торфокрошкой, пригоден для внесения в почву в поле или в вегетационные сосуды.

Норма внесения инфекционного материала в пересчете на 1 га без учета торфокрошки составляет 500 кг, при внесении в маркерные бо-

розды – 20–25 г на погонный метр. Эти расчеты можно использовать для создания инфекционного фона в ящиках или вегетационных сосудах.

На лабораторных занятиях необходимо провести заражение почвы и учеты в два этапа следующими способами.

1. Высев семян в относительно свободную от инфекции почву (взятую с посевов озимых зерновых).

Высевают по 15 шт. семян каждого сортаобразца. Заражение почвы осуществляют путем двух-, трехкратного полива пробирочной культурой гриба.

2. Высев семян в относительно свободную почву, в бороздки которой помещается инфекционный материал (20–25 г на погонный метр).

В фазе полных всходов проводят учет количества взошедших растений, а в последующие фазы развития растений – учет увядших растений. При каждом учете растения с явными признаками фузариозного увядания удаляют. В конце вегетации по каждому образцу определяется распространенность болезни – отношение количества больных растений к числу взошедших, выраженное в процентах.

Вычисление ведут по формуле

$$P = \frac{n}{N} \cdot 100,$$

где, P – распространенность болезни, %;

n – количество больных растений;

N – общее число обследованных растений (число в пробе).

Для классификации устойчивости воспользуйтесь следующей шкалой.

Балл устойчивости	Распространенность болезни, %	Степень устойчивости
9	До 2,5	Очень высокая
7	2,6–10,0	Высокая
5	10,1–25,0	Средняя
3	25,1–50,0	Низкая
1	> 50	Очень низкая

Задание 2. Создать инфекционный фон к гельминтоспориозной или фузариозной корневой гнили для оценки всходов селекционного материала яровой пшеницы или ячменя.

Цель задания: создать инфекционный фон для оценки резистентности (устойчивости) сортаобразцов яровой пшеницы или ячменя к гельминтоспориозной или фузариозной корневой гнили.

Материал и оборудование: микроскопы и принадлежности для микроскопирования; культура возбудителя гельминтоспориозной корневой гнили (*Helminthosporium sativum* P. K. et B.), размноженная в

колбах на смеси зерен пшеницы и ячменя (1:1), или культура возбудителя фузариозной корневой гнили (*Fusarium culmorum* Sacc.), размноженная на стерильных зернах овса; растильни или ящики, заполненные стерильным кварцевым песком; пинцеты; шпатели; семена сортообразцов яровой пшеницы или ячменя.

Из пораженных растений выделяют в чистую культуру возбудителя и выращивают патогена, используя для этого среду Чапека или сусло-агар.

Затем патоген размножают на различных питательных субстратах. Для этого наиболее часто используют смесь зерен ячменя и пшеницы (1:1), при этом можно добавлять солому. В колбу вместимостью 250 мл помещают 40–50 г зерен, 10–20 г измельченной соломы и 50–70 мл воды. Указанную среду стерилизуют в течение часа при 1 атм. в автоклаве. После охлаждения среду засевают пробирочной культурой гриба *Helminthosporium*. Для фузариоза все это проделывают на зернах овса.

Колбы помещают в термостат и инкубируют 18–20 дней при температуре 24–26 °С. Полученный инфекционный материал (инокулюм) может быть использован в свежем виде или его подсушивают, ссыпают в бумажные мешки и хранят в холодильнике до использования.

Для лабораторных занятий инфекционный материал может быть уже готовым.

Вначале необходимо промикроскопировать инокулюм. Для этого стерильной иглой берут из колбы немного налета и рассматривают при малом и большом увеличении микроскопа. Патоген *Helminthosporium sativum* имеет довольно крупные, до 30×134 мкм, темно-оливковые конидии с 2–13 поперечными перегородками. Они развиваются на концах темно-коричневых угловатых конидиеносцев. У фузариоза макроконидии веретеновидные или серповидные с 3–5 перегородками, микроконидии одноклеточные (рис. 7).

Затем отвешивают по 50 г инфекционного материала и вносят его в ящики или растильни со стерильным песком или почвой. Смесь тщательно перемешивают. В каждую растильню на полную глубину (4 см) высевают по 100 семян. Каждый образец высеивается в четырехкратной повторности. В качестве контроля принимают посев в песок или почву без инокулюма. Опыт этикетировать, указывают номер варианта, название сорта или сортообразца, дату посева и фамилию исполнителя. Растильни помещают в термостат при температуре 20–22 °С.

В фазе трех листьев растения анализируют на пораженность корневой гнилью по следующей шкале:

0 – здоровые, непораженные проростки;



Рис. 7. Признаки поражения проростков корневой гнилью:
вверху – гельминтоспориозная гниль, *внизу* – фузариозная корневая гниль

1 – слабое побурение основания стебельков и корней, на зерновках налет, проростки без видимых изменений;

2 – у основания зародышевых корешков побурение не более $\frac{1}{4}$ их длины, возможно побурение coleoptиле, стебельков и первых пластинок. Проростки развиваются нормально;

3 – побурение более $\frac{1}{4}$ длины зародышевых корешков, проростки

отстают в росте;

4 – семена не всходят, проростки сильно отстают в росте, деформированы.

Для каждого образца подсчитывают распространенность (P) и развитие болезни (R).

$$P = \frac{n}{N} \cdot 100,$$

где P – распространенность болезни, %;

n – количество больных растений;

N – число растений, входящих в пробу.

$$R = \frac{\sum(a \cdot b)}{K \cdot N} \cdot 100,$$

где R – развитие болезни, %;

a – число больных растений соответствующего балла поражения;

b – балл поражения;

K – высший балл шкалы учета;

N – количество учтенных растений (больных и здоровых).

Результаты учета оформляют в табл. 30.

Таблица 30. Пораженность всходов гельминтоспориозной корневой гнилью

Сорт, сортообразец	Фон	Всего учтенных растений	В том числе		Процент поражения	Развитие болезни, %
			здоровых	больных		
	Контроль					
	Инфекционный					

4.5. Методы создания инвазийных фонов

Проявление иммунитета у растений к вредителям изучено в меньшей степени, чем к патогенам. По современным представлениям многообразные проявления иммунитета у растений к вредителям подразделяют на следующие основные типы.

Антиксеноз (непредпочтение, избирательность) – это форма устойчивости, которая определяется признаками, способствующими или противодействующими использованию данного вида, сорта, растения для откладки яиц и в качестве пищи.

Антибиоз (истинная устойчивость) – это способность растений препятствовать, подавлять и прекращать развитие вредителей. Проявляется в повышении смертности насекомых, расстройствах пищеварения, снижении активности питания и вредоносности, удлинении сроков развития, формировании мелких и недоразвитых особей, пониже-

нии плодовитости самок, нарушении развития особей полов.

Выносливость (толерантность) – это свойство вида, сорта после повреждения вредителем восстанавливать нарушенные функции и органы и продолжать рост и развитие без существенного снижения урожая. Степень проявления устойчивости зависит от различных факторов внешней среды.

Ложная устойчивость (псевдоустойчивость) – это наличие временного разрыва между периодом наибольшей вредоносности вредителя и наиболее уязвимыми фазами растения, т. е. растение проходит эти фазы раньше, чем численность вредителя достигнет максимального значения.

Для проведения оценки устойчивости к вредителям необходимо обеспечивать высокую численность вредителя в полевых условиях. При возможности создают инвазийный материал, которым заражают испытываемые растения.

Задание 1. Выделить инвазийный материал для оценки устойчивости сортов картофеля к стеблевой нематоды (дитиленхоз).

Цель задания: освоить метод выделения стеблевой нематоды из пораженных клубней картофеля для создания инвазийного фона и оценки селекционного материала на устойчивость.

Материал и оборудование: заселенные стеблевой нематодой клубни картофеля; воронки диаметром 10–15 см; резиновые трубки; зажимы Мора; штативы Бунзена; скальпели; 2%-ный раствор метиленовой сини; фильтровальная бумага; пробирки; чашки Петри; микроскопы и принадлежности для микроскопирования.

В пораженных клубнях картофеля могут присутствовать паразитические нематоды и непаразитические – сапробиониты. Чтобы определить наличие паразитических нематод, используют метод окраски их метиленовой синью. Фитонематоды (паразиты) имеют наименьшую среди других нематод проницаемость наружных покровов, поэтому краска не проникает внутрь их тела. Сапробиониты окрашиваются в синий цвет. Выполняется работа следующим образом. На штативах укрепляют воронки, на которые надевают резиновые трубки. Зажимают трубки зажимами Мора. С клубней срезается мякоть до сосудистого кольца и измельчается. Берется навеска измельченного картофеля весом 10–15 г. Ее помещают на каркас из металлической сетки, который вставляют в воронку и заливают чистой водой. Нематоды выходят из тканей в воду, опускаются вниз и концентрируются у зажима. Через 20–30 мин открывают зажим, сливают немного воды в пробирку. Из пробирки берут пипеткой каплю суспензии и просматривают под микроскопом. Микроскопические черви-нематоды паразиты и сапробиониты без окрашивания трудно различимы. Поэтому необходимо приготовить следующий препарат: смешать каплю суспензии с каплей 2%-ной

метиленовой сини. Через 15 мин подсчитайте численность неокрасившихся нематод. Это фитонематоды, которые могут быть использованы для инвазийного фона. Полученной суспензией определенной концентрации можно заражать почву или посадочный материал и проверять селекционный материал картофеля на устойчивость к стеблевой нематоде.

Задание 2. Провести заражение сортов пшеницы злаковыми тлями.

Цель занятия: определить устойчивость различных сортов пшеницы к злаковой тле.

Материал и оборудование: растения пшеницы, выращенные в вегетационных сосудах; злаковая тля; пергаментные изоляторы.

Растения заселяют насекомыми и проводят наблюдение за развитием насекомых. Данная методика используется для установления устойчивости растений к вредителю, а также для установления передачи ими вирусных заболеваний.

На всходы различных сортообразцов пшеницы подсаживают злаковую тлю. Для этого тлю кисточкой из пробирки переносят из расчета по пять особей на одно растение.

Заселенные растения покрывают изоляторами. На следующем занятии через 24 часа учитывают число особей, сохранившихся после подсадки. Если на растении не сохранилось ни одной особи из числа подсаженных, это иммунные образцы.

Растения, на которых сохраняется исходное количество тлей или в результате размножения увеличивается, относят к восприимчивым. Окончательные результаты оценки выполняют через неделю. Результаты оформляют в рабочей тетради по форме табл. 31.

Таблица 31. Результаты заражения сортов пшеницы злаковой тлей

Сорт, сортообразец	Число особей, сохранившихся после подсадки		Характеристика устойчивости
	через сутки	через 7 дней	

Глава 5. ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ И ВРЕДИТЕЛЯМ

Наиболее рентабельным средством борьбы с болезнями и вредителями растений является выведение устойчивых сортов. Селекционный метод не приводит к загрязнению окружающей среды, что очень важно для Беларуси. Республика является зоной значительного увлажнения и радиационного заражения, поэтому применение химических средств защиты растений в больших объемах нежелательно.

Эффективность селекционных работ в получении сортов, устойчи-

вых к болезням и вредителям, зависит от степени изученности основных закономерностей, определяющих устойчивость растений. В процессе селекции важно проводить оценку исходного и селекционного материала на устойчивость к болезням и вредителям.

Следует выявлять виды, разновидности и сорта, обладающие не только иммунитетом, но и высокой толерантностью, которые, несмотря на относительно высокую пораженность болезнями и вредителями, формируют урожай, по количеству и качеству близкий к урожаю здоровых растений.

5.1. Методы учета пораженности и устойчивости селекционного материала к болезням

Устойчивость селекционного материала, сортов и гибридов к болезням чаще всего оценивают по следующим показателям:

- степени распространения;
- интенсивности развития;
- типу реакции растения на поражение (иммунности);
- потерям урожая;
- толерантности (выносливости).

Показатель распространенности обычно используется для болезней, которые вызывают гибель всего растения или продуктивных органов, ради которых мы его выращиваем (например, головня зерновых, фузариоз люпина, плодовая гниль яблок, черная ножка картофеля и др.). Процент распространенности будет отражать те потери урожая, которые причинила болезнь. Во всех случаях заболеваний такого типа учет ведут по проценту пораженных растений. Определяют путем подсчета больных растений и выражают в процентах к общему числу растений в пробе по формуле

$$P = \frac{n}{N} \cdot 100,$$

где P – распространенность болезни, %;

n – количество больных растений;

N – общее число обследованных растений.

Большинство заболеваний имеет местный тип поражения. Поражения проявляются в виде пятен, пустул, налетов, некрозов, занимая различную площадь пораженного органа. Такие заболевания имеют массовое распространение. Важно установить пораженную площадь растения, т. е. степень поражения растений, используя показатель интенсивности, или степени развития болезни. Чтобы стандартизировать результаты количественного учета, для многих болезней разработаны шкалы или эталоны. Поражаемость органов растений определяют по шкалам, где каждому баллу шкалы соответствует определенная сте-

пень поражения. Учет поражаемости при помощи шкал (эталонов) часто проводят на основе установления интенсивности поражения не всего растения, а отдельных его частей. Например, у растений много листьев и анализ всех требует больших затрат времени и труда, поэтому оценивают по среднему образцу, которым может быть второй или третий лист каждого учетного растения. Если для заболевания нет специальных шкал, то глазомерно определяют площадь, занятую пятнами, обозначают в процентах от всей площади, округляя до десяти, например, 20, 30, 40 % и т.д. Развитие болезни отражает усредненную интенсивность болезни одного растения, участка или территории.

Для определения средней интенсивности поражения больных растений пользуются формулой

$$C = \frac{\sum(ab)}{n},$$

где C – средняя интенсивность поражения больных растений, % или балл;

a – количество больных растений соответствующего балла или %;

b – балл или процент поражения;

n – число больных растений.

При переводе балловой шкалы в процентную формула развития болезни имеет следующий вид:

$$R = \frac{\sum(a \cdot b) \cdot 100}{k \cdot N},$$

где R – развитие болезни, %;

a – число пораженных растений соответствующего балла;

b – балл поражения;

N – общее количество учетных растений;

k – высший балл шкалы.

В селекционном процессе не всегда достаточно одного количественного учета. Допустим, на листовую поверхность различных сортов попадает одно и то же количество спор возбудителя ржавчины или пятнистостей. Они внедрились, и появилось одинаковое количество пятен или пустул. Однако они различаются по форме, величине и другим признакам. Следовательно, различные сорта реагируют на проникновение патогена по-разному. Так, клетки восприимчивого сорта нормально функционируют, пищи для патогена достаточно. В результате образуются крупные бархатистые пустулы, окруженные зеленой здоровой тканью, или пятна с обильным спороношением.

Если патоген попал в ткань устойчивого сорта, там могут образоваться токсические вещества, которые отравляют и сами клетки, и патогена. В результате наблюдаются небольшие пустулы, окруженные желтым или светлым ореолом отмерших клеток растений. Поэтому для

учета устойчивости применяют шкалы иммунности, т. е. устанавливается тип реакции на заражение, который является качественным показателем, характеризующим реакцию растительной ткани на внедрение патогена и дальнейшее его развитие.

Существенным показателем устойчивости сортов может быть и урожайность оцениваемых растений в условиях развития на них болезни. Поэтому выносливость (толерантность) считают важным показателем устойчивости растений.

Задание 1. Определить устойчивость сортов и сортообразцов пшеницы к твердой и ячменя к пыльной головне.

Цель задания: оценить устойчивость селекционного материала пшеницы к твердой и ячменя к пыльной головне.

Материал и оборудование: сноповые образцы различных сортов и сортообразцов растений, выращенные с искусственным заражением; листы оберточной или газетной бумаги; микроскопы и принадлежности для микроскопирования.

Отчетливые признаки твердой головни на пшенице проявляются в начале молочной спелости зерна. В этой фазе пораженные колосья несколько сплюснуты; окраска их интенсивно зеленая с синим оттенком, колосковые чешуи раздвинуты. К моменту полной спелости разница в окраске пораженных и здоровых колосьев исчезает. В колосе вместо зерна обнаруживаются темные образования округлой формы – головневые мешочки, заполненные мелкими темными спорами – телиоспорами. Головневый колос легче здорового, поэтому такие колосья прямостоячие.

Рассмотрите телиоспоры твердой головни под микроскопом. Для этого в каплю воды на предметное стекло поместите на кончике иглы немного пыльцы из больного колоса – телиоспор гриба. Покройте препарат покровным стеклом. Рассмотрите при малом и большом увеличении. Они шаровидные с сетчатой или ребристой оболочкой. Зарисуйте.

Пыльная головня ячменя проявляется в период колошения и цветения. Начиная со стадии молочной спелости, в посевах будут оставаться стержни разрушенного колоса с небольшим содержанием черной пылящей массы телиоспор. Рассмотрите телиоспоры пыльной головни под микроскопом. Для этого сделайте водный препарат с небольшим количеством спор, взятых из пораженного колоса, и рассмотрите при малом и большом увеличении. Телиоспоры возбудителя пыльной головни гораздо мельче, чем твердой. Они мелкие, шаровидные, реже угловатые или продолговатые, оливково-коричневые, оболочка их покрыта шипиками. Зарисуйте препарат.

Разверните сноповый образец на бумаге, запишите его название или номер и приступайте к анализу. Растения снопа раскладывают по группам: а) здоровые стебли; б) стебли, пораженные головней.

Определите для каждого сортообразца распространенность болезни. Данные запишите в табл. 32.

Таблица 32. Устойчивость сортообразцов пшеницы и ячменя к твердой и пыльной головне

Сорт, сортообразец	Количество стеблей		Процент поражения	Тип устойчивости
	здоровых	больных		

Таким же образом проведите анализ селекционного материала на устойчивость к пыльной головне. Проведите учет пораженных колосьев, вычислите процент пораженности для каждого сорта или образца. Составьте таблицу и по результатам анализов сделайте заключение об устойчивости сортов и сортообразцов.

Для классификации селекционного материала предлагаем пяти-бальную шкалу:

- 0 – высокоустойчивый (пораженные колосья отсутствуют);
- 1 – практически устойчивый (поражение не превышает 5 %);
- 2 – слабовосприимчивый (поражение не превышает 25 %);
- 3 – средневосприимчивый (поражение не превышает 50 %);
- 4 – сильновосприимчивый (поражение более 50 %).

Таким же образом заполняется таблица и по пыльной головне.

Для оценки устойчивости сортов к твердой головне можно пользоваться шкалой, составленной в ТСХА, при работе с пшеницей на инфекционном фоне.

Группа	Поражение, %
1	До 2 (устойчивые сорта)
2	От 2,1 до 10 (среднеустойчивые)
3	От 10,1 до 20 (умеренно восприимчивые)
4	Более 20 (восприимчивые)

Учет пораженности головней проводят в период апробации семенных посевов.

По данным распространения заболеваний в посевах делают заключение о необходимости выбраковки посевов из числа семенных или перевода их в более низкую категорию. Эти нормативы весьма жесткие. Так, посевы категорий ОС (П-1, П-2, Р-1, РННС), ЭС (Р-2, суперэлита), РС₁₋₃ (первая репродукция) не должны быть поражены следующими видами головни:

- пшеница, тритикале, ячмень – пыльной, твердой, стеблевой и карликовой;
- рожь – твердой и стеблевой;
- овес – твердой и пыльной;
- просо и сорго – пыльной.

Допустимые нормативы зараженности посевов различными видами

головни в зависимости от категории представлены в табл. 33.

Таблица 33. Допустимые нормативы зараженности семенных посевов головней, %, не более

Виды головни	Культура	1-я и 2-я репродукции	РС _n
Твердая	Пшеница, ячмень	0,3	0,5
Пыльная	Пшеница, ячмень	0,1	0,3
Стеблевая, карликовая	Пшеница, ячмень, тритикале	Не допуск.	Не допуск.
Пыльная и твердая в сумме	Тритикале, овес	0,3	0,5
Пыльная	Просо, сорго	0,3	0,5
Твердая и стеблевая в сумме	Рожь	0,3	0,5

Задание 2. Определить устойчивость различных сортообразцов и сортов люпина к фузариозному увяданию.

Цель задания: определить устойчивость различных сортообразцов и сортов люпина к фузариозному увяданию.

Материал и оборудование: образцы различных сортов и сортообразцов люпина, выращенные на инфекционном фоне; листы оберточной или газетной бумаги; бумага для этикеток; микроскопы и принадлежности для микроскопирования спороношения, полученного на стеблях во влажной камере.

Фузариозное увядание может развиваться на протяжении всего периода вегетации, но особенно сильно – в фазах бутонизации и цветения. Поражение начинается с верхней части растения: желтеют и увядают листья, поникает верхушка, потом засыхает все растение. На свежих растениях при косом срезе заметно побурение проводящих сосудов. Во влажных условиях на стеблях увядших растений виден белый или розовый налет спороношения гриба.

Подготовленные образцы размещают на столах. Разворачивают снопы, записывают в рабочую тетрадь наименование сорта или сортообразца. Все растения разделяют на следующие группы:

0 – отсутствие поражения;

1 – слабое поражение, начало увядания, листовые пластинки повисают на черешках;

2 – среднее поражение, листья и черешки подсыхают, заметно начало загнивания растений у основания стебля, на разрезе стеблей видно побурение проводящих сосудов;

3 – сильное поражение, растение отмирает, листовые пластинки осыпаются, черешки поникают, во влажную погоду у основания стебля наблюдается налет мицелия и спороношения гриба.

На основании полученных данных высчитывают распространенность болезни.

Затем определяют устойчивость сортообразца по следующей шка-

ле.

Балл	Устойчивость	Поражение, %
1	Очень низкая	Очень сильное (более 50)
3	Низкая	Сильное (26–50)
5	Средняя	Среднее (11–25)
7	Высокая	Слабое (2,5–10)
9	Очень высокая	Поражение отсутствует или слабое (менее 2,5)

По данным анализа заполните табл. 34.

Таблица 34. Устойчивость сортообразцов люпина к фузариозному увяданию

Сорт, сортообразец	Распространенность болезни, %	Устойчивость	Количество растений по группам поражения			
			0	1	2	3

Выберите стебли с поражением группы 2, сделайте косой срез. Убедитесь, что на нем имеется побурение. Зарисуйте. Это диагностический признак фузариозного увядания.

Промикроскопируйте спороношение, которое наблюдается в основании стебля на свежих больных растениях или может быть получено во влажной камере. Под микроскопом видны макроконидии серповидные, слабоизогнутые, бесцветные, с поперечными перегородками, с хорошо заметной ножкой. Могут присутствовать и другой формы конидии – хламидоспоры. Они округлые, одно-, двухклеточные, бесцветные или светло-желтые, с зернистым содержимым, промежуточные.

Задание 3. Определить устойчивость сортообразцов пшеницы или ячменя к корневой гнили.

Цель задания: установить степень развития болезни и характер устойчивости к обыкновенной корневой гнили селекционного материала ячменя или пшеницы по проросткам в лабораторных и полевых условиях в фазе всходов и перед уборкой.

Материал и оборудование: снопы сортообразцов ячменя или пшеницы; семена ячменя или пшеницы; фильтровальная бумага и калька; микроскопы и принадлежности для микроскопирования.

Корневые гнили поражают озимую и яровую пшеницу, ячмень, озимую рожь и слабее овес. Различают обыкновенную, церкоспореллезную, офиоблезную и фузариозную корневые гнили. В республике широко распространена обыкновенная корневая гниль, возбудителями являются *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (телеморфа *Cochliobolus sativus*, *Helminthosporium sativum* Pammel, C.V. King et Bakke.) – гельминтоспориозная и виды рода *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. avenaceum*,

F. culmorum и др.) – фузариозная. Возбудители сохраняются на растительных остатках, семенах и в почве. Обыкновенная корневая гниль проявляется в виде побурения первичных и вторичных корней, первого надземного и подземного междоузлия, узла кущения. Слабопораженные растения могут нормально развиваться и давать урожай. При сильном поражении может отмечаться полная гибель растений или они отстают в росте, не выколашиваются, дают щуплое зерно и мелкий колос. Может наблюдаться пустоколосость и белостебельность. Для оценки устойчивости зерновых к корневой гнили используют данные естественного или искусственного инфекционного фона. Результаты испытания учитывают дважды: в фазе всходов и перед уборкой. Растения выкапывают с корнями и анализируют по стандартной шкале в баллах (рис. 8).

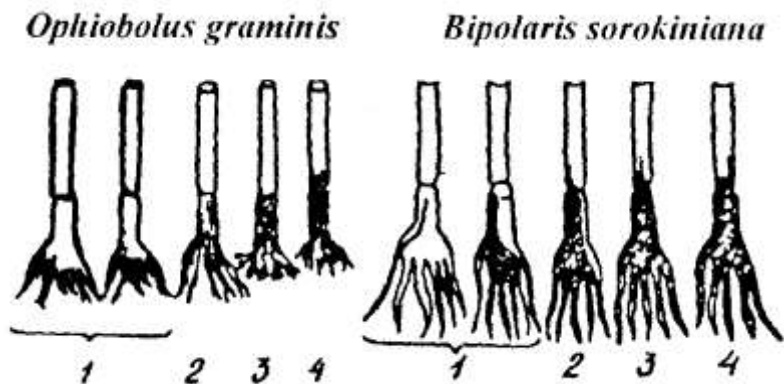


Рис. 8. Степень поражения зерновых корневыми гнилями.

Разложите сортообразцы и приступайте к анализу. Растения каждого образца разложите по группам. Каждая соответствует стандартной шкале для гельминтоспориозной корневой гнили в баллах:

- 0 – отсутствие признаков болезни;
- 1 – слабое побурение основания стебля или подземного междоузлия;
- 2 – сильное побурение основного и подземного междоузлий;
- 3 – сильное побурение и белостебельность;
- 4 – погибшие (невыколосившиеся) или пустоколосые растения.

Учет офиоболезной корневой гнили проводят в фазы всходов, кущения и молочной спелости по следующей шкале в баллах:

- 0 – здоровые растения;
- 1 – на основании стебля и корнях темные единичные штрихи;
- 2 – основание стебля буроватое с многочисленными черными поло-

сами или пятнами, корни частично отмерли;

3 – основание стебля бурое, покрыто углистым налетом, корни наполовину отмерли;

4 – полное отмирание.

Для каждого сортообразца высчитайте развитие болезни и разбейте их по устойчивости на следующие группы:

1 – сравнительно устойчивые, развитие болезни до 5 %;

2 – умеренно устойчивые (6–15 %);

3 – поражаемые (16–25 %);

4 – сильнопоражаемые (более 25 %).

Результаты анализа запишите по форме табл. 35.

Таблица 35. Оценка зерновых на устойчивость к обыкновенной корневой гнили

Сорт, сортообразец	Всего стеблей	Поражение в баллах					Развитие болезни, %	Устойчивость
		0	1	2	3	4		

Проведите оценку инфицированных проростков ячменя или пшеницы приведенными ниже способами.

1. Методика Л.А. Бенкена и В.Н. Хрустовской (1977). Необходимо вырастить 7–10-дневные проростки в бумажных рулонах. Подготовить суспензию конидий гелиминтоспориума или фузариума при плотности $3 \cdot 10^5$ – $12 \cdot 10^5$ в 1 мл суспензии. Наносят одну каплю суспензии пипеткой на каждое растение и заворачивают рулоны. Выдерживают в термостате при температуре 22–24 °С 2–3 дня, затем проростки подвергают анализу.

2. Методика ГОСТа. Для анализа отбираются семена различных сортообразцов, выращенных в одинаковых условиях. При естественном заражении лучше брать семена поздних сроков уборки. Для определения зараженности семян образец отбирают согласно ГОСТ 12037–85 в размере 200 г в бумажный пакет. Семена высыпают на стекло, перемешивают, делят двумя линиями на четыре треугольника и из каждого отсчитывают дважды по 25 семян – всего 200 семян (четыре пробы по 50 семян). Стекло, на котором выделяют навески, фильтровальную бумагу, пинцеты предварительно стерилизуют.

Для рулонов используют двухслойную фильтровальную бумагу размером 15×73,5 см, которую увлажняют кипяченой остуженной водой из расчета 350 мл на образец. Затем по осевой линии, отступив на 3 см от верха, через каждые 2 см раскладывают семена (25 шт. на полосу бумаги). На семена кладут полоску кальки (7×87,5 см). Бумагу с семенами заворачивают в рулоны и ставят в сосуды вертикально. На

сосуды приклеивают этикетки с датой, номером и названием сорта или сортообразца.

Проращивание осуществляется в термостате 7 дней при температуре 22–24 °С.

Разворачивают рулоны и подсчитывают количество проростков по баллам следующей шкалы:

0 – проростки здоровые;

1 – на зерновках налет, проростки без видимых изменений;

2 – у основания зародышевых корешков побурение, занимающее не более $\frac{1}{4}$ длины, возможно побурение coleoptиле или появление штрихов на стебельке и первой пластинке, проростки развиваются нормально;

3 – побурение, занимающее более $\frac{1}{4}$ длины зародышевых корешков, проростки отстают в росте или деформированы, возможно поражение и других органов проростка;

4 – семена не выходят или проростки гибнут в течение 7 дней.

Для анализа по степени пораженности проростков воспользуйтесь рис. 6.

Результаты анализа записывают по форме табл. 35.

Задание 4. Определить устойчивость сортов и селекционного материала льна-долгунца к фузариозному увяданию.

Цель задания: дать оценку селекционного материала льна-долгунца на устойчивость к фузариозному увяданию.

Материал и оборудование: снопы сортов или сортообразцов льна-долгунца, выращенного на инфекционном фоне; колбы с культурой возбудителя фузариозного увядания; микроскопы и принадлежности для микроскопирования.

Для оценки льна на устойчивость к фузариозному увяданию используются лабораторные, вегетационные и полевые методы с применением инфекционных фонов. Основной тип поражения – это увядание всего растения. Однако может наблюдаться и частичное побурение без гибели коробочек или полное, когда растения гибнут до образования коробочек. Учет пораженных растений проводят в фазе елочки и перед уборкой. Диагностическим признаком кроме увядания является наличие спороношения на основании стебля.

Подготовленные для учета снопы льна-долгунца раскладывают на столе. Растения каждого сортообразца сортируют на группы по условной шкале:

0 – отсутствие поражения;

1 – слабая степень поражения, частичное побурение растений;

2 – средняя степень поражения, побурение всего растения (в период уборки);

3 – сильная степень поражения, растения погибли до образования

коробочек.

По общепринятой формуле вычисляют развитие болезни. На основании развития болезни определяется устойчивость сортообразца к патогену по следующей шкале.

Развитие болезни, %	Характеристика устойчивости
До 20	Высокоустойчив
20–40	Устойчив
40–60	Среднеустойчив
60–80	Восприимчив
80–100	Высоковосприимчив

Результаты анализа записывают по форме табл. 36.

Таблица 36. Устойчивость образцов льна-долгунца к фузариозному увяданию

Сорт, сортообразец	Развитие болезни, %	Характеристика устойчивости

Изучите спороношение с культуры патогена фузариозного увядания. На искусственной питательной среде этот патоген образует воздушную грибницу с бесцветными, слегка серповидными конидиями, имеющими по 1–3 перегородки. Белый налет с конидиями можно наблюдать на органах больных растений, а во влажную и теплую погоду – и в почве. Гриб иногда образует неокрашенные гладкие или шероховатые, одно-, двухклеточные хламидоспоры диаметром 6–13 мкм. Рассмотрите спороношение *Fusarium* под микроскопом, зарисуйте конидии и хламидоспоры в рабочей тетради.

Задание 5. Определить устойчивость сортов и селекционного материала картофеля к фитофторозу.

Цель задания: установить устойчивость селекционного материала и сортов картофеля, включенных в Государственный реестр, к фитофторозу.

Материал и оборудование: зараженные дольки листьев картофеля, полученные при помощи микрокамеры М.С. Дунина; пораженные при естественном заражении листья картофеля.

В селекционных питомниках сорта и гибриды картофеля оценивают на фитофтороустойчивость визуально, с использованием следующей шкалы.

Балл	Поражение поверхности листьев, %
0	Отсутствует
1	До 10
2	11–25
3	26–50
4	51–75

Сорта и гибриды, которые проявили устойчивость к болезни в поле, оценивают на полевую устойчивость лабораторно-полевым методом. Для этого используют микрокамеры М.С. Дунина для искусственного заражения. Микрокамера состоит из эластичного проволочного зажима с двумя кольцами диаметром 15 мм. В эти кольца вставляют целлофановые чашечки или вдавливают кружки из фотопленки (в каждую микрокамеру можно закладывать кусочек ваты). Обеспечивают не менее чем 6-часовой контакт капли инокулюма с поверхностью листьев при температуре воздуха 18–20 °С. Утром камеру снимают. Обычно на четвертые сутки появляются первые признаки. Листья срезают и закладывают в инкубационные камеры на стекла, покрытые влажной марлей и фильтровальной бумагой, концы марли опускают в чашки Петри с водой. Опыт проводят в восьми повторностях в фазы бутонизации и цветения.

Учет проводят на восьмой день по следующей шкале:

0 – отсутствие признаков болезни;

1–2–3 – некрозы без спороношения;

4–5–6 – различные степени спороношения.

Развитие болезни высчитывают по общепринятой формуле. Индекс поражения рассчитывают по следующей формуле:

$$x = \frac{a_1 \cdot \bar{b}_1}{v_1} + \frac{a_2 \cdot \bar{b}_2}{v_2} + \dots + \frac{a_n \cdot \bar{b}_n}{v_n},$$

где x – индекс поражения;

a_1 – a_n – диаметр поражения, мм;

\bar{b}_1 – \bar{b}_n – интенсивность спороношения, балл;

v_1 – v_n – инкубационный период, дней;

n – количество заражений;

Пользуются следующей шкалой интенсивности спороношения.

Балл	Степень поражения поверхности листьев, %
0,5	До 12
1	12–25
2	26–50
3	51–75
4	Свыше 75

По индексу поражения судят о степени устойчивости сортов к фитофторозу. Результаты исследований заносят в табл. 37.

Таблица 37. Соотношение степени фитотороустойчивости картофеля с индексом поражения ботвы (по Н.А. Дорожкину и др., 1972)

Индекс поражения	Степень устойчивости сорта	Группа устойчивости
0–5	Очень устойчив	I
5,1–10	Устойчив	II
10,1–20	Слабовосприимчив	III
20,1–30	Восприимчив	IV
Свыше 30	Очень восприимчив	V

Задание 6. Определить устойчивость сортов яблони и груши к парше.

Цель задания: дать оценку различным сортам яблони и груши по устойчивости к парше.

Материал и оборудование: пораженные листья и плоды различных сортов груши и яблони; шкала пораженности листьев.

Парша поражает почечные чешуйки, листья, черешки, завязь, плоды, плодоножки, молодые побеги. Пятна парши вначале оливкового цвета, затем темнеющие, с бархатистым налетом спороношения. Сильнее поражаются молодые растущие листья. На плодах пятна темные с бархатистым налетом, который затем стирается. Под пятном формируется слой опробковевшей ткани, что препятствует ее нормальному росту, поэтому плоды развиваются кривобокими, часто растрескиваются.

Пораженные плоды и листья для занятий получают путем искусственного или естественного заражения. Для учета заболевания необходимо иметь по каждому сорту не менее 30 листьев и плодов. Пораженность каждого листа оценивают в баллах, используя следующую иллюстрационную шкалу (рис. 9).

Для оценки плодов воспользуйтесь следующей шкалой (в баллах):

- 0 – плоды здоровые;
- 1 – пятна мелкие, встречаются редко, неопробковевшие;
- 2 – пятна мелкие, единичные, часто опробковевшие;
- 3 – пятна единичные (2–3), диаметром до 5 мм, со слабым налетом спороношения или опробковения;
- 4 – пятна в значительном количестве, крупные (5–10 мм), сливающиеся, с темным налетом спороношения, возможны трещины;
- 5 – пятна многочисленные, крупные (10 мм и более), сливающиеся, с темным налетом спороношения, местами на плодах глубокие трещины.

Определите развитие болезни по общеизвестной формуле.

Для установления группы устойчивости пользуйтесь данными табл. 38.

Результаты анализа запишите по форме табл. 39.

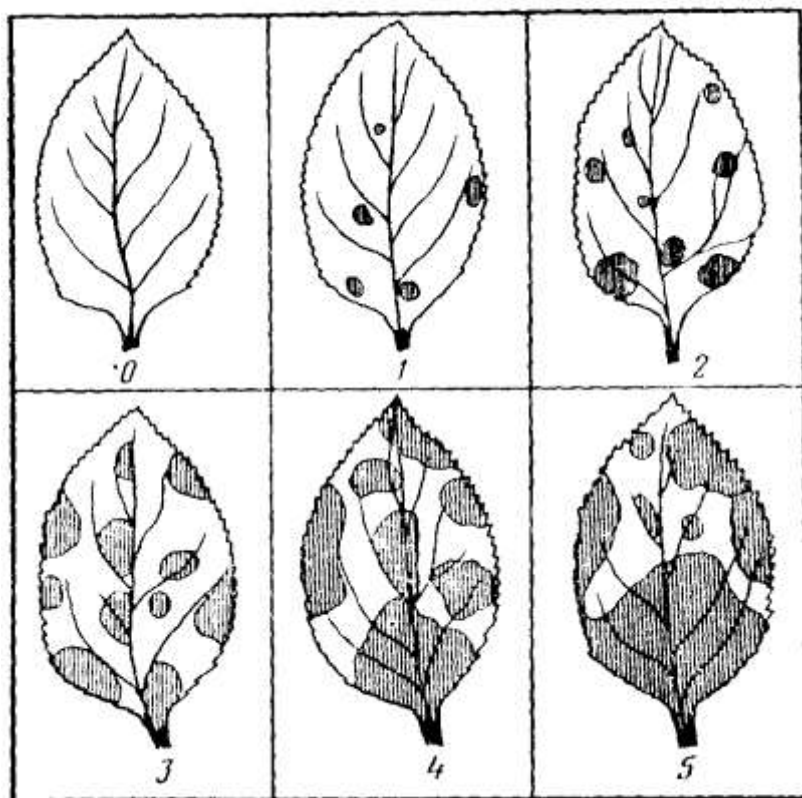


Рис. 9. Шкала для оценки устойчивости сортов яблони и груши к парше (И.И. Белоус).

Таблица 38. Градация устойчивости яблони и груши к парше
(по А.М. Соколову и Р.А. Соколовой, 1974)

Группа устойчивости	Поражено в баллах		Процент больных	
	листьев	плодов	листьев	плодов
0 (иммунный)	0	0	0	0
I (высокоустойчивый)	0,1–1,75	0,25–0,75	1–10	0,1–5
II (относительно устойчивый)	2–2,75	1–2,75	10	6–10
III (восприимчивый)	3–4	3–4	11–25	11–25
IV (высоковосприимчивый)	>4	>4	>26	>26

Таблица 39. Устойчивость к парше сортов яблони и груши

Сорт	Развитие болезни, %	Характеристика устойчивости

Задание 7. Определить устойчивость зерновых к ржавчине.

Цель задания: дать оценку сортам и сортообразцам зерновых на устойчивость к стеблевой и бурой ржавчине.

Материал и оборудование: пораженные листья и стебли различных сортов и сортообразцов зерновых с бурой и стеблевой ржавчиной; шкалы пораженности; лупы; микроскопы.

Для изучения устойчивости сортов и сортообразцов зерновых к ржавчине используются листья и стебли с естественным поражением в урединиостадии, а также собранные на инфекционных фонах.

Количественные показатели развития ржавчины на зерновых культурах определяют по шкалам пораженности, а иммунитет растений – по шкалам иммунности.

Определите устойчивость селекционного материала пшеницы, ячменя или овса к стеблевой ржавчине. Пораженность учитывают по верхней половине стебля, используя шкалу по Петерсону (рис. 10). Необходимо сравнить каждый стебель со шкалой и результаты занести в табл. 40.

Для определения устойчивости зерновых культур к ржавчине по типу реакции на заражение можно воспользоваться комбинированной шкалой Т.Д. Страхова (см. рис. 5) или использовать шкалу Э. Стэкмана и М. Левина. Наглядно каждый тип иммунности этой шкалы представлен на рис. 3.

Таблица 40. Учет пораженности зерновых стеблевой ржавчиной

Сорт, сортообразец	Количество анализируемых стеблей, шт.	В том числе стеблей										Характеристика сортообразца			
		По баллам иммунности					По степени пораженности								
		0	1	2	3	4	5	15	25	45	65		100		

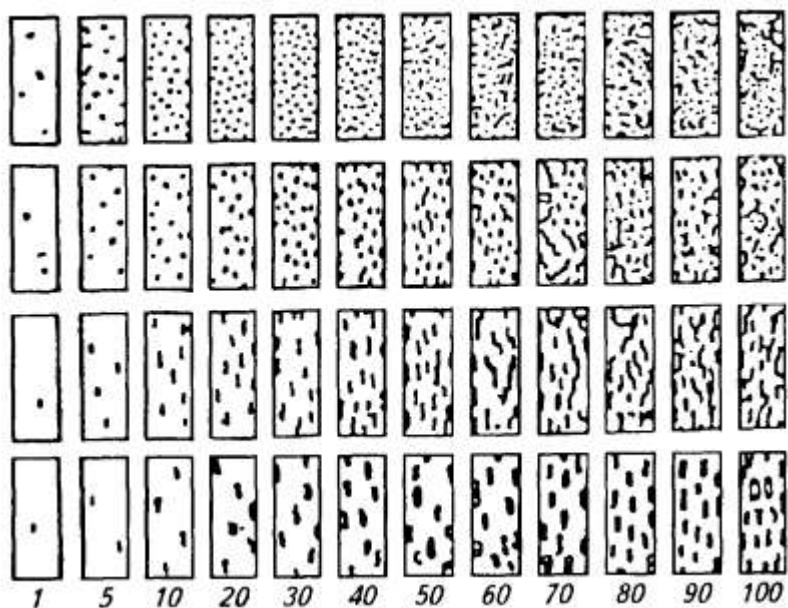


Рис. 10. Шкала для оценки степени поражения злаков различными видами ржавчины (по Петерсону и др.).

Шкала Стэкмена и Левина для оценки типа иммунитета

Тип реакции	Характеристика типа поражения
0	Нет пустул
0	Нет пустул, но есть мелкие пятна отмершей ткани
1	Очень мелкие пустулы, окаймленные мертвой тканью
2	Пустулы средних и мелких размеров, расположенные в хлорозных или отмерших островках ткани
3	Пустулы средней величины в хлорозных пятнах, отмерших участков нет
4	Крупные пустулы, хлорозных пятен и отмершей ткани около пустул нет
X	Пустулы разных размеров и другие показатели типов 1–4

5.2. Методы оценки устойчивости растений к вредителям

Специфика иммунитета растений к вредителям определяется прежде всего целенаправленной подвижностью насекомых, их способностью активного выбора среды обитания, активным поиском и выбором пищи, мест размножения и развития. Поэтому многие защитные меха-

низмы растений непосредственно связаны с особенностями питания, развития и вредоносности фитофагов. По характеру взаимодействия фитофаг – растение выделяют четыре типа устойчивости: антиксеноз (непредпочтение), антибиоз (истинная устойчивость), толерантность (выносливость) и уход от вредителя (псевдоустойчивость).

Задание 1. Определить поврежденность сортов и сортообразцов гороха гусеницами плодовой.

Цель задания: оценить устойчивость сортов и сортообразцов гороха к повреждению плодовой.

Материал и оборудование: бобы гороха различных сортов и сортообразцов, поврежденные и неповрежденные гусеницами; газетная или оберточная бумага; лупы.

Гороховая плодовая – небольшая бабочка с темно-бурыми передними крыльями. В размахе размер ее крыльев составляет 13–17 мм. Гусеница светло-зеленая с коричневой головкой, длина взрослой гусеницы – 7–10 мм. Самки откладывают яйца на листья, стебли, прилистники и бобы. Отродившаяся гусеница сразу же направляется к бобам, вгрызается в них через верхний шов и питается зерновками. Из нескольких гусениц, проникших в боб, остается только одна (остальные гусеницы погибают). В результате повреждений гороха уменьшается урожай, ухудшается всхожесть семян и снижаются пищевые качества.

По каждому образцу вначале подсчитывают отдельно поврежденные и неповрежденные бобы. Затем раскрывают поврежденные бобы и подсчитывают поврежденные и неповрежденные зерновки по каждому бобу. Результаты анализа записывают по форме табл. 41.

Таблица 41. Учет поврежденности бобов и зерновок сортов и сортообразцов гороха гусеницами плодовой

Сорт, сортообразец	Поврежденность, %		Характеристика устойчивости
	бобов	зерновок	

Задание 2. Определить повреждаемость сортов и сортообразцов яровой пшеницы мухой зеленоглазкой.

Цель задания: определить повреждаемость селекционного материала и сортов яровой пшеницы мухой зеленоглазкой.

Материал и оборудование: сноповые образцы яровой пшеницы, отличающиеся различной устойчивостью к зеленоглазке; газетная или оберточная бумага; лупы; пробирки для сбора насекомых.

Зеленоглазка повреждает чаще всего у яровой пшеницы верхнее междоузлие, выгрызая на нем бороздку. Поврежденные растения выделяются среди здоровых низким ростом и сильным утолщением верхней части стебля. В связи с этим при анализе выделяют следующие

шие группы пробного снопа, составленного не менее чем из 100 растений каждого сорта или сортообразца:

- а) здоровые стебли с колосом;
- б) поврежденные стебли, нормально выколосившиеся;
- в) поврежденные стебли с колосом, частично находящимся во влагище листа;
- г) погибшие стебли («сигары») со щуплым, без зерна колосом.

Подсчитывают количество здоровых и поврежденных стеблей по каждой группе и общий процент поврежденности сорта зеленоглазкой.

Для этого используют следующую формулу:

$$P = \frac{b + v + z}{a + b + v + z} \cdot 100,$$

где P – процент повреждения;

a, b, v, z – группы, выделенные при анализе стеблей.

Для оценки устойчивости используют приведенную ниже шкалу.

Степень устойчивости	Общее повреждение, %
Слабоповреждаемые	Не более 5
Среднеповреждаемые	6–25
Сильноповреждаемые	Более 25

При оценке на устойчивость к зеленоглазке следует иметь в виду и характер повреждения, т. е. процент стеблей с частично вышедшим или вовсе не вышедшим из влагища колосом.

Указанные типы повреждения весьма вредоносны, зерно или отсутствует, или образуется очень щуплое.

Результаты анализа запишите по форме табл. 42.

Таблица 42. Повреждаемость сортов яровой пшеницы зеленоглазкой

Сорт, сортообразец	Всего стеблей	Здоровых стеблей	Поврежденных стеблей			Общее повреждение, %	Устойчивость

Задание 3. Определить устойчивость сортов картофеля к колорадскому жуку

Цель задания: определить среднюю повреждаемость сортов картофеля колорадским жуком.

Материал и оборудование: свежие или законсервированные стебли картофеля различных сортов, поврежденные личинками колорадского жука; оберточная или газетная бумага.

Взрослый колорадский жук и личинки объедают листья картофеля, начиная с верхних. Уничтожив ботву одного растения, личинки перебираются на другие растения. В зависимости от условий погоды, агротехники и устойчивости сортов поврежденность может быть раз-

личной. Для оценки поврежденности используйте следующую шкалу.

Балл	Повреждение поверхности листьев, %
0	Без повреждения или до 10
1	11–24
2	25–49
3	50–79
4	Более 80

Все стебли анализируемого образца раскладывают по группам. Затем число растений каждой группы умножают на показатель балла данной группы. Сумму полученных произведений делят на общее число растений – поврежденных и неповрежденных. Чем ниже степень поврежденности, тем более устойчив сорт. Распределите образцы по степени устойчивости к колорадскому жуку.

Результаты анализа оформите в табл. 43.

Таблица 43. Пораженность сортов и сортообразцов картофеля колорадским жуком

Сорт, сортообразец	Поражено, % по баллам	Средняя степень повреждения

5.3. Определение выносливости селекционного материала к болезням и вредителям

При характеристике устойчивости растений к болезням и вредителям очень важно определить размеры причиняемого ими вреда. Сохранение урожая в условиях массового развития патогена или вредителя считается самым ценным признаком устойчивости сортов. Важным показателем степени их выносливости к болезням и вредителям является определение потерь от них, т. е. их вредоносности.

Под потерями урожая от болезней растений понимается снижение, недобор урожая растений вследствие поражения их тем или иным патогеном. Потери устанавливают опытным путем, т. е. подсчитывают их, сравнивая фактический урожай больных и здоровых растений. Вычисления проводят по формуле

$$X = \frac{(A - a)}{A} \cdot 100,$$

где X – потери урожая, %;

A – урожай здоровых растений;

a – урожай больных растений.

Устанавливают потери урожая как для общего количества растений, так и потери, приходящиеся на ту или иную единицу поражения (балл, процент). В последнем случае они назы-

ваются коэффициентами вредоносности.

Большое значение имеет установление вредоносности при оценке устойчивости к вирусным, микоплазменным, нематодным заболеваниям, многим вредителям.

Для определения выносливости (толерантности) используют следующую формулу:

$$B = \frac{Y_{\text{б}}}{Y_{\text{к}}} \cdot 100,$$

где B – выносливость, %;

$Y_{\text{б}}$ – урожай зерна с одного растения (или единицы площади) на инфекционном фоне, г;

$Y_{\text{к}}$ – урожай зерна с одного растения (или единицы площади) в контроле, г.

Для выявления показателя (B) учитывают урожай испытуемых сортов с единицы площади на инфекционном фоне, высчитывают средний урожай на одно растение и таким же образом определяют урожай одного здорового растения на естественном фоне (контроль).

Задание 1. Определить вредоносность корневой гнили на пшенице или ячмене.

Цель задания: определить потери урожая, вызванные корневой гнилью, с учетом балла поражения и в пересчете на 1 м².

Материал и оборудование: свежие или засушенные растения сортов и сортообразцов пшеницы или ячменя; газетная или оберточная бумага; лабораторные весы.

Свежие растения, отобранные с 1 м², моют, сухие – просто отряхивают от почвы. В соответствии со шкалой поражения (см. рис. 7) растения распределяют на здоровые и больные (по баллам) по следующим группам:

0 – отсутствие признаков болезни;

1 – слабое побурение основания стебля или подземного междоузлия;

2 – сильное побурение основного и подземного междоузлия;

3 – сильное побурение и белостебельность;

4 – погибшие (невыколосившиеся) или пустоколосые растения.

Колосья каждой группы обмолачивают, взвешивают и вычисляют средний вес зерна с одного растения. Подсчитывают урожай здоровых и больных растений по баллам и в сумме.

Для каждого сортообразца высчитывают развитие болезни и по этому показателю разбирают на следующие группы.

Устойчивость

Развитие болезни, %

Сравнительно устойчивые

Не превышает 5

Умеренно устойчивые

6–15

Поражаемые
Сильнопоражаемые

16–25
Более 25

Результаты анализа оформите в табл. 44.

Урожай зерна всех растений составляет фактический урожай с 1 м². Подсчитайте потери урожая для каждой группы (по баллам) и на 1 м². Если, несмотря на значительное развитие болезни, потерь урожая не будет или они не существенны, значит, сорт можно считать выносливым.

Задание 2. Определить выносливость (толерантность) сортов и сортообразцов люпина к вирусному израстанию.

Цель задания: определить выносливость (толерантность) селекционного материала люпина к вирусному израстанию.

Материал и оборудование: свежие или засушенные растения сортов и сортообразцов люпина, выращенные на инфекционном и естественном фонах; оберточная бумага; лабораторные весы.

Растения подразделяют на следующие группы (в баллах):

- 0 – здоровые растения;
- 1 – слабое проявление симптомов;
- 2 – сильное развитие симптомов на всех листьях;
- 3 – резкие симптомы, на листьях кроме отчетливой мозаики наблюдается редукция листочков, они становятся очень узкими, наблюдается израстание стеблей;
- 4 – гибель растений.

Растения разделите на группы соответственно баллам; обмолотите каждую группу растений. Следует определить выносливость, используя общепринятую формулу. Результаты запишите в табл. 45.

Таблица 44. Устойчивость и выносливость сортов и сортообразцов пшеницы или ячменя к корневой гнили

Сорт, сортообразец	Развитие болезни, %	Устой- чивость	Вес растений с 1 м ² по группам (баллам), г					Потери урожая по группам, %					Предполагаемая выносливость	
			0	1	2	3		0	1	2	3	\bar{x}		

Таблица 45. Выносливость сортов и сортообразцов люпина к вирусному израстанию

Сорт, сортообразец	Поражено по баллам					Выносливость по группам					Выносливость, %	
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4		

КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ

Агрессивность – способность микроорганизма нападать на своего хозяина, обитать в нем, преодолевать его сопротивляемость, использовать его для своего питания и размножения в нем.

Адаптация (лат. adaptation – приспособление) – возникновение у биологических видов признаков и свойств (приспособлений), обеспечивающих возможность жизнедеятельности в определенных условиях внешней среды.

Антибиоз – форма взаимоотношений в сообществе между популяциями или отдельными особями, когда один партнер вырабатывает вещество, вредно действующее на конкурента.

Бактериофаг (от греч. phagos – пожиратель) – вирус бактерий, способный поражать бактериальную клетку, размножаться в ней и вызывать ее гибель.

Бактерия – микроскопический, обычно одноклеточный организм, обладающий клеточной стенкой, но не имеющий оформленного ядра.

Биологический порог вредности (БПВ) – минимальная плотность популяции вредного организма или развития (распространения) заболевания, которая вызывает статистически достоверное снижение урожайности.

Биометод (биологический метод борьбы с вредными организмами) – группа приемов, используемых для сокращения численности вредных организмов путем использования других видов (энтомофагов, антогонистов) или продуктов их выделений.

Биота – флора и фауна, все живые организмы на определенной территории.

Биоценоз (греч. bios – жизнь, koinos – общий) – совокупность видов живых организмов, эволюционно отобранная условиями жизнедеятельности.

Вид – совокупность популяций особей, способных к скрещиванию с образованием плодового потомства, обладающих рядом общих морфологических и физиологических признаков и типов взаимоотношений с абиотической и биотической средой и отделенных от других таких же групп особей практически полным отсутствием гибридных форм.

Вирулентность (лат. virulentus – ядовитый) – степень патогенности возбудителей болезни.

Вирус – неклеточная форма жизни, представляющая собой крайне упрощенную паразитическую структуру, способную проникать в живую клетку и размножаться внутри нее. Вирусы состоят из нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК) и белковой оболочки.

Возбудители инфекционных болезней – паразиты всех систематических групп (вирусы, прокариоты, эукариоты), оказывающие бо-

лезнетворное действие на организм, способные вызвать заболевание.

Вредитель – вид животного, способный причинить повреждения растению, ущерб от которых экономически целесообразно предотвратить.

Гаустория – вырост клетки паразитарного гриба, проникающий в клетки пораженного растения.

Ген – элементарная единица наследственности, представленная биополимером – отрезком молекулы ДНК. Один ген отвечает за один признак.

Генерация (длительность одного поколения) – период жизни организмов от начала развития до половозрелого состояния (от одного поколения до другого).

Геном – комплекс генов, характерных для основного набора хромосом данного вида организма.

Генотип (греч. *genos* – род, происхождение, *typos* – образец, тип) – совокупность всех наследственных факторов организма – генов, локализованных в хромосомах, и всех внехромосомных цитоплазматических наследственных элементов (плазмонов), присущих особи, клону, популяции.

Генофонд – совокупность генов, имеющихся у всех особей популяции данного вида (рода).

Гифа – тонкая ветвящаяся нить, в общей совокупности с другими составляющая вегетативную часть гриба – грибницу или мицелий.

Грибы – бесхлорофилльные организмы, имеющие вегетативные тела с настоящими ядрами, использующие для питания живое (паразиты) или мертвое (сапротрофы) вещество других организмов, главным образом растений.

Заболевание – реакция растений на заражение, повреждение или угнетение вредными организмами.

Заражение – проникновение возбудителя внутрь тканей растений.

Защитные вещества – запасные вещества, накапливающиеся в цитоплазме растительных клеток и обладающие ядовитыми свойствами, представляющие барьер для проникновения микроорганизмов. Обычно это алкалоиды и гликозиды.

Изменчивость – свойство живого организма существовать, изменяя количественные и качественные признаки.

Инкубация – одна из фаз течения инфекционной болезни, охватывающая период между заражением и появлением первых симптомов болезни.

Конидиальная стадия – стадия бесполого размножения грибов, часто развивающаяся многократно в течение вегетационного периода. Служит для массового размножения и расселения грибов.

Конидии – гаплоидные споры, служащие для бесполого размножения, образующиеся на особых спороносящих органах – конидиенос-

цах, отходящих от вегетативного мицелия.

Лизис – растворение, разрушение клеток, в том числе микроорганизмов, под влиянием различных агентов: ферментов, бактериофагов, антибиотиков и т.д.

Мутации – это внезапные наследственные изменения, вызванные резким структурным и функциональным изменением генетического материала.

Метаболизм – обмен веществ, совокупность процессов ассимиляции и диссимиляции в живом организме.

Микроорганизм – мельчайший, преимущественно одноклеточный организм, видимый только в микроскоп.

Мицелий, грибница – вегетативные органы грибов, выполняющие функции питания, роста, часто размножения, защиты спороносящих органов. Грибница состоит из гиф.

Мониторинг – система наблюдений, учетов и оценки фитосанитарного состояния семян, почв и посевов в отношении численности и активности вредных организмов.

Монофаги – вредные организмы с узкой пищевой специализацией.

Некроз – отмирание какого-либо участка ткани или части растения.

Облигатный паразит – паразит, не способный жить или размножаться без паразитирования.

Онтогенез – совокупность последовательных морфологических, физиологических и биохимических преобразований организма от его зарождения до конца жизни.

Ооспора – покоящаяся половая спора, образовавшаяся после оплодотворения, способная зимовать.

Паразит – организм, живущий за счет особей другого вида и тесно с ними связанный в своем жизненном цикле.

Патоген – возбудитель болезни растения, вызывающий при проникновении в ткани патологические явления.

Полиморфизм – одновременное наличие в популяции нескольких генотипически и фенотипически различающихся форм, что обуславливается генотипической изменчивостью.

Популяция (лат. population – население) – совокупность особей биологического вида, относительно изолированная в своей жизнедеятельности от других особей этого вида.

Раса фитопатогена – часть вида или специализированная форма, способная заражать сорта растения-хозяина.

Резистентность (лат. resistentia – сопротивляемость) – совокупное действие всех (физических, биологических и др.) факторов, которые не позволяют организму реализовать потенциальную способность к воспроизводству.

Сверхпаразит – паразит другого паразита.

Система «хозяин – паразит» – взаимосвязанная совокупность ор-

ганизмов, где паразит проходит свой цикл развития. Хозяева стремятся с помощью различных биохимических и морфологических приспособлений избавиться от паразитов, а те, в свою очередь, стремятся адаптироваться к этим механизмам.

Спора – у паразитических простейших – стадия развития, на которой зародыш заключен в плотную оболочку, что позволяет паразиту легче распространяться в окружающей среде.

Фактор абиотический – условие или совокупность условий неорганического мира, неживой природы.

Фактор антропогенный – фактор, возникающий в ходе деятельности человека.

Факультативный паразит – паразит, который может жить самостоятельно, вне хозяина.

Хламидоспоры – толстостенные клетки, образующиеся одиночно или группами на вегетативном мицелии, часто обособляющиеся и становящиеся свободными.

Циста – форма существования одноклеточных и некоторых многоклеточных организмов, временно покрывающихся плотной оболочкой, которая позволяет им пережить неблагоприятные условия среды.

Эпифитотия – массовое заболевание растений при определенных предпосылках: наличие восприимчивых растений, заразного начала и благоприятных условий внешней среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гешеле, Э.Э. Основы фитопатологической оценки в селекции растений / Э.Э. Гешеле. М.: Колос, 1978. 218 с
2. Дьяков, Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов / Ю.Т. Дьяков. М.: Муравей, 1998. 384 с.
3. Иванок, В.Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В.Г. Иванок, С.А. Банадысев, Г.К. Журомский. Минск: Белпринт, 2005. 696 с.
4. Иммуниет растений / В.А. Шкалик, Ю.Т. Дьяков, А.Н. Смирнов [и др.]; под ред. проф. В.А. Шкаликова. М.: КолосС, 2005. 190 с.
5. Коновалов, Ю.Б. Селекция растений на устойчивость к болезням и вредителям / Ю.Б. Коновалов. М.: Колос, 1999. 136 с.
6. Кривченко, В.И. Методы изучения устойчивости зерновых культур к возбудителям головневых заболеваний / В.И. Кривченко. Л.: ВИР, 1972. 124 с.
7. Методы фитопатологических и энтомологических исследований в селекции растений / под ред. Ю.Н. Фадеева. М.: Колос, 1977. 224 с.
8. Плотникова, Л.Я. Иммуниет растений и селекция на устойчивость к болезням и вредителям / Л.Я. Плотникова. М.: КолосС, 2007. 359 с.
9. Помазков, Ю.И. Иммуниет растений к болезням и вредителям / Ю.И. Помазков. М.: Изд-во Университета дружбы народов, 1990. 80 с.
10. Попкова, К.В. Практикум по иммунитету растений / К.В. Попкова, З.П. Качалова. М.: Колос, 1984. 176 с
11. Инфекционные фоны в фитопатологии / А.Е. Чумаков [и др.]. М.: Колос, 1979. 208 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.....	3
Глава 1. Организация проведения лабораторных занятий по иммунитету растений и селекции на устойчивость	5
1.1. Правила охраны труда и техники безопасности при работе в лаборатории	5
1.2. Оптические приборы, правила и техника микроскопирования	7
Глава 2. Защитные функции растений и их использование в селекции	11
2.1. Факторы пассивного иммунитета	12
2.1.1. Структурно-морфологические факторы иммунитета	12
2.1.2. Фитонциды (фитоантицепины)	18
2.2. Факторы активного иммунитета	22
2.2.1. Реакция сверхчувствительности	22
2.2.2. Фагоцитоз	24
2.2.3. Фитоалексины растений	27
Глава 3. Специализация и патогенность возбудителей болезней	32
3.1. Специализация и изменчивость патогенов	33
3.2. Патогенность, вирулентность и агрессивность возбудителей болезней ...	39
Глава 4. Создание и использование инфекционных и инвазийных фонов в селекции сельскохозяйственных культур	42
4.1. Инфекционная нагрузка и методы ее определения	43
4.2. Методы создания инфекционных фонов путем заражения (инокуляции) посевного и посадочного материала	48
4.3. Искусственное заражение вегетирующих растений	59
4.4. Инфицирование почвы	65
4.5. Методы создания инвазийных фонов	69
Глава 5. Оценка устойчивости к болезням и вредителям	71
5.1. Методы учета пораженности и устойчивости селекционного материала к болезням	72
5.2. Методы оценки устойчивости растений к вредителям	86
5.3. Определение выносливости селекционного материала к болезням и вредителям	89
Краткий словарь терминов и определений.....	93
Литература.....	97

Учебное издание

Евгений Викторович Равков

**ИММУНИТЕТ РАСТЕНИЙ И СЕЛЕКЦИЯ
НА УСТОЙЧИВОСТЬ**

Лабораторный практикум

Редактор Н.А. Матасёва
Техн. редактор Н.К. Шапрунова
Корректор Н.Н. Пьянусова

ЛИ №348 от 16.06.2009. Подписано в печать 12.11.2010.
Формат 60×84 1/16. Бумага для множительных аппаратов.
Печать ризографическая. Гарнитура «Таймс».
Усл. печ. л. 5,81 Уч. изд. л. 5,68
Тираж 100 экз. Заказ . Цена 7760 руб.

Редакционно-издательский отдел БГСХА
213407, г. Горки Могилевской обл., ул. Студенческая, 2
Отпечатано в отделе издания учебно-методической литературы, ризографии
и художественно-оформительской деятельности БГСХА
г. Горки, ул. Мичурина, 5