

2.4. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

по дисциплине «Иммунитет растений и селекция на устойчивость»
для студентов агротехнологического факультета специальности 1-74 02 02

Селекция и семеноводство

очной формы получения образования с полным сроком обучения

Оглавление

2.4. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ.....	1
2.4.1. Структурно-морфологические факторы иммунитета	2
2.4.2. Влияние фитонцидности тканей на патогенов	5
2.4.3. Роль реакции сверхчувствительности в защите растений	8
2.4.4. Определение фитоалексинов растений	11
2.4.5. Методы учета пораженности и устойчивости селекционного материала к болезням	15
2.4.6. Методы учетов при энтомологических оценках устойчивости и повреждаемости растений.....	21
2.4.7. Определение выносливости селекционного материала к болезням и вредителям	24
Поражено по баллам	36
Выносливость по группам.....	36
Выносливость, %	36
2.4.8. Инфекционная нагрузка и методы ее определения	37
2.4.9. Создания инфекционного фона путем инокуляции посевного и посадочного материала	41
2.4.10. Создание инфекционного фона путем заражения вегетирующих растений	47
2.4.11. Методы инфицирования почвы при создании инфекционных фонов	51
2.4.12. Методы создания инвазионных фонов.....	53
2.4.13. Составить модель сорта, характеризующуюся комплексной устойчивостью к болезням и вредителям с указанием перечня доноров устойчивости, методов передачи признака и устранения нежелательных признаков, сцепленных с признаком устойчивости	56

2.4.1. 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 пробурывает 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 кутикулярного 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 бритвы; объективный и окулярный микрометры.

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

Конидии возбудителя парши яблони *Venturia inaequalis* (Сooke) Wint, 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, укладывающееся 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;

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

2.4.2. Влияние фитонцидности тканей на патогенов

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 паразитов, которые приобрели устойчивость к ним. Фитонциды определенного 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 простейших и насекомых.

Цель задания: установить влияние фитонцидов на простейших 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 сенную 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, подсчитывают 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. 3.

Таблица 3. 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 (фитоантицепинов) на прорастание телиоспор твердой головни *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. пшеницы или конидий *Helminthosporium sativum* на ячмене.

Цель задания: установить действие фитонцидов (фитоантицепинов) 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, алоэ 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 прокалывают препаровальную 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. 4.

Таблица 4. 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 препаровальной иглой конидии и переносят в капли воды и сока. Конидии *H. sativum* темные, лодочкообразные с поперечными перегородками, прорасти могут из каждой клетки.

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.

2.4.3. Роль реакции сверхчувствительности в защите растений

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 хлороза 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. 1).

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. 5.

Таблица 5. 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	

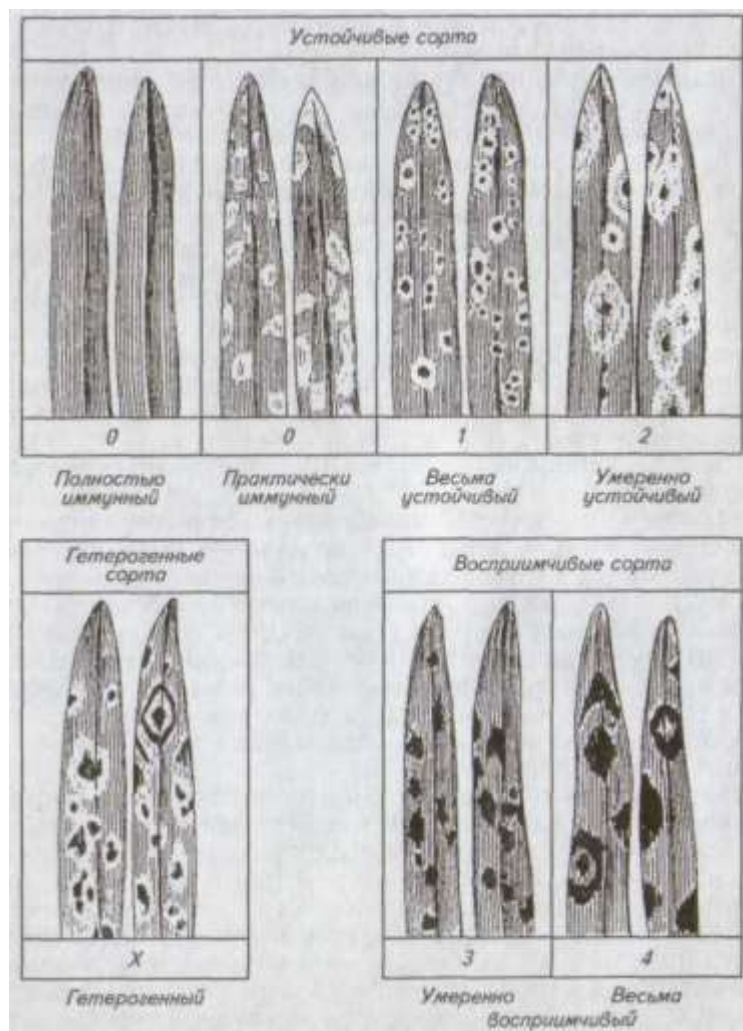


Рис. 1. Типы реакций пшеницы на заражение *Puccinia graminis*.

2.4.3.1. Фагоцитоз

В конце XIX века И.И. Мечников, работая в Пастеровском институте в Париже, открыл фагоциты – особые клетки, пожирающие чужеродные 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, лизоцинов 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 2. Ознакомьтесь 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, заспоренных 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 заспорения головней).

Прорастание 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. 6. Обычно анализу подвергают по 10 колеоптиле каждого сорта.

Таблица 6. Состояние грибницы *Tilletia caries* Tul. в проростках пшеницы

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

2.4.4. Определение фитоалексинов 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 фитотороустойчивости; 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 ложем является увлажненная фильтровальная

бумага. 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*. Предметные стекла с диффузатами помещают, предварительно пометив, во влажную камеру на сутки в термостат при температуре 22–24 °С. За этот период конидии начинают прорасти. Через сутки проводится анализ количества конидий и длины гиф. Результаты выражают в процентах. Полученные данные ингибирования записывают в табл. 7.

Таблица 7. Фитоалексинная активность клубней сортов картофеля, характеризующихся различной фитогороустойчивостью

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. 8.

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

Таблица 8. 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 гриб 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 гельминтоспориума крупные, темно-оливковые с поперечными перегородками, могут прорасти с любой клетки. Измеряют длину гиф.

Результаты оформляют по форме табл. 9.

Таблица 9. 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 сорта 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. 9.

2.4.5. Методы учета пораженности и устойчивости селекционного материала к болезням

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.

2.4.5.1. 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 сортосменной 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 (сорта-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 международная 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 *Ph. 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 °С 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 г, затем – R₁; 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.

Таблица 10. Схема определения рас фитотфоры

Генотип дифференциатора	Расы фитотфоры																
	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	
г	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
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.

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. 10).

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. 11.

Таблица 11. Результаты определения рас фитотфороза 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. Habgood) 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. 12.

Таблица 12. 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	

2.4.5.2. 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 развития 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. 13.

Таблица 13. 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 свете, 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 растильню 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 пакет, 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. 14.

Таблица 14. 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 отфильтровывают 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 инокулом 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 визуально (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. 15.

Таблица 15. 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			

2.4.6. Методы учетов при энтомологических оценках устойчивости и повреждаемости растений

Учеты численности насекомых проводят в различных целях. В энтомологических исследованиях они необходимы для изучения динамики численности, распространения и развития отдельных видов, а также в оценке состава энтомофауны биоценозов. В защите растений учеты численности являются главным компонентом фитосанитарного мониторинга, их проводят с целью оценки уровня численности и распространения вредителей, принятия решений о целесообразности и оптимальных сроках защитных мероприятий, оценки биологической эффективности проведенных мероприятий.

В строгом определении оценки численности являются показателями популяционного уровня организации, отдельными для каждого конкретного вида насекомых. Однако в практике защиты растений допустимы общие оценки для групп близких видов, рассматриваемых в рамках единых вредоносных объектов (например, проволочники, ложнопроволочники и хрущи; хермесы, тли и клещи). Учет и оценку численности следует вести дифференцированно по разным стадиям развития насекомых.

Обычными мерами численности служат различные оценки плотности (относительной численности) популяций, выражаемые средним числом особей учитываемого объекта на стандартную единицу учета – 1 м², одно растение или его учетную часть (лист, погонный метр ветвей), 100 взмахов сачком, одну ловушку за сутки (за неделю) и др.

Применяемые методы оценки численности вредителей должны удовлетворять основным статистическим требованиям по репрезентативности и точности, что обеспечивается, прежде всего, использованием стандартизированных и научно обоснованных методов отбора проб и достаточным количеством повторностей. Например, количество учетных площадок при обследовании полевых культур и лесных пород составляет обычно не менее 10, количество пробных растений или их частей – не менее 100 (при учетах в лесных ценозах – часто не менее 200 деревьев), количество взмахов энтомологическим сачком при обследовании сельскохозяйственных угодий методом кошения – также не менее 100. Более конкретные нормы указываются в методических руководствах по учету численности вредителей лесных пород и сельскохозяйственных культур.

Ввиду значительной неоднородности пространственного распределения насекомых, учетные маршруты и пробы должны охватывать различные части обследуемого участка. Идеальным считается полностью рендомизированное размещение проб, определяемое по таблице случайных чисел. Однако вследствие некоторой технической сложности этой процедуры в полевой практике обычно используют регулярное размещение. На маршрутах различной формы (линейных – краевых и центральных, диагональных, зигзагообразных, шахматных) в зависимости от характера угодий через равномерные расстояния (50 м) делают пробы, которыми могут служить закладываемые пробные площадки, просматриваемые подряд группы растений, серии взмахов энтомологическим сачком и т. д. Такая схема проведения учетов при необходимости может дать возможность получить дифференцированные оценки численности для разных частей обследуемых угодий.

Применение тех или иных методов учета зависит от особенностей учитываемых насекомых (или других беспозвоночных), обследуемых растений и характера угодий. Далее приведены наиболее распространенные в сельскохозяйственной полевой практике методы учета.

Визуальный метод – глазомерное обнаружение и подсчет насекомых на пробных площадках (1 м²) либо пробных растениях или их учетных частях (на стволах, побегах, стеблях, листьях, хвоинках). Визуально учитывают насекомых, живущих открыто на надземных частях растений, доступных невооруженному глазу, имеющих умеренную активность и находящихся в не слишком густой растительности. Визуально учитывают также заметные яйцекладки на растениях (клопов, листоедов, совок, пядениц) и открыто

живущих личинок (саранчовых, клопов, личинок листоедов, гусениц бабочек, ложногусениц пилильщиков и др.). Помимо численности определяют другой важный показатель – степень заселения растений насекомыми (%). Иногда при большой численности насекомых пользуются условными, балльными оценками заселения. Некоторых вредителей учитывают на 1 погонный метр ветвей. Слишком мелких вредителей (например, клещей) учитывают с помощью лупы, ручной либо бинокулярной, – в лаборатории, на отобранных пробах растений.

Метод почвенных раскопок используется для учета почвообитающих насекомых, а также развивающихся или зимующих в почве отдельных стадий их развития. Обычно закладывают пробные площадки по 0,25 м², в пределах которых лопатой послойно (по 5–10 см) снимается почва, тщательно перебирается на покрытия (полиэтиленовая пленка, брезент и др.) с подсчетом обнаруженных насекомых. Глубина раскопок определяется биологией учитываемых объектов и указана в методических руководствах. Например, при учете кубышек (яйцекладок) саранчовых или зимующих в коконах гусениц лугового мотылька, достаточно просмотреть верхний слой почвы толщиной 10 см, а в наиболее распространенных раскопках проволочников и ложнопроволочников (личинок жуков щелкунов и чернотелок) необходимая глубина – до 30 см. Мельчайших вредителей (например, некоторых нематод) учитывают в мелких пробах, отбираемых почвенным буром диаметром 5 см и детально анализируемых в лаборатории. Итоговые оценки численности вредителей рассчитываются на 1 м².

Метод кошения сачком используется для учета открыто живущих на травянистых растениях насекомых, неудобных для визуального подсчета ввиду высокой активности, многочисленности, мелких размеров насекомых, либо вследствие загущенной растительности. В учете применяют стандартный энтомологический сачок для кошения (диаметр обруча – 30 см, длина мешка – 60 см, длина ручки – 1 м; мешок из прочной, но легкой ткани – мельничной газ, бязь и др.). Учетчик с каждым шагом делает перед собой непрерывные полукружные взмахи сачком, проводя нижнюю часть обруча в верхнем ярусе растительности. После пробной серии взмахов (10–25) насекомых стряхивают на дно сачка, которое перехватывают и помещают в морилку (баночку с ваткой, пропитанной эфиром или ацетоном). Через 10–15 мин. обездвиженных насекомых вытряхивают на покрытие, разбирают по видам и подсчитывают. Можно также укладывать сборы каждой пробы в отдельный бумажный пакет, оставляемый в морилке, для более тщательного их анализа в лаборатории. Таким способом обычно учитывают блошек на сплошных посевах, злаковых мух, иногда тлей, клопов слепняков, мелких долгоносиков, пилильщиков и др. При учете насекомых на деревьях и кустарниках можно применять кошение по невысоким ветвям, либо стряхивание насекомых в сачок. Итоговая оценка выражается числом насекомых на 100 взмахов сачком.

Метод стряхивания с растений производится чаще всего при учете численности некоторых долгоносиков и гусениц. Наиболее часто насекомых стряхивают на энтомологический экран или в сачок с 10 модельных деревьев (по четыре отрезка ветвей длиной 0,5 м на каждом дереве) в момент их низкой активности (весной при прохладной погоде). Метод стряхивания можно применять и для учета численности некоторых других мелких вредителей. Для учета гусениц различных шелкопрядов применяют метод околата. Застылают пологом площадку в пределах проекции кроны, затем вырубает бревно длиной около 2 м и толщиной 18–24 см, приставляют его к стволу нижним концом, а верхним ударяют 8–10 раз по стволу дерева. От сотрясения ветвей гусеницы сваливаются на полог, где их собирают и подсчитывают.

Методы учета численности скрытноживущих вредителей применяют для учета находящихся внутри растений личинок насекомых. На маршруте, в пределах учетного отрезка, подряд отбираются растения или их учетные части (побеги, стебли, листья, соцветия, плоды).

Отобранные образцы аккуратно вскрывают с помощью бритвы или препаровальной иглы и просматривают, подсчитывая обнаруженных насекомых. Если внутренние повреждения сопровождаются заметными наружными симптомами, в пробе можно выделять и вскрывать только поврежденные образцы. В этом учете, помимо численности насекомых, определяют долю (%) поврежденных растений. Таким способом учитывают личинок злаковых мух, гусениц стеблевого кукурузного мотылька, личинок стеблевых хлебных пилильщиков, личинок долгоносиков – стеблевого капустного скрытнохоботника, клеверного семяеда и др. Для обнаружения слишком мелких вредителей, таких как нематоды, пробы или препараты растений просматривают на увеличении, в лаборатории. Итоговая оценка выражается числом насекомых на 1 (или 10, 100) пробных растений или их частей.

Методы учета численности насекомых с использованием ловушек. Ловушки для насекомых, бесприманочные либо с различного рода приманками, используют в тех случаях, когда другие методы учета не дают удовлетворительных результатов. При этом, помимо повторностей, соблюдают стандартные учетные сроки экспозиции ловушек, с регулярным их осмотром, учетом сборов и обслуживанием. Оценивают среднюю численность насекомых на одну ловушку за стандартный период (сутки, неделю). Далее приведены наиболее распространенные виды ловушек.

• 1) *Почвенные ловушки, или ловушки Барбера.* Бесприманочные ловушки, предназначенные преимущественно для учета наземных насекомых (например, жужелиц, чернотелок, некоторых долгоносиков и др.). Распространенная форма – стандартной емкости (0,5–1 л) гладкостенные сосуды (цилиндры, банки, стаканчики), вкапываемые вровень с поверхностью почвы. На дно обычно наливают фиксирующую жидкость (раствор формалина, уксусной кислоты или поваренной соли). От заливания осадками ловушки защищают крышевидными укрытиями.

• 2) *Цветовые ловушки* основаны на эффекте привлечения некоторых насекомых определенным цветом. Для учета тлей и белокрылок используют желтые ловушки, для пшеничных галлиц – оранжевые, для капустных мух – серые, для трипсов – голубые и синие, для плодовых пилильщиков – белые. Часто используют цветоловушки – цветные экраны (из пластика или ламинированного картона) с клеящей поверхностью.

Другая форма ловушек – ловушки Мерике, применяемые для учета крылатых тлей. Они представляют собой пластиковые ванночки желтого или оранжевого цвета с водой, выставляемые на шестах на уровне верхних частей растений.

3) *Пищевые ловушки.* Среди распространенных ловушек этого рода – корытца с бродящей патокой: металлические стандартные корытца, куда добавляют разведенную забродившую патоку и дрожжи. Предназначены для учета имаго некоторых совок.

4) *Феромонные ловушки* основаны на использовании искусственных аналогов половых феромонов – биологически активных сигнальных веществ, выделяемых самками некоторых видов насекомых для привлечения самцов своего вида. Ловушки представляют собой разнообразной формы легкие картонные или пластиковые конструкции (домики, трапеции, цилиндры и др.) с внутренней клеящей поверхностью, выставляемые на шестах в поле или развешиваемые на деревьях в лесу, парке или саду. Также применяют бесклеевые ловушки, в которых насекомые отлавливаются в приемники (резервуары) различной конструкции. В ловушку помещается диспенсер – источник синтетического феромона, привлекающий насекомых определенного вида и пола (наиболее часто – самцов). Эти ловушки высоко видоспецифичны. Наиболее широко они применяются для мониторинга разных видов листоверток, совок, шелкопрядов, а также для некоторых видов огневков, усачей, златок, щелкунов и др.

2.4.7. Определение выносливости селекционного материала 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, устойчивых 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.

2.4.7.1. 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 степень поражения. Учет поражаемости при помощи шкал (эталонных) 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 иммунитета, 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 сноповой 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. 16.

Таблица 16. 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 пятибалльную 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, посеvy категорий ОС (П-1, П-2, Р-1, РННС), ЭС (Р-2, суперэлита, элита), 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. 17.

Таблица 17. Допустимые нормативы зараженности семенных посевов головней, %, не более

Виды головни	Культура	В посевах категории ОС, ЭС и в 1 и 0-ой репродукции зараженность семян головней не допускается	3-я репродукция	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 шкале.

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. 18.

Таблица 18. 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, офиоболезную 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 кушения. 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. 2).

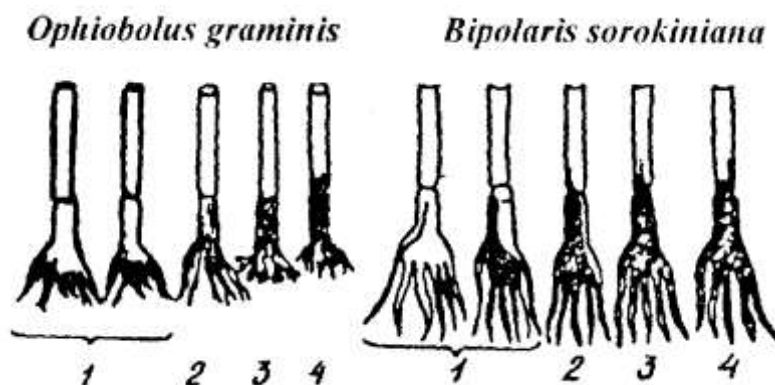


Рис. 2. Степень поражения зерновых корневыми гнилями.

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 офиоблезной 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 полосами 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. 19.

Таблица 19. 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 гельминтоспориума 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 полоску 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 ¼ длины, возможно побурение колеоптиле или появление штрихов на стебельке и первой пластинке, проростки развиваются нормально;

3 – побурение, занимающее более ¼ 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 фондов. 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. 20.

Таблица 20. 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
5	76–100

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. 21.

Таблица 21. Соотношение степени фитофтороустойчивости 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. 3).

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. 22.

Таблица 22. 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

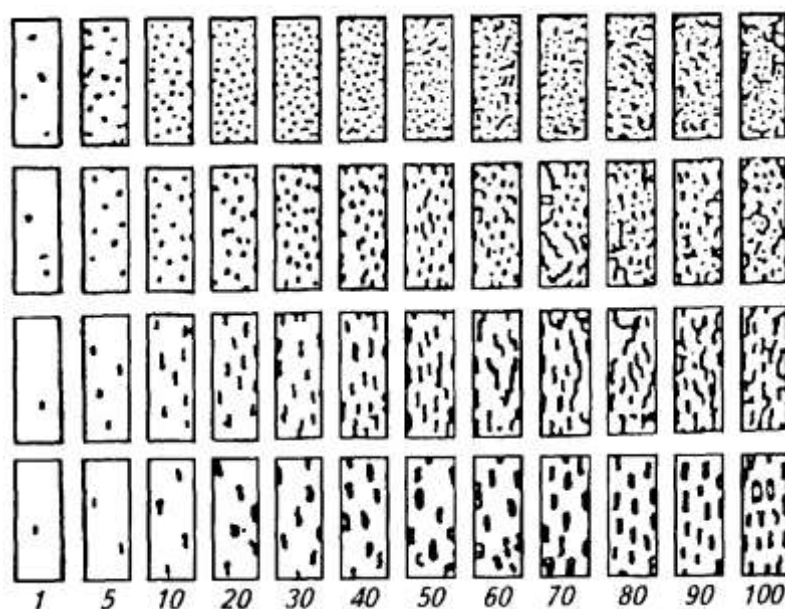


Рис. 4. Шкала для оценки степени поражения злаков различными видами ржавчины (по Петерсону и др.).

Шкала Стэкмена и Левина для оценки типа иммунности

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

2.4.7.2. 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 механизмы 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 плодоярки.

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

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

Гороховая плодоярка – 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. 24.

Таблица 24. 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 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 влагалище 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 влагалища колосом.

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

Результаты анализа запишите по форме табл. 25.

Таблица 25. Повреждаемость сортов яровой пшеницы зеленоглазкой

Сорт, сортообразец	Всего стеблей	Здоровых стеблей	Поврежденных стеблей			Общее повреждение, %	Устойчивость
			б	в	г		

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 различной. 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. 26.

Таблица 26. Пораженность сортов и сортообразцов картофеля колорадским жуком

Сорт, сортообразец	Поражено, % по баллам	Средняя степень повреждения

2.4.7.3. 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 называются коэффициентами вредоносности.

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

Для определения выносливости (толерантности) используют следующую формулу:

$$B = \frac{V_{\phi}}{V_{\kappa}} \cdot 100,$$

где B – выносливость, %;
 V_{ϕ} – урожай зерна с одного растения (или единицы площади) на инфекционном фоне, г;
 V_{κ} – урожай зерна с одного растения (или единицы площади) в контроле, г.

Для выявления показателя (B) учитывают урожай испытываемых 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

2.4.8. Инфекционная нагрузка и методы ее определения

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 бесменном 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.

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 телиоспор твердой головки пшеницы.

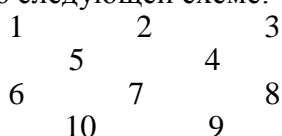
Цель задания: определить инфекционную нагрузку телиоспор твердой головки пшеницы на одно зерно.

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, заспороженные телиоспорами возбудителя твердой головки 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. 29 и определяют среднее количество спор из десяти полей зрения микроскопа.

Таблица 29. 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 A – среднее число спор в одном поле зрения;

K – 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. 30.

Таблица 30. Инфекционная нагрузка телиоспор возбудителя твердой головки 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 °С) 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. 31.

Таблица 31. 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^х). 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.

2.4.9. Создания инфекционного фона путем инокуляции посевного и посадочного материала

При оценке устойчивости многих культур к болезням (если патоген может передаваться с семенным материалом) проводят искусственное заражение или заsporение 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 спорного 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. Заспоренные 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 высевается 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 грибницу, которая проникает в завязь. Достигнув завязи, грибок приостанавливает свое развитие. Зерно формируется нормально и 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 (инокуляции)* пыльной головки 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 заспорение 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. 5).

Суспензию спор пыльной головки 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

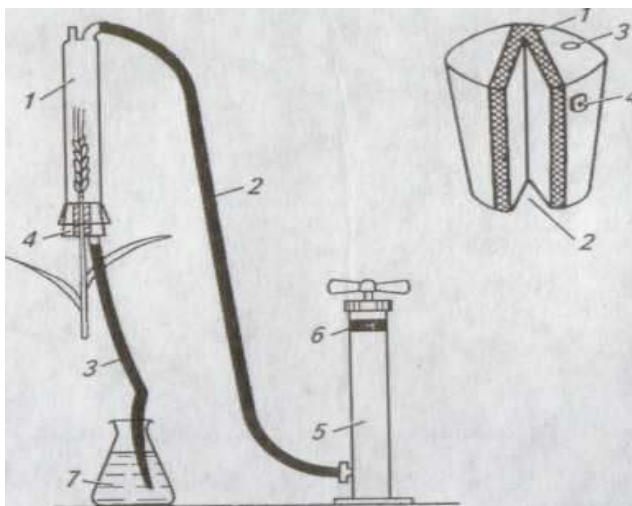


Рис. 5. Вакуум-прибор для инокуляции пшеницы и ячменя возбудителем пыльной головки (конструкция В.И. Кривченко):

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 оседают 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. 33.

Таблица 33. Поражение зародышей зерна пыльной головней

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

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 обжиг 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 следующей 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. 34.

Таблица 34. Устойчивость сортов картофеля к черной ножке

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

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 препаративной 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, равной 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. 35.

Таблица 35. Устойчивость селекционного материала картофеля к черной ножке

Сортообразец	Площадь загнившей зоны, мм ²	Характер устойчивости

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, вначале 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.

Результаты анализа оформите в табл. 36.

Таблица 36. Зараженность семян селекционного материала ячменя возбудителем сетчатой пятнистости

Сорт	Зараженность семян по пробам, %

2.4.10. Создание инфекционного фона путем заражения вегетирующих растений

2.4.10.1. 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 инокулом 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 настоев 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 неконтактозными 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 урениоспорами; растения сортообразцов, выращенные в вегетационных сосудах до появления второго листа; тальк; приспособления для создания влажной камеры; пульверизатор.

Урениоспоры многих видов ржавчины собирают с районированных сортов металлическими циклонами, смонтированными с пылесосом. Затем урениоспоры очищают от механических примесей, просушивают, запаивают в стеклянные ампулы и хранят при температуре 3–5 °С. Хранятся урениоспоры недолго. Их жизнедеятельность падает после полугода до 40 %. Накопление урениоспор 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 урениоспор. Для этого урениоспоры 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 инокулома. Используют для инокуляции растения, высеянные в вегетационные сосуды или ящики, в период появления второго листа. Готовят суспензию урениоспор 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 урениоспор приступают к анализу результатов заражения.

Для определения устойчивости сортообразцов пшеницы к бурой ржавчине используйте комбинированную шкалу, предложенную Т.Д. Страховым (рис. 6).

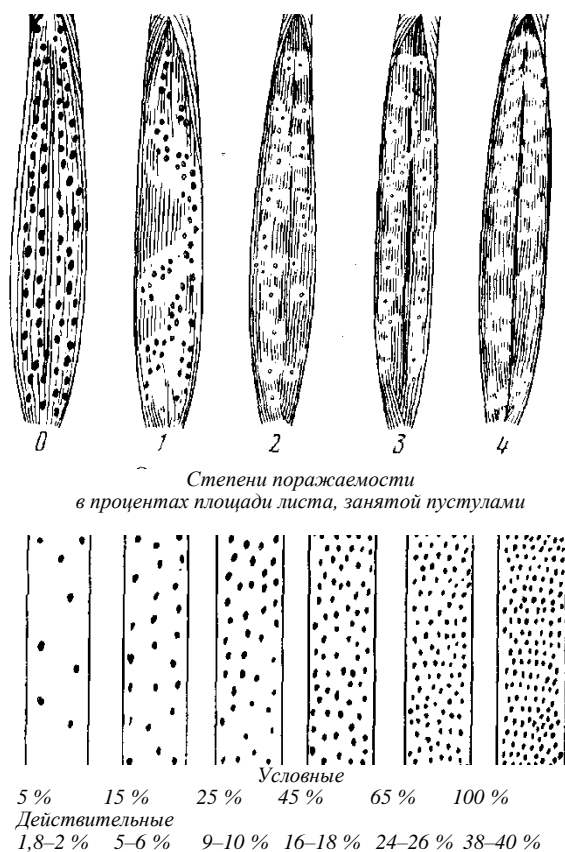


Рис. 6. Комбинированная шкала Т.Д. Страхова.

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

Даем описание шкалы иммунитета. 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.

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 изменений сортового 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.

Шкала иммунитета (по Т.Д. Страхову)

Тип иммуности	Признаки, характеризующие цифровые показатели иммунности
0	Отсутствие признаков иммунности. Пустулы ржавчины крупные, бархатистые, легко порошачиятся, 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 иммунности. При этом типе иммунности некрозы могут вовсе отсутствовать. Высокоустойчивые (иммунные) сорта

Результаты заносят в табл. 38.

Таблица 38. 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 свежесобраный 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.

2.4.11. Методы инфицирования почвы при создании инфекционных фонов

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 борозды – 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 сортообразца. 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) сортообразцов 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. 8).

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 высевается 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;

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

2 – у основания зародышевых корешков побурение не более ¼ их длины, возможно побурение колеоптиле, стебельков и первых пластинок. Проростки развиваются нормально;

3 – побурение более ¼ 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).

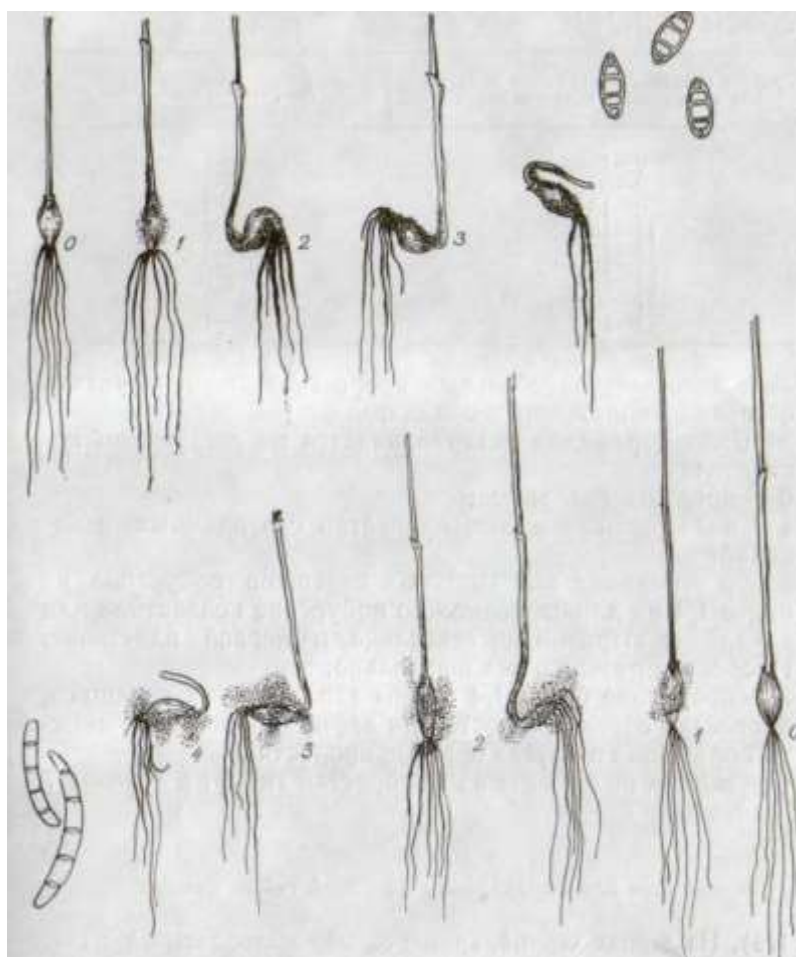


Рис. 8. Признаки поражения проростков корневой гнилью:
вверху – гельминтоспориозная гниль, *внизу* – фузариозная корневая гниль

Результаты учета оформляют в табл. 40.

Таблица 40. Пораженность всходов гельминтоспориозной корневой гнилью

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

2.4.12. Методы создания инвазионных 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, расстройстве пищеварения, снижении активности питания и вредоносности, удлинении сроков развития, формировании мелких и недоразвитых особей, понижении 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 испытуемые растения.

Задание 1. Выделить инвазийный материал для оценки устойчивости сортов картофеля к стеблевой нематоде (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 посадки. Если на растении не сохранилось ни одной особи из числа посаженных, 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. 41.

Таблица 41. Результаты заражения сортов пшеницы злаковой тлей

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

2.4.13. Составить модель сорта, характеризующуюся комплексной устойчивостью к болезням и вредителям с указанием перечня доноров устойчивости, методов передачи признака и устранения нежелательных признаков, сцепленных с признаком устойчивости

Модель сорта – это научный прогноз, показывающий селекционеру, каким должен быть сорт и его отдельные признаки при выращивании в заданных условиях возделывания, параметры которого наилучшим образом удовлетворяют требованиям, предъявляемым производством к конкретной культуре.

По мнению В.А. Кумакова, всесторонне разработанная модель должна включать: 1) характеристику условий выращивания, для которых создаётся модель, с доказательством реальности планируемого уровня урожайности; 2) описание всех селекционно-значимых признаков; 3) доказательства правильности (перспективности) выбранных параметров признаков; 4) генетический анализ признаков; 5) указания на доноров важнейших признаков.

Не следует отождествлять понятие «модель» с перечнем требований, предъявляемых к сорту. Модель сорта – это научный прогноз, который должен быть обоснован (пример рис. 9).

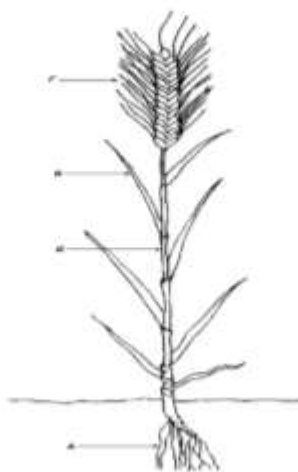


Рисунок 9. Модель сорта яровой пшеницы:
А – небольшое число зародышевых корешков; Б – прочный короткий стебель без кушения (монопобег);
В – несколько мелких прямостоячих листьев; Г – крупный прямой колос с остями и многочисленными цветками

Параметры модели (идеала сорта) разделяют на три группы:

1) признаки продуктивности (фотосинтез, транспорт веществ, конкуренция растений в посеве). Эти признаки играют ведущую роль в оптимальных условиях (сорта Мексики, США, Германии);

2) признаки устойчивости к стрессам (климат, болезни, вредители и др.) определяют величину урожая (Беларусь, Россия, Казахстан) и повышают урожай на фоне неблагоприятных факторов;

3) признаки, связанные с требованиями к технологии возделывания (пригодность к механизированной уборке, скороспелость) и переработки урожая (хлебопекарные качества, лёжкость при зимнем хранении и др.).

Основные факторы, формирующие модель: 1) агроэкологические условия – соответствие сорта экологическим ресурсам предполагаемой природно-климатической зоны его распространения и агротехническим условиям возделывания; 2) достижения селекции и смежных с ней наук; 3) технология возделывания; 4) требования народного хозяйства (требования пищевой и перерабатывающей промышленности, исторически сложившиеся требования к сорту и т. д.); 5) возможности культуры.

Исходным пунктом конструирования модели является стандартный коммерческий сорт, наиболее успешный в зоне действия селекционера. Описание этого сорта дополняется перечнем параметров, которые должны быть улучшены у создаваемого сорта.

Чтобы составить модель сорта, необходимо: 1) установить признаки сорта, которые являются результатом взаимодействия его с окружающей средой; 2) определить признаки сорта, обусловленные взаимодействием растений друг с другом (аутоконкуренция); 3) выяснить потребности товарного рынка.

Перед созданием модели селекционер изучает почвенно-климатические условия региона, рассматривает материалы по местным сортам, данные сортоучастков и селекционных учреждений региона. Кроме того, селекционер анализирует свой опыт и обобщает передовой опыт производства, изучает литературные источники по биологии селектируемой культуры, проводит экстраполяцию имеющихся тенденций развития признаков на перспективу, анализирует связи признаков и строит математические модели продукционного процесса.

Все признаки и свойства растений, планируемые в модели, должны быть теоретически и экспериментально обоснованы. Экспериментальное обоснование моделей сортов строится на сравнительном изучении существующих сортов, изогенных линий и гибридных популяций.

