

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ**

**СБОРНИК
МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ
ПО ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ**

С.-Петербург, 1998

Ответственные за выпуск:
академик-секретарь Отделения защиты растений
РАСХН В.А.Захаренко,
академик РАСХН К.В.Новожилов
канд. с.-х. наук Н.Р.Гончаров

Редакционная коллегия:

К.В.Новожилов (главный редактор),
О.С.Афанасенко, В.Н.Буров, Н.А.Вилкова, Ю.И.Власов,
К.Е.Воронин, Н.Р.Гончаров, И.Я.Гричанов, В.Р.Жаров,
А.Ф.Зубков, М.М.Левитин,
В.А.Павлюшин (зам. гл.редактора),
Д.С.Переверзев (секретарь), Т.М.Петрова,
Г.И.Сухорученко, В.И.Танский, С.Л.Тютерев

© Всероссийский НИИ защиты растений (ВИЗР)

На Всероссийском съезде по защите растений (г. Санкт-Петербург, декабрь 1995 г.) была принята принципиально обновленная концепция развития защиты растений, ориентированная на всестороннюю экологизацию фитосанитарных мероприятий и повышение устойчивости агробиоценозов к воздействию комплекса вредных биотических факторов. Это предопределяет необходимость проведения цикла поисковых и технологических исследований нового уровня.

Помимо правильного выбора приоритетов в программе исследований в решении общей задачи фитосанитарной оптимизации отечественного растениеводства в новых организационных и экономических условиях развития сельскохозяйственного производства России, крайне важным является надлежащая методологическая и методическая оснастка проводимых экспериментальных исследований с учетом достигнутого международной фитосанитарной наукой и смежными областями наук уровня.

Следует констатировать, что, к сожалению, в настоящее время ощущается "голод" в методических разработках и снижение масштаба исследований по разработке методических вопросов проведения разнообразных экспериментов в области фитосанитарии, вызванные трудностями последнего периода.

Учитывая это, а также наличие выполненных в институтах отделения защиты растений РАСХН методических работ по постановке исследований и работ по практическому использованию научных достижений, представляется целесообразной их публикация для того, чтобы "проинвентаризировать" законченные разработки, ознакомить научную общественность с имеющимся опытом в этой важной проблеме.

Основу данного сборника, подготовленного по инициативе отделения защиты растений, составили работы, выполненные во Всероссийском научно-исследовательском институте защиты растений (ВИЗР) и в некоторых других институтах.

Представленные публикации можно подразделить на 7 групп.

В первую группу вошли статьи, раскрывающие накопленный опыт последних лет по методическим принципам проведения фитодиагностики по различным видам болезней (статьи В.И.Танского с соавторами, Ю.И.Власова с соавторами, Н.П.Шишиловой с соавторами, А.С.Якушевой и А.И.Самошкиной, В.И.Якуткина, Л.И.Берестецкой и Т.Е.Вахрушевой).

Во-вторую группу работ включены статьи, в которых раскрываются новые методы энтомологических исследований (статьи Т.Я.Васильевой с соавторами, А.Б.Верещагиной, Е.В.Логина и В.А.Павлюшина).

Значительная часть работ относится к различным аспектам проведения исследований по иммунитету растений (статьи А.А.Макарова с авторами, Н.Н.Гусевой и Т.П.Градобоевой, О.С.Афанасенко, Л.А.Михайловой с соавторами, А.А.Аверьянова с соавторами, В.А.Колобаева и др.).

Статьи А.П.Сорокиной, Ю.И.Мешкова отражают новые сведения по вопросам выявления некоторых энтомофагов, их разведения и применения.

Вопросам изучения новых феромонных ловушек посвящены статьи А.П.Сазонова с соавторами, И.Я.Гричанова и В.К.Ажбенова.

В шестую группу статей входят работы по методике проведения исследований в области химического метода (статьи О.В.Сундукова и Р.Г.Парновой, Н.Н.Семеновой с соавторами, Е.П.Мокроусовой и И.Н.Глазуновой, Т.Б.Дорофеевой).

Две важные работы методического характера Н.Р.Гончарова и О.П.Каширского посвящены определению экономической и энергетической оценки мероприятий по защите растений в условиях переходного периода в экономике страны.

Конечно, данной публикацией не исчерпывается весь арсенал выполненных исследований методического характера. Хочется надеяться, что данный сборник окажет определенную помощь исследователям, проводящим экспериментальную работу по различным аспектам современной фитосанитарии.

Академик-секретарь
отделения защиты растений РАСХН В.А.Захаренко

Академик РАСХН К.В.Новожилов

ФИТОСАНИТАРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ИНТЕГРИРОВАННОЙ ЗАЩИТЕ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР (Методические рекомендации)

В.И.Танский, М.М.Левитин, Т.И.Ишкова, В.И.Кондратенко

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

Совершенствование интегрированной защиты растений предусматривает переход от мероприятий по снижению численности отдельных вредных видов к управлению динамикой их популяций с целью оптимизации фитосанитарного состояния агроценозов. Для решения этой проблемы в системах защиты растений решающую роль отводят экологическому мониторингу развития вредных организмов с переходом от "жесткой" схемы химических обработок к "жесткой" схеме учетов фитосанитарного состояния посевов. При таком подходе защита растений на каждом поле уподобляется лечению организма, а организация этой работы - санитарно-гигиенической профилактике. Соответственно вся информация, собираемая в целях рационализации защиты растений, называется фитосанитарной диагностикой.

Назначение фитосанитарной диагностики состоит в том, чтобы без излишних затрат, но с достаточной полнотой собрать информацию, характеризующую: фенологию и динамику численности популяций вредных и полезных видов в агроценозах; фенологию и состояние сельскохозяйственных растений; поврежденность растений вредителями и пораженность болезнями; ожидаемые и фактические потери урожая; метеорологические условия года; своевременность и качество агротехнических мероприятий. Обработка полученных материалов должна быть нацелена не только на фиксацию состояния учитываемых объектов и процессов, но и на прогноз их развития, так как быстротечная изменчивость состояния агроценозов поддается управлению только при возможности предвидеть эти изменения.

Учитывая, что конечная ценность собираемой информации зависит от возможности сопоставления данных по сезонам, годам и регионам, важнейшим условием организации фитосанитарной диагностики является соблюдение единообразия используемых методов ее сбора, на что направлены предлагаемые методические рекомендации.

СИСТЕМЫ НАБЛЮДЕНИЙ ЗА РАЗВИТИЕМ ВРЕДНЫХ И ПОЛЕЗНЫХ ОРГАНИЗМОВ И СОСТОЯНИЕМ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Для характеристики фитосанитарного состояния посевов необходимы систематические учеты, охватывающие основные фазы развития сельскохозяйственных растений в течение всего вегетационного периода. Учеты организуют следующим образом. Для каждого поля составляют полную характеристику, для чего заводят паспорт поля, в котором отражают следующие данные: № поля, площадь, тип почвы, предшественник, сельскохозяйственная культура, сорт, проведенные агротехнические мероприятия, химические обработки, урожайность. Периодические учеты на этих полях предусматривают сбор данных в течение всего вегетационного периода. При этом учитывают:

- состояние сельскохозяйственной культуры (фенология, густота стеблестоя, физиологические и биохимические характеристики),
- вредных и полезных членистоногих (видовой состав, фенология, плотность популяций, степень повреждения сельскохозяйственных растений, потери урожая),
- болезни растений (видовой состав, фенология, распространение, интенсивность развития, потери урожая),
- сорняки (видовой состав, фенология, проективное покрытие, обилие, высота, масса, связь с урожаем).

При организации учетов учетные точки обычно располагают по диагонали участка через 20-50 шагов в зависимости от размера поля. Учеты приурочивают к фазам развития культурных растений, причем желательны комплексные учеты, когда одновременно учитывают все вредные организмы, состояние растений, их поврежденность и т.д.

Рекомендуется следующая очередность наблюдений. Прежде всего оценивают проективное покрытие почвы сорняками и сельскохозяйственными растениями, затем учитывают насекомых и поврежденность ими растений, оценивают интенсивность развития болезней, после чего устанавливают густоту посева и видовой состав сорняков.

При анализе урожая определяют густоту стеблестоя, среднюю высоту стебля, длину колоса, количество колосков, зерен и массу зерна в колосе и на площадке, массу 1000 зерен.

Сроки (фазы онтогенеза растений) и объекты учетов для посевов озимой пшеницы, озимой ржи, яровой пшеницы, ячменя и овса представлены в таблицах 1-5, вслед за которыми приведены методы учета вредных организмов и оценки состояния сельскохозяйственных растений. В таблицах приведены основные периоды проведения учетов, в большинстве связанные с фазами развития растений. Однако в зависимости от зональных особенностей, определяющих ви-

довой состав вредных организмов, в ту или иную фазу учет можно не проводить. Тем не менее на озимой пшенице рекомендуется, как правило, два комплексных обследования осенью и пять в весенне-летний период. На яровой пшенице необходимы комплексные учеты перед посевом, в фазе всходов - кущения, выхода в трубку и колошения - цветения. При наличии зерновой совки ее учитывают в период налива зерна - начала молочной спелости. Соответственно можно усовершенствовать сроки обследований на других культурах.

Таблица 1. Сроки наблюдений за вредными и полезными организмами и состоянием посевов озимой пшеницы

Фазы развития пшеницы	Вредные и полезные организмы	Фазы развития вредителей, признаки развития болезней	Анализ состояния посева
До посева	Озимая совка Щелкуны Хлебные жуки	Гусеницы Личинки Личинки	-
Всходы-3-й лист	Озимая совка Щелкуны Хлебные жуки Злаковые мухи Хлебная жужелица Корневые гнили	Гусеницы Личинки Личинки Имаго Личинки Побурение, нитриховатость колеоптиля, зародышевых и узловых корней	Определение полевой всхожести и густоты стеблестоя
Кущение - прекращение вегетации осенью	Злаковые мухи Мучнистая роса Бурая ржавчина Септориоз Сорняки (все виды)	Личинки Белый, желтовато- или грязновато-серый мучнистый налет на листьях Ржаво-бурые уредопустулы на листьях На листьях и стеблях пятна желто-коричневые с ободком или без ободка, неопределенной формы или линейные, узкие	Определение количества развитых побегов и биомассы растений пшеницы
Возобновление вегетации весной	Снежная плесень Корневые гнили	На листьях белый паутинистый и серый ватообразный налет Побурение и загнивание нижней части стебля и корней	Определение к-ва перезимовавших растений пшеницы и их биомассы
Кущение	Подгрызающие совки Энтомофаги подгрызающих совок Злаковые мухи Хлебная жужелица Пьявица Септориоз Бурая ржавчина Мучнистая роса Сорняки (все виды)	Гусеницы Яйцееды. Паразиты гусениц и куколок Личинки, пупарии Личинки Жуки На листьях и стеблях пятна желто-коричневые с ободком или без ободка, неопределенной формы или линейные, узкие Ржаво-бурые уредопустулы на листьях Белый, желтовато- или грязновато-серый мучнистый налет на листьях	Листовая диагностика. Определение к-ва продуктивных стеблей

Выход в трубку	Вредная черепашка Энтомофаги вредной черепашки Хлебные клопики Пьявица Энтомофаги пьявицы Злаковые тли Энтомофаги злаковых тлей Мучнистая роса	Перезимовавшие клопы, яйца Паразиты клопов Имаго, личинки Жуки, яйца, личинки Яйцееды Имаго, личинки Хищники, паразиты	Тканевая диагностика. Определение биомассы растений пшеницы
	Бурая ржавчина Септориоз	Белый, желтовато- или грязновато-серый войлочный налет на листьях и стеблях Ржаво-бурые уредопустулы на листьях На листьях и стеблях пятна желто-коричневые с ободком или без ободка, неопределенной формы или линейные, узкие	
Колошение - цветение	Пьявица Злаковые тли Хлебные пилильщики Хлебный жук-кузька Бурая ржавчина	Личинки Имаго, личинки Имаго Жуки	Листовая диагностика. Определение биомассы растений пшеницы
	Мучнистая роса Септориоз Пиренофороз (желтая пятнистость)	Ржаво-бурые уредопустулы на листьях Белый, желтовато- или грязновато-серый войлочный налет на листьях На листьях и стеблях пятна желто-коричневые с ободком или без ободка, неопределенной формы или линейные, узкие Желто-коричневые пятна округлой или овальной формы одиночные или сливающиеся, вокруг пятен хлоротичная зона	
	Стеблевая ржавчина Корневые гнили	Темно-бурые пустулы, образующие линии Побурение прикорневой части стебля	
Формирование - наливание зерна	Вредная черепашка Злаковые тли Хлебный жук-кузька Пшеничный трипс Пыльная головня Фузариоз колоса Листовые пятнистости	Личинки Имаго, личинки Жуки Личинки Все части колоса кроме стержня превращены в черную споровую массу Обесцвечивание чешуй колосьев Пятна различной формы на листьях	Листовая диагностика. Определение биомассы растений пшеницы
Молочная и восковая спелость	Хлебный жук-кузька Вредная черепашка Хлебная жужелица Злаковые тли Хлебные пилильщики Бурая ржавчина	Жуки Личинки Жуки Имаго, личинки Личинки	Определение биомассы растений пшеницы
		Ржаво-бурые уредопустулы на листьях	

Перед уборкой (полная спелость)	Вредная черепашка	Имаго	Учет биологической продуктивности посева
	Энтомофаги вредной черепашки	Личинки в клопах	
	Стеблевая ржавчина	Темно-бурые пустулы, образующие линии	
	Фузариоз колоса	Налет на колосьях из бледно-розовых или оранжево-красных подушечек	
	Твердая головня	Колоски раздвинуты, вместо зерен - головневые мешочки	
	Сорняки (все виды)	-	
После уборки урожая	Хлебные пилильцы	Личинки в стерне	-
	Сорняки (все виды)	Семена, органы вегетативного размножения	

Таблица 2. Сроки наблюдений за вредными организмами и состоянием посевов озимой ржи

Фазы развития ржи	Вредные и полезные организмы	Фазы развития вредителей, признаки развития болезней	Анализ состояния посева
До посева	Озимая совка Щелкуны Хлебные жуки	Гусеницы Личинки Личинки	-
Всходы-3-й лист	Озимая совка Щелкуны Хлебные жуки Озимая муха	Гусеницы Личинки Личинки Яйца	Определение полевой всхожести и густоты стеблестоя
Кущение-прекращение вегетации осенью	Сорняки (все виды)	-	Определение количества развитых побегов и биомассы растений ржи
Возобновление вегетации весной	Снежная плесень Корневые гнили	Гибель и изреживание посева. Побурение листьев, белый паутинистый или серый ватообразный налет Побурение и загнивание нижней части стебля и корней	Определение количества и биомассы перезимовавших растений и стеблей ржи
Кущение	Озимая совка Энтомофаги озимой совки Злаковые мухи Мучнистая роса Сорняки (все виды)	Гусеницы Зараженные паразитами гусеницы и куколки Личинки, пупарии Белый, желтовато- или грязновато-серый войлочный налет на листьях	Листовая диагностика. Определение количества продуктивных стеблей
Выход в трубку	Мучнистая роса	Белый, желтовато- или грязновато-серый войлочный налет на листьях	Листовая диагностика. Определение биомассы растений ржи
Колошение - цветение	Буряя ржавчина Мучнистая роса Септориоз	Ржаво-бурые уредопустулы на листьях Белый, желтовато- или грязновато-серый войлочный налет на листьях На листьях и стеблях пятна желто-коричневые с ободком или без ободка, неопределенной формы или линейные, узкие	То же

	Ринхоспориоз	На листьях и листовых влагалищах пятна сначала водянистые голубовато-серые, затем светло-коричневые с узкой нечеткой коричневой каймой или без нее	
	Стеблевая ржавчина	Темно-бурые пустулы, образующие линии	
Формирование и налив зерна	Хлебный жук красун	Имаго	То же
Молочная и восковая спелость	Хлебный жук красун Спорынья Стеблевая головня	Имаго Вместо зерен черные склероции Полосы (трещины) на стеблях, из которых выступает масса спор	Определение биомассы растений ржи
Перед уборкой (полная спелость)	Бурая ржавчина Стеблевая ржавчина Фузариоз колоса Твердая головня	Ржаво-бурые уредопустулы на листьях Темно-бурые пустулы, образующие линии на стеблях Налет на колосьях из бледно-розовых или оранжево-красных подушечек Колоски раздвинуты, вместо зерен головневые мешочки	Учет биологической продуктивности посева
После уборки	Сорняки (все виды) Сорняки (все виды)	- Семена, органы вегетативного размножения	-

Таблица 3. Сроки наблюдений за вредными и полезными организмами и состоянием посевов яровой пшеницы

Фазы развития пшеницы	Вредные и полезные организмы	Фазы развития вредителей, признаки развития болезней	Анализ состояния посева
До посева	Щелкуны Хлебные жуки	Личинки Личинки	-
Всходы - 3-й лист	Щелкуны Хлебные жуки Злаковые мухи Хлебная полосатая блошка Мучнистая роса	Личинки Личинки Имаго Жуки Белый, желтовато- или грязновато-серый мучнистый налет на листьях	Определение полевой всхожести и густоты стеблестоя
Кущение	Пьявица Злаковые мухи Стеблевые блошки Вредная черепашка Энтомофаги вредной черепашки Корневые гнили Мучнистая роса	Имаго Личинки, пупарии Личинки Клопы, яйца Паразиты клопов, яйцееды Побурение и загнивание нижней части стебля и корней Белый, желтовато- или грязновато-серый мучнистый налет на листьях	Листовая диагностика. Определение количества продуктивных стеблей
Выход в трубку	Сорняки (все виды) Пьявица Энтомофаги пьявицы Злаковые тли Энтомофаги злаковых тлей	- Жуки, яйца, личинки Яйцееды Имаго, личинки Хищники, паразиты	Тканевая диагностика. Определение биомассы растений

	Мучнистая роса	Белый, желтовато- или грязновато-серый мучнистый налет на листьях	пшеницы
	Септориоз	На листьях и стеблях пятна желто-коричневые с ободком или без ободка, неопределенной формы или линейные, узкие	
	Бурая ржавчина	Ржаво-бурые уредопустулы на листьях	
Выколашивание	Пшеничный трипс	Имаго	-
Колошение - цветение	Пьявица	Личинки	Листовая диагностика.
	Злаковые тли	Имаго, личинки	Определение биомассы растений
	Энтомофаги злаковых тлей	Хищники, паразиты	пшеницы
	Хлебные пилильщики	Имаго	
	Хлебный жук-кузька	Жуки	
	Бурая ржавчина	Ржаво-бурые уредопустулы на листьях	
	Корневые гнили	Побурение прикорневой части стебля	
	Мучнистая роса	Белый, желтовато- или грязновато-серый войлочный налет на листьях	
Формирование - налив зерна	Пятнистости листьев	Пятна различной формы на листьях	Листовая диагностика.
	Злаковые тли	Имаго, личинки	Определение биомассы растений
	Вредная черепашка	Личинки	пшеницы
	Хлебные жуки	Жуки	
	Пшеничный трипс	Личинки	
	Фузариоз колоса	Налет на колосьях из бледно-розовых или оранжево-красных подушечек	
	Пятнистости листьев	На листьях пятна различной формы	
	Пыльная головня	Все части колоса, кроме стержня, превращены в черную споровую массу	
Молочная и восковая спелость	Вредная черепашка	Личинки	Определение биомассы растений
	Хлебные жуки	Жуки	пшеницы
	Злаковые тли	Имаго, личинки	
	Серая зерновая совка	Гусеницы	
	Хлебные пилильщики	Личинки	
	Бурая или желтая ржавчина	На листьях ржаво-бурые или светло-желтые уредопустулы	
Перед уборкой (полная спелость)	Вредная черепашка	Имаго, личинки	Учет биологической продуктивности посева
	Энтомофаги вредной черепашки	Личинки фазий в клопах	
	Твердая головня	Колоски раздвинуты, вместо зерен головневые мешочки	
	Стеблевая ржавчина	Темно-бурые пустулы, образующие линии на стеблях	
	Сорняки (все виды)	-	
После уборки урожая	Хлебные пилильщики	Личинки в стерне	-
	Серая зерновая совка	Гусеницы	
	Энтомофаги зерновой совки	Паразиты в гусеницах и куколках	
	Гранулез зерновой совки	Больные гусеницы	
	Сорняки (все виды)	Семена, органы вегетат. размножения	

Таблица 4. Сроки наблюдений за вредными и полезными организмами и состоянием посевов ярового ячменя

Фазы развития ячменя	Вредные и полезные организмы	Фазы развития вредителей, признаки развития болезней	Анализ состояния посева
До посева	Щелкуны Хлебные жуки	Личинки Личинки	-
Всходы - 3-й лист	Щелкуны Хлебные жуки Злаковые мухи Хлебная полосатая блошка Мучнистая роса	Личинки Личинки Имаго Жуки Белый, желтовато-серый мучнистый налет на листьях	Определение полевой всхожести и густоты стеблестоя
Кущение	Пьявица Злаковые мухи Стеблевые блошки Корневые гнили Мучнистая роса Сорняки (все виды)	Имаго Личинки, пупарии Личинки Побурение и загнивание нижней части стебля и корней Белый, желтовато-серый мучнистый налет на листьях	Листовая диагностика. Определение количества продуктивных стеблей
Выход в трубку	Пьявица Энтомофаги пьявицы Злаковые тли Энтомофаги злаковых тлей Мучнистая роса Пятнистости листьев	Жуки, яйца, личинки Яйцееды Личинки Хищники, паразиты Белый, желтовато-серый войлочный налет на листьях Пятна различной формы на листьях	Тканевая диагностика. Определение биомассы
Колошение - цветение	Пьявица Злаковые тли Энтомофаги злаковых тлей Стеблевая ржавчина Гельминтоспориозы: темно-бурый полосатый сетчатый Ризкспориоз Корневые гнили Мучнистая роса	Личинки Имаго, личинки Хищники, паразиты Темно-бурые продолговатые пустулы на стеблях и листьях На листьях коричневые овальные или продолговатые пятна с темной серединой На листьях темно-коричневые полосы, разрывающиеся вдоль жилок На листьях продолговатые бурые пятна с продольной и поперечной сеткой На листьях и листовых влагалищах пятна сначала водянистые голубовато-серые, затем светло-коричневые с четкой каймой Побурение прикорневой части стебля Белый, желтовато-серый войлочный налет на листьях	Листовая диагностика. Определение биомассы растений ячменя
Формирование - налив зерна	Злаковые тли Вредная черепашка Хлебные жуки Пятнистости листьев Фузариоз колоса Пыльная головня	Имаго, личинки Личинки Жуки Пятна различной формы на листьях. Обесцвечивание верхней части колоса. Налет розового или охряжевого цвета Все части колоса, кроме стержня, превращены в массу черных спор	Листовая диагностика. Определение биомассы растений ячменя

Молочная и восковая спелость	Вредная черепашка Хлебные жуки Злаковые тли Карликовая ржавчина	Личинки Жуки Имаго, личинки На листьях светло-желтые уредопустулы	Определение биомассы растений ячменя
Перед уборкой (полная спелость)	Вредная черепашка Энтомофаги вредной черепашки Твердая головня Стеблевая ржавчина Базальный бактериоз Сорняки (все виды)	Имаго, личинки Личинки фазий в клопах Колоски раздвинуты, вместо зерен - головневые мешочки Темно-бурые уредопустулы, образующие линии на стеблях Темно-коричневые колосковые чешуи. Почернение зерна (черный зародыш)	Учет биологической продуктивности посева
После уборки урожая	Овсяная нематода Сорняки (все виды)	Цисты в почве Семена, органы вегетативного размножения	

Таблица 5. Сроки наблюдений за вредными организмами и состоянием посевов овса

Фазы развития овса	Вредные и полезные организмы	Фазы развития вредителей, признаки развития болезней	Анализ состояния посева
До посева	Щелжуны Хлебные жуки	Личинки Личинки	-
Всходы - 3-й лист	Щелжуны Хлебные жуки Злаковые мухи	Личинки Личинки Имаго	Определение полевой всхожести и густоты стеблестоя
Кущение	Пьявица Злаковые мухи Сорняки (все виды)	Имаго Личинки, пупарии -	Листовая диагностика. Определение количества стеблей
Выход в трубку	Пьявица Энтомофаги пьявицы Злаковые тли Энтомофаги злаковых тлей Злаковые мухи Мучнистая роса	Жуки, яйца, личинки Яйцееды Личинки Хищники, паразиты Личинки, пупарии Белый, желтовато- или грязновато-серый войлочный налет	Тканевая диагностика. Определение биомассы растений овса
Выметывание метелок	Пьявица Злаковые тли Энтомофаги злаковых тлей Овсяной трипс Головня овса Гельминтоспориоз (красно-бурая пятнистость) Септориоз	Личинки Имаго, личинки Хищники, паразиты Имаго Все части цветка и завязь разрушаются, превращаясь в черно-оливковую споровую массу На листьях сначала бледно-желтые, затем бурые пятна с темно-красной каймой На листьях резко ограниченные красновато-бурые пятна, более темные в центре	Листовая диагностика. Определение биомассы растений овса

Формирование и налив зерна	Злаковые тли Корончатая ржавчина Стеблевая ржавчина	Имаго, личинки На листьях оранжевые овальные уредопустулы Темно-бурые уредопустулы, образующие линии на стеблях	Листовая диагностика. Определение биомассы растений овса
Молочная спелость	Шведская муха	Личинки в метелках	Определение биомассы растений овса
Перед уборкой	Сорняки (все виды)	-	Учет биологической продуктивности посева
После уборки урожая	Овсяная нематода Сорняки (все виды)	Цисты в почве Семена, органы вегетативного размножения	-

По результатам учетов прогнозируют дальнейшее развитие растений, способность их противостоять вредным воздействиям и ожидаемую продуктивность. На основании такого прогноза планируют мероприятия по сохранению урожая.

В текущем сезоне рекомендуемые учеты являются основой интегрированной защиты растений, так как позволяют оптимизировать фитосанитарное состояние агроценозов. Многолетнее применение этих учетов позволяет оценить изменения, происходящие в агроценозах под влиянием применяемой системы защиты растений.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ РАЗВИТИЯ ВРЕДНЫХ И ПОЛЕЗНЫХ ОРГАНИЗМОВ

При оценке фитосанитарного состояния посевов большое значение имеет надежность методов учета вредных и полезных организмов. В то же время большое разнообразие жизненных форм требует применения специфических методов учета. Ниже приведены методы учета наиболее опасных вредителей, болезней и сорняков зерновых культур.

Методы учета насекомых-фитофагов

Вредная черепашка. Обследования посевов на заселенность перезимовавшими клопами проводят на озимых культурах в начале выхода в трубку, на яровых - в начале кущения. Личинок учитывают дважды, первый раз - в конце колошения - начале цветения, второй - во время налива зерновок. Численность всех фаз развития черепашки определяют на площадках по 0.25 м² (50×50 см) из расчета 16 площадок на поле. На каждой площадке осматривают растения, поверхность почвы и растительные остатки, при этом подсчитывают количество клопов, личинок (по возрастам) и яиц.

Учеты рекомендуется проводить с 7 до 11 и с 16 до 19 часов.

Серая зерновая совка. Наблюдения за динамикой лета бабочек ведут с помощью корытец-ловушек, укрепленных на деревянном

шесте на высоте 1 м и выше в зависимости от высоты растений пшеницы. Приманкой служит бродящая жидкость (патока, раствор сахара с дрожжами и т.п.). Корытца выставляют по одному на поле в начале лета совки. Осматривают их ежедневно в утренние часы. На день корытца прикрывают крышкой, которую снимают после 19 часов. При выборке бабочек из корытца самок подсчитывают отдельно. Они легко отличаются от самцов и других совок по строению яйце-клада, который имеет вид сильно хитинизированных, с коричневой окраской щипчиков, подогнутых на нижнюю сторону брюшка. За динамикой лета совки можно проследить с помощью отлова самцов в феромонные ловушки, которые дают более надежные результаты, чем паточные корытца. Ловушки прикрепляют к заранее вбитым в землю кольшкам длиной 1.5-2.0 м, примерно на 20-30 см выше верхушек растений. С ростом пшеницы ловушки поднимают на соответствующую высоту. Горизонтальная ось ловушки должна совпадать с направлением господствующего ветра. В начале лета совки ловушки выставляют на подветренных краях полей, так чтобы запах феромона господствующим ветром сносился на поле. Отловленных самцов учитывают и удаляют из ловушки через каждые три дня, а в период массового лета - ежедневно. Замену капсулы с феромоном проводят через 10-15 дней.

Учет заселенности полей гусеницами совки проводят во время налива - молочной спелости зерна. Для этого в 10 местах поля срезают по 50 колосьев, которые помещают в мешочки. После двух суток просушки в сухом помещении колосья отряхивают над ситом с ячейками 0.5 см на лист белой бумаги. Всех обнаруженных гусениц подсчитывают и устанавливают их возрастной состав. После этого колосья вновь помещают в мешочки и оставляют еще на 3-4 дня, после чего колосья вновь отряхивают.

После уборки урожая проводят осеннее обследование полей с целью установления численности и состояния гусениц, уходящих на зимовку. Гусениц подсчитывают на площадках по 0.25 м² (50×50 см) в 20 местах поля. На площадках осматривают поверхность почвы, а затем поверхностный слой почвы перебирают руками. Устанавливают возрастной состав гусениц.

Хлебная жужелица. В августе на полях, планируемых под посев озимых культур по предшественнику зерновые колосовые, проводят учет всех фаз развития хлебной жужелицы. На посевах берут 10 почвенных проб по 0.25 м² (50×50 см) на глубину 30 см. Почву перебирают руками и подсчитывают количество жуков, личинок и яиц жужелицы. После появления всходов озимых поля обследуют несколько раз, проходя по краю поля и к его центру и учитывая характерные повреждения всходов личинками вредителя. Весной после возобновления вегетации в фазе кущения на посевах, где осенью выявлены повреждения растений, берут по 10 почвенных проб пло-

щадью 0.1 м² (33×33 см) на глубину 30 см. В пробах подсчитывают личинок по возрастам и вычисляют среднюю заселенность поля и возрастной состав личинок.

Хлебные жуки. Жуков учитывают во время массового лета, который может совпадать с разными фенофазами зерновых культур. Для учета в центре поля и в краевой полосе шириной 50-80 м выделяют по 20 площадок по 1 м² (глазомерно) и на них подсчитывают сидящих на колосьях жуков. Жуки остаются на посевах до конца восковой спелости, легко перемещаясь по полю и между полями, поэтому для определения средней плотности жуков на поле необходимо сделать 2-3 учета с интервалом 3-5 дней. По результатам этих учетов рассчитывают средневзвешенную плотность популяции жуков с учетом того, что на краевой полосе жуков всегда больше, чем в центре поля. Обследования следует проводить в теплые безветренные дни после 15 часов, когда основная масса жуков питается на колосьях. Личинок хлебных жуков учитывают весной с помощью почвенных проб площадью 0.25 м² (50×50 см) и глубиной 30 см. На поле берут 12 таких проб, почву тщательно просматривают, подсчитывают обнаруженных личинок и вычисляют их среднюю плотность.

Внутристеблевые вредители. Учет поврежденности посевов личинками злаковых мух и стеблевых блошек проводят в фазу полного кущения - начала стеблевания. На поле отбирают 10 проб по 20 растений или 16 полуметровых отрезков рядка (при обычном рядовом посеве это равно 1 м²). Растения выкапывают и тщательно анализируют. За влагалищами листьев могут быть обнаружены ложно-коконы и личинки гессенской мухи. Главные и боковые стебли вскрывают. При обнаружении личинки жука или бокового отверстия в основании стебля растения относят к поврежденным стеблевой блошкой. Если внутри стебля обнаружена личинка мухи или спиральный ход к узлу кущения, то это повреждение шведской или яровой мухами или зеленоглазкой. Затем подсчитывают процент повреждения растений и стеблей (главных и боковых).

На посевах овса во время молочной спелости культуры учитывают личинок шведской мухи в метелках. С этой целью отбирают и анализируют 10 проб метелок по 100 колосков в каждой пробе. Взрослых мух учитывают во время массового лета, обычно совпадающего с кущением пшеницы. Для этого в 10 местах поля делают по 10 взмахов сачком. Содержимое сачка вытряхивают в мешочек с этикеткой, который плотно завязывают и помещают в полиэтиленовый пакет или эксикатор для замаривания. Через два часа содержимое каждого мешочка вытряхивают на лист белой бумаги и подсчитывают мух. Динамику лета мух можно проследить с помощью клеевых ловушек темно-телесного цвета. Ловушки представляют собой расположенную вертикально пластину размером 15×20 см. Для фиксации насекомых применяют энтомологический клей. Ловушки

размещают по 4 на поле на расстоянии 20-50 м друг от друга на уровне верхних листьев, перемещая их по мере роста растений. Осматривают их через каждые 3-4 дня.

Злаковые тли. Тлей начинают учитывать в период полного кущения (в это время на посевах появляется черемуховая тля). В 10 местах поля на 10 стеблях подсчитывают тлей и устанавливают плотность их популяции в пересчете на 1 стебель и процент заселенных стеблей. Заселенность посева можно выразить в баллах по 5-балльной шкале:

- 1 балл - отдельные особи на 2-3 листьях,
- 2 балла - колонии по 3-5 особей на 2-3 листьях,
- 3 балла - колонии по 10-15 особей на 1/2 всех листьев,
- 4 балла - колонии по 20 особей и более на 2/3 всех листьев,
- 5 баллов - многочисленные колонии на всех листьях.

Средний балл заселения поля или делянки рассчитывают по формуле:

$$C = \Sigma(a \times b) / N,$$

где C - средний балл заселения, $\Sigma(a \times b)$ - сумма произведений числа заселенных тлями растений (a) на соответствующий балл заселения (b), N - количество растений в пробе.

В период выхода в трубку учет повторяют. После выколачивания посева тли в основном переходят на колосья, где удерживаются до конца молочной спелости. В это время учитывают тлей на колосьях, либо подсчитывая их, либо по 5-балльной шкале. По результатам учета устанавливают процент заселенных колосьев и степень их заселения в абсолютных показателях или в баллах.

Пьявица. Учет жуков проводят в фазу полного кущения яровых культур и выхода в трубку озимых. Личинок учитывают примерно через три недели после учета жуков. Учеты проводят на 20 учетных площадках размером 0.25 м² (50×50 см), 10 из которых располагают по краю поля и 10 - в центральной части поля. На площадках подсчитывают жуков или личинок и устанавливают плотность популяции. Одновременно глазомерно оценивают поврежденность листовой поверхности, выражая ее в процентах. Для этого вредителя характерно неравномерное заселение полей, поэтому для более объективной оценки заселенности поля следует выделить очаги скопления жуков или личинок, установить их площадь на поле и оценить плотность популяции пьявицы в этих очагах. Для этого при наличии крупных очагов по диагонали поля выделяют 4 площадки по 0.25 га (50×50 м). При наличии мелких очагов - 10 площадок по 0.1 га. Подсчитав площадь очагов, долю пораженной площади устанавливают по формуле:

$$P = 100 \times \Sigma n / N,$$

где P - площадь очагов (%), Σn - сумма площадей всех очагов на площадках (m^2), N - общая площадь учетных площадок (m^2).

После этого появляется возможность при установлении средней плотности вредителя на поле учесть неравномерность его распределения.

Стеблевые пилильщики. Имаго пилильщиков учитывают в конце кущения - начале выхода в трубку пшеницы с помощью кошени сачком. При высокой численности пилильщиков делают по 20 взмахов в 10 точках поля, при низкой численности - по 100 взмахов. Содержимое сачка вытряхивают в матерчатый мешочек и помещают его в полиэтиленовый пакет для замаривания. Через 1-2 часа содержимое каждого мешочка вытряхивают на лист белой бумаги и подсчитывают пилильщиков, численность которых пересчитывают на 100 взмахов сачком. Кошения проводят от 11 до 15 часов. Для учета поврежденности стеблей в фазу молочной спелости на поле отбирают 20 проб по 10 растений. Стебли вскрывают и определяют процент поврежденных.

Пшеничный трипс. Учет взрослых трипсов проводят в конце выхода в трубку кошением сачком. В 10 местах поля делают по 5 взмахов и подсчитывают трипсов в сачке. В начале колошения трипсов учитывают на колосьях, для чего на поле отбирают 20 проб по 5 не полностью выколосившихся колосьев. Пробы помещают в мешочки и в лаборатории подсчитывают трипсов в каждой из них. Затем определяют плотность популяции пшеничного трипса в пересчете на 1 колос. В конце налива зерна - начале молочной спелости учитывают личинок трипса. С этой целью в 10 местах поля берут по 5 колосьев (при высокой численности личинок количество колосьев можно сократить до 25). Каждый колос помещают в пробирку. Анализ проводят в лаборатории, где просматривают все колоски в колосе и подсчитывают личинок. Одновременно фиксируют количество зерен. Плотность популяции личинок оценивают в пересчете на 1 колос и на 1 зерно.

Проволочники и ложнопроволочники. Заселенность полей личинками щелкунов или чернотелок учитывают перед посевом зерновых культур (осенью или весной) в 10 почвенных пробах, равномерно расположенных на поле. Из пробной ямы размером 50×50 см почву послойно выбирают лопатой на глубину пахотного слоя (25-30 см) на брезент или лист фанеры, вручную перебирают и записывают количество личинок в каждой пробе. Общее количество личинок во всех пробах делят на количество проб, умножают этот средний результат на 4 и получают численность личинок на 1 m^2 . Поврежденность всходов учитывают в фазу трех листьев на яровых культурах весной, на озимых - осенью. Для этого в 16 местах поля осматривают по 0.5 м рядка, что суммарно равно 1 m^2 , и подсчитывают погибшие и здоровые растения. В итоге устанавливают общее количество

растений на 1 м² и процент погибших.

Озимая совка. Учеты гусениц совки проводят осенью на посевах озимых по пропашным культурам. Гусениц учитывают в почвенных пробах площадью 0.25 м² (50×50 см) и глубиной 20 см. Почву в пробах выбирают на брезент или фанеру, тщательно просматривают при ручной разборке и записывают количество обнаруженных гусениц и их возрастной состав. На поле берут 10 проб, располагая их равномерно. На полях, где осенью обнаружена высокая численность озимой совки, весной учеты повторяют.

Полосатая хлебная блошка. Жуков учитывают на всходах яровых культур. На поле берут 20 проб с помощью ящичка Петлюка, располагая их от края поля к центру. С меньшей точностью блошек можно учитывать на площадках 0.25 м² (50×50 см) или 0.1 м² (31.6×31.6 см), на которых осматривают поверхность почвы и подсчитывают прыгающих блошек. Плотность популяции блошки оценивается в пересчете на 1 м².

Хлебные клопки и злаковые цикадки. Учеты проводят во время выхода в трубку и цветения зерновых культур. Вредителей учитывают на площадках 0.25 м² (50×50 см) или 0.1 м² (31.6×31.6 см) в зависимости от численности. На поле берут 20 равномерно расположенных площадок. На каждой площадке тщательно осматривают растения и поверхность почвы, подсчитывая клопиков и цикадок. В период выхода в трубку или на низкорослых растениях учет цикадок можно проводить ящичком Петлюка. Плотность популяций этих вредителей оценивается в пересчете на 1 м². Учитывать клопиков и цикадок можно и с помощью кошений сачком. В указанные выше фазы зерновых культур в 10 местах поля делают по 20 взмахов сачком, содержимое сачка пересыпают в мешочки, замаривают и подсчитывают вредителей.

Методы учета энтомофагов

Учет полезных членистоногих характеризуется некоторыми специфическими чертами. Прямое определение паразитов путем визуальной оценки удается в редких случаях, например, в яйцах некоторых насекомых, личинках тлей и т.п. Диагностическими признаками у хозяина являются изменение окраски, формы тела, наличие личинок паразита, просвечивающих сквозь оболочку хозяина, мумификация перед окукливанием паразитов. В большинстве случаев наличие паразита устанавливают путем вскрытия и анализа хозяина под биноклем. Этот метод трудоемок и не позволяет определять виды паразитов. Для решения последней проблемы применяют метод выведения. С этой целью собранных насекомых содержат поодиночке или небольшими группами в пробирках в благоприятных условиях (температура, влажность, корм) и ежедневно регистриру-

ют смертность хозяина и вылет паразитов.

Для определения зараженности паразитами вредной черепашки во время массовой откладки яиц собирают 50 клопов и вскрывают. Под биноклем устанавливают количество клопов с личинками паразитов и высчитывают процент паразитированных. Одновременно учитывают зараженность яиц яйцеедами. С этой целью на 20 площадках по 0.25 м² (50×50 см) тщательно осматривают все культурные и сорные растения, сухие стебли, комочки почвы и собирают кладки яиц вредной черепашки. При низкой численности черепашки на поле дополнительно собирают не менее 10 кладок. Зараженные яйцеедами яйца устанавливают визуально по окраске (светло-коричневые, черные) или по летным отверстиям паразитов. Ранние фазы заражения определяют методом щелочного анализа. Для этого зеленые яйца черепашки помещают на часовое стекло и заливают просветляющим раствором (калийная щелочь, вазелиновое или касторовое масло, глицерин). Через час яйца паразитов хорошо видны в проходящем свете под микроскопом, а личинки 1-го возраста - под биноклем. Степень заражения яиц вычисляют по формуле:

$$X = 100(A - B)/A,$$

где X - степень заражения (%), A - общее количество яиц, B - количество зараженных яиц. Учет имаго яйцеедов проводят в начале откладки яиц черепашкой стандартным сачком. На поле в 10-20 местах делают по 10 взмахов сачком (количество учетов и взмахов в каждом учете зависит от численности яйцеедов), а затем устанавливают численность паразитов в пересчете на 1 м², для чего количество яйцеедов на 100 взмахов сачком делят на 40.

Зараженность гусениц зерновой совки паразитами определяют на материале, полученном во время учета гусениц в колосьях. Всех обнаруженных гусениц используют для выведения паразитов (см. выше). Кроме того 25-50 гусениц вскрывают, чтобы установить наличие в них личинок паразитов. После уборки урожая и весной учитывают зараженность уходящих на зимовку и перезимовавших гусениц. Для этого собранных гусениц и куколок вскрывают. Осенью проводят учет зараженности гусениц гранулезом. С этой целью собирают уходящих на зимовку гусениц (не менее 100) и содержат при температуре 20-25°С в пробирках со слоем почвы, которую периодически меняют по мере подсыхания. Гусениц кормят размоченным зерном. Через день пробирки просматривают, меняют корм и определяют количество погибших гусениц от болезни и от паразитов.

Для учета зараженности яйцеедами яйца подгрызающих совок собирают на посевах озимых культур, главным образом на листьях сорняков, прилегающих к почве, а также на почве и сухих растительных остатках. Собранные яйца держат в пробирках до вылета паразитов или отрождения гусениц. Зараженность гусениц опреде-

ляют путем их сбора на полях с последующим содержанием в пробирках до вылета паразитов.

При оценке зараженности паразитами злаковых мух на поле отбирают пробы стеблей, которые тщательно осматривают и вскрывают. Обнаруженных личинок и пупарии извлекают из стеблей. Личинок вскрывают на предметном стекле в капле воды и устанавливают наличие или отсутствие личинок паразитов. Пупарии помещают в пробирки или чашки Петри для выведения паразитов.

Зараженность яиц и личинок пшавицы паразитами определяют путем сбора этих стадий развития вредителя (не менее 50 экз. каждой) и содержания их в пробирках или банках до выведения паразитов.

Для учета зараженности паразитами тлей во время учета последних подсчитывают все фазы развития (крылатые, взрослые, личинки), здоровые, мумифицированные и больные, а затем определяют процент паразитированных.

Хищников учитывают следующим образом. Кладки яиц и личинок златоглазок, кокцинелл, личинок мух-серфид, личинок и имаго хищных клопов учитывают на растениях, осматривая в 3-4 местах поля по 100 растений. Для учета имаго этих насекомых применяют кошени сачком, по 25 взмахов в 10 местах поля. Пауков, стафилинид и жуужелиц учитывают на поверхности почвы: по 15-20 проб площадью 25×25 см на поле или такого же количества почвенных ловушек. Учеты хищных насекомых и других членистоногих, включая имаго паразитов, совмещают с учетами насекомых-фитофагов почвенными ловушками и кошениями сачком.

Методы учета болезней зерновых культур

Для оценки фитопатологического состояния растений необходимо иметь четкое представление о распространенности (частоте встречаемости), интенсивности или степени поражения и о развитии болезни.

Распространенность болезни - это количество больных растений по отношению к их общему количеству в пробе. Выражают ее в процентах, вычисляя по формуле:

$$P = 100n/N, \quad (1)$$

где P - распространенность болезни (%), n - количество больных растений в пробах, N - общее количество растений (больных и здоровых) в пробах.

Болезни, вызывающие полную гибель растений или их продуктивных органов, характеризуют только этим показателем (например, гибель всходов, увядание, головня или спорынья зерновых культур).

Интенсивность или степень поражения растений - качественный показатель проявления болезни. Ее определяют по площади пораженной поверхности органов растений, покрытых пятнами, пустулами или по степени проявления других симптомов заболеваний. Для оценки интенсивности поражения растений разработаны глазомерные, относительные шкалы: словесные, балловые, процентные, иллюстрационные, специфичные для каждого заболевания.

Словесными шкалами пользуются при оценке таких заболеваний, когда невозможно определить проявление болезни в процентах. Словесная шкала имеет следующие градации: непораженные, слабо, средне и сильно пораженные растения. Эта шкала применяется для характеристики общего состояния посева. Более широко распространены балловые шкалы, когда степень развития болезни оценивается в баллах (табл.6,7 и 9).

Там, где можно установить площадь пораженной поверхности, применяется процентная шкала, которая может соответствовать балловой оценке, но выражается эта шкала в процентах. Например, 0 - отсутствие поражения,

1 - поражение до 10% поверхности,

3 - поражение от 11 до 25%,

5 - поражение от 26 до 50%,

7 - поражение от 51 до 75% и

9 - поражение более 75%.

Хорошие результаты дает использование равноступенчатой процентной шкалы: 10, 20, 30, ..., 100%. Иллюстрационные шкалы (например, рис.4-8) очень полезны при оценке пораженности растений многими болезнями. Они не только повышают надежность и сравнимость наблюдений, но и значительно облегчают и ускоряют оценку.

Расчет средней интенсивности поражения больных растений проводят по формуле:

$$C = \Sigma(a \times b) / n, \quad (2)$$

где C - средняя интенсивность поражения больных растений (% или баллы), $\Sigma(a \times b)$ - сумма произведений числа больных растений (a) на соответствующий балл или процент поражения (b), n - число больных растений.

Развитие болезни отражает усредненную степень поражения делянки или всего поля. Рассматривая развитие болезни как интегральный показатель, расчет ведут по формуле:

$$R = \Sigma(a \times b) / N, \quad (3)$$

где R - развитие болезни, баллы или %, $\Sigma(a \times b)$ - сумма произведений числа больных растений (a) на соответствующий балл или про-

цент поражения (b), N - общее количество растений в пробах (больных и здоровых).

Ниже описаны наиболее простые методы учета по типам проявления заболеваний зерновых культур.

Инфекционное выпревание (снежная плесень, тифулез, склеротиниоз). Учет проводят на озимых культурах сразу после таяния снега. При очажном проявлении болезни на полях при наличии крупных плешин выделяют по диагонали поля 4 учетные площадки размером по 0.25 га (50×50 м). При очажной гибели растений в виде мелких плешин площадки уменьшают до 0.1 га (32×32 м). Обмер плешин проводят на каждой площадке. Подсчитав общую площадь плешин, устанавливают долю пораженной площади по формуле:

$$O = 100 \Sigma n / N,$$

где O - очажная гибель (% пораженной площади), Σn - сумма площадей всех плешин (м²), N - площадь учетных площадок (м²).

При равномерно-рассеянном изреживании посевов определяют процент погибших растений, для чего осматривают по 100 растений в 10 местах поля или делянки. Общую гибель растений вычисляют как сумму процентов очажной гибели и изреживания.

Возбудитель снежной плесени помимо гибели растений вызывает в период весенней вегетации побурение листьев. В этом случае интенсивность поражения учитывают по шкале (табл.6), а развитие болезни - по формуле (3).

Таблица 6. Шкала интенсивности поражения снежной плесенью (в баллах) и корневой гнилью всходов зерновых культур

Баллы	Показатели поражения	
	Снежная плесень	Корневая гниль всходов
0	Здоровые растения	Здоровые растения
1	Редкие пятна на нижних листьях (2-3 пятна) при общей пораженности до 10% всех листьев	Единичные штрихи на coleoptile или подземном междоузлии
2	Нижние листья поражены полностью, на верхних 2-3 пятна при общей пораженности до 50%	Слабое побурение coleoptile или подземного междоузлия
3	Поражены нижние и верхние листья при общей пораженности более 50%, отмирают боковые побеги	Сильное побурение coleoptile или подземного междоузлия
4	Все листья и побеги поражены, растения мертвые	Полное отмирание проростка

Корневые гнили. Учет корневых гнилей проводят в период всходов (на озимых культурах - осенью и весной), в начале цветения и созревания. На всходах при очажном или равномерно-рассеянном распределении пораженных растений изреживание оценивают аналогично учету инфекционного выпревания. Одновременно с определением погибших растений устанавливают интенсивность поражения всходов по шкале (табл.6). Затем рассчитывают распространенность, определяют средний балл поражения и развития болезни по формулам (2) и (3). При учетах в период цветения и созревания отбирают 100 растений или продуктивных стеблей, по 10 растений в 10 местах поля или делянки. Интенсивность поражения оценивают по условной шкале в баллах (рис.1, табл.7).

Таблица 7. Шкала интенсивности поражения пшеницы (в баллах) корневыми гнилями во время вегетации

Баллы	Показатели поражения			
	Офиоблез	Гельминтоспориоз	Церкоспореллез	Фузариоз
0	Признаки поражения отсутствуют			
1	На основании стебля и корнях - темные единичные штрихи	На основании стебля или его подземной части - бурые штрихи или узкие полосы	На основании стебля или первом междоузлии - отдельные белесоватые или светло-коричневые пятна	На первичных и вторичных корнях - отдельные участки бурого цвета
2	Основание стебля буроватое с многочисленными черными полосами или пятнами; корни частично отмерли	На основании стебля и его подземной части коричневые полосы, охватывающие более половины поверхности пораженного органа	Темные желтовато-коричневые пятна ярко выраженной темной каймой охватывают до половины стебля	Основание стебля белесое или слегка бурое, отдельные корни или значительные участки их бурые
3	Основание стебля бурое, покрыто углестым налетом, корни наполовину отмерли	Сплошное побурение первого стеблевого и подземного междоузлия (эпикотилья)	Пятна окольцовывают стебель, в середине пятна ткань частично разрушена, стебель переламывается	Основание стебля темное с перехватом, большая часть корней отмерла
4	Полное отмирание	Отсутствие продуктивных стеблей при наличии симптомов по баллу 3		

Затем рассчитывают распространенность, средний балл поражения больных растений и развитие болезни по формулам (1), (2), (3).

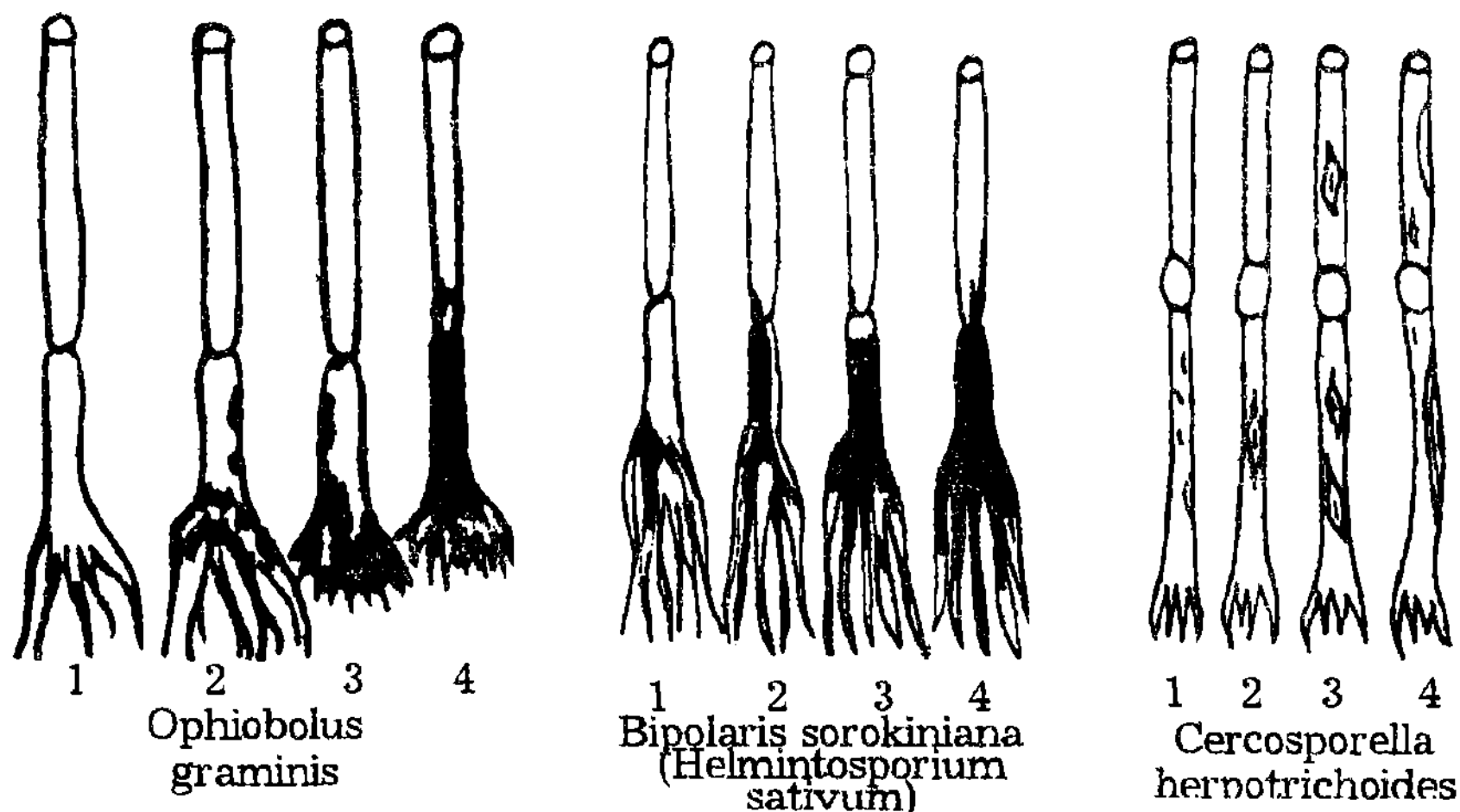


Рис.1. Шкала для оценки степени поражения растений различными видами грибов, вызывающих корневые гнили (в баллах)

Мучнистая роса. Учеты развития мучнистой росы проводят в течение вегетации 3-4 раза, начиная с периода кущение - выход в трубку (первый учет - не позже фазы первого узла) до молочно-восковой спелости, когда на еще зеленых частях растения хорошо виден налет гриба. Оценка максимального проявления болезни проводится в период колошения - цветения. В соответствующий период на поле или на делянке отбирают 20 проб по 10 растений.

В фазу кущения осматривают не менее 30 листьев в каждой пробе, в остальные фазы учитывают подряд 10 стеблей, определяя пораженность каждого листа. Интенсивность поражения определяют по условной шкале (рис.2) или по проценту занятой мучнистым налетом площади листа. Среднеарифметические значения поражения равнозначны развитию болезни (табл.8). При заболевании колоса определяют процент пораженных колосьев. Кроме анализа каждого учетного растения, оценка степени поражения посева может быть визуальной, когда на основании осмотра растений в поле сразу проставляют балл поражения (табл.9).

Таблица 8. Форма записи для учета пораженности злаков мучнистой росой (%)

Номера учетных стеблей	Ярусы листьев снизу вверх				Среднее поражение
	1	2	3	4	
1	75	50	10	0	34
2	50	25	5	0	20
3	60	25	1	0	21
...
10	75	25	1	0	25
				Среднее	...

Пятнистости листьев (септориоз, гельминтоспориозы, ринхоспориоз и др.). Эти заболевания учитывают от всходов до молочно-восковой спелости. Учеты проводят аналогично мучнистой росе. Степень поражения растений устанавливают по проценту площади листьев, стеблей, колосьев, покрытой пятнами, по иллюстрационным шкалам (рис.3 и 4) или по следующей шкале в баллах:

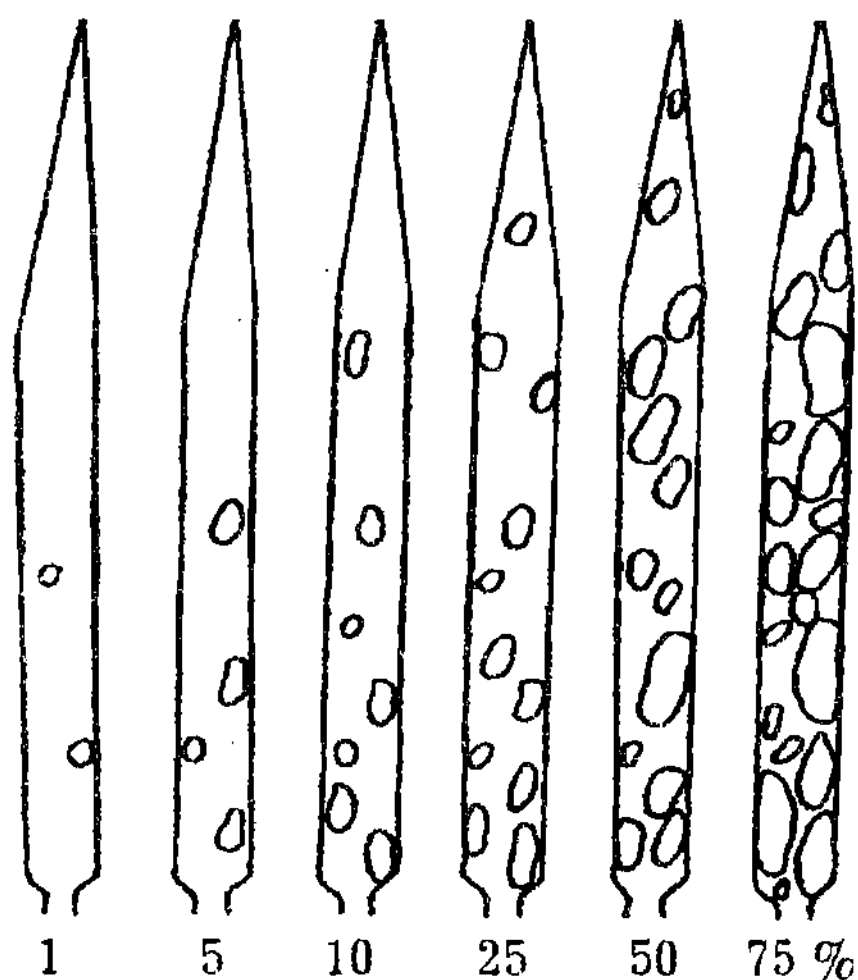


Рис.2. Шкала оценки степени поражения злаков мучнистой росой (в процентах)

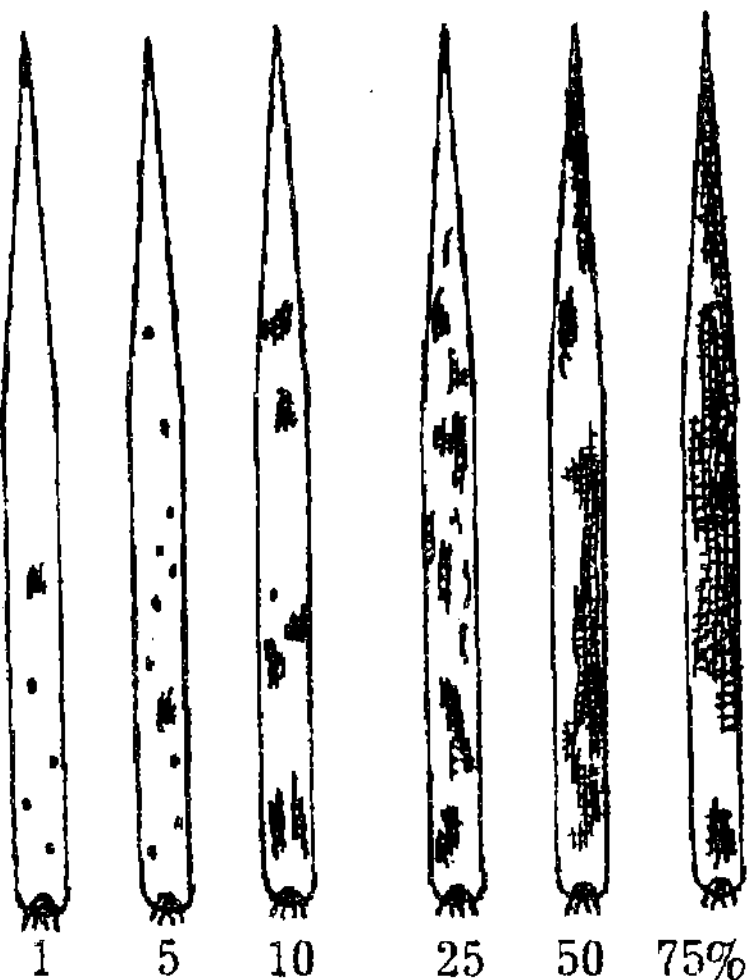


Рис.3. Шкала оценки степени поражения ячменя сетчатой пятнистостью (в процентах)

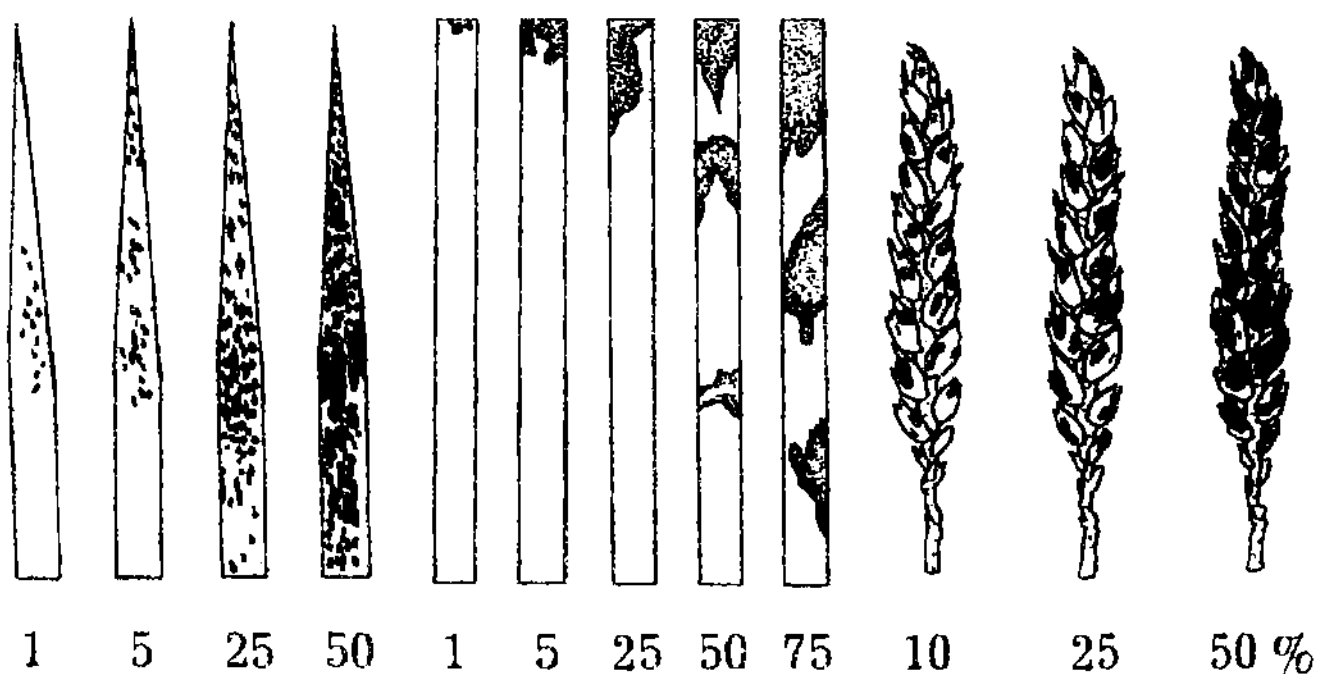


Рис.4. Шкала Джеймса для оценки степени поражения листьев, стеблей и колосьев пшеницы септориозом (в процентах)

- 0 - признаки поражения отсутствуют,
- 1 - поражено до 10% листовой поверхности,
- 2 - поражено от 11 до 25%,
- 3 - поражено от 26 до 50%,
- 4 - поражено более 50% листовой поверхности.

Таблица 9. Шкала оценки развития мучнистой росы (в баллах)

Баллы	Степень поражения	Внешний вид проявления болезни
0	Признаков проявления нет	Болезни нет
1	Очень слабая (поражено до 10% листовой поверхности)	Легкий налет или единичные подушечки гриба на листьях нижнего яруса
2	Слабая (поражено 11-25% листовой поверхности)	Умеренное количество подушечек на листьях нижнего яруса
3	Средняя (поражено 25-50% листовой поверхности)	Обильное развитие гриба на нижних листьях; на верхних подушечки локальные, рассеянные
4	Сильная (поражено более 50% листовой поверхности)	Сильно поражены все листья, подушечки хорошо выражены, сливающиеся, с обильными гифами. Может быть поражен колос

Распространенность, интенсивность поражения и развитие болезни рассчитывают по формулам (1-3). Затем вычисляют среднюю пораженность поля или делянки и записывают результаты по форме (табл.10).

Учет сетчатой и темно-бурой пятнистости ячменя проводят по 5-балльной шкале:

- 0 - поражение отсутствует,
- 1 - единичные пятна на нижних листьях,
- 2 - поражено более 50% листовой поверхности нижних листьев и единичные пятна на листьях 2-го яруса,
- 3 - нижние листья отмирают, поражено более 50% поверхности листьев 2-го яруса и единичные пятна на верхних листьях,
- 4 - нижние листья отмирают, листовая поверхность всех ярусов поражена более чем на 50%.

Таблица 10. Форма записи для учета средней пораженности септориозом

Дата	№ поля, сорт, фаза развития	№ учетной точки	Степень поражения, %					Средняя
			листьев			стеблей	коло-сьев	
			1-го	2-го	3-го			
		1						
		2						
		3						
		...						
		10						
В среднем по полю								

Интенсивность поражения ячменя полосатой пятнистостью определяют по следующей шкале:

- 0 - поражение отсутствует;
- 1 - на листьях больных побегов продольные коричневые полосы, наряду с пораженными растение образует здоровые продуктивные стебли, но с меньшей массой семян в колосе; соотношение продуктивных и погибших стеблей 2:1;
- 2 - признаки поражения те же; наряду с погибшими - один озерненный колос; соотношение продуктивных и погибших стеблей 1:1;
- 3 - признаки поражения те же; растение полностью погибает или образует колос, в котором не завязываются зерна.

Ржавчина. Учет всех видов ржавчины проводят несколько раз, начиная от кущения озимых культур осенью до молочной спелости. Первый учет проводят одновременно с учетом корневых гнилей путем осмотра растений с трех учетных площадок по 0.1 м². При этом устанавливают число и процент пораженных растений и среднее количество пустул на 1 лист (при степени поражения менее 1%). Для бурой ржавчины степень поражения, равная 1%, соответствует числу пустул на 1 зеленый лист; на всходах - 0.8, в период кущения - 1.58 и в период налива зерна - 4.6. Для желтой ржавчины наличие уредопустул в виде строчки длиной в 1 см соответствует 1% пораженности. Для стеблевой ржавчины в фазу выхода в трубку 1 пустула на стебель соответствует 0.1% пораженности.

Начиная с фазы выхода в трубку, на поле берут 20 проб по 10 растений (стеблей) в каждой. Определение степени поражения растений стеблевой и бурой ржавчиной проводят по шкале Петерсона (рис.5), а желтой - по шкале Маннерса (рис.6).

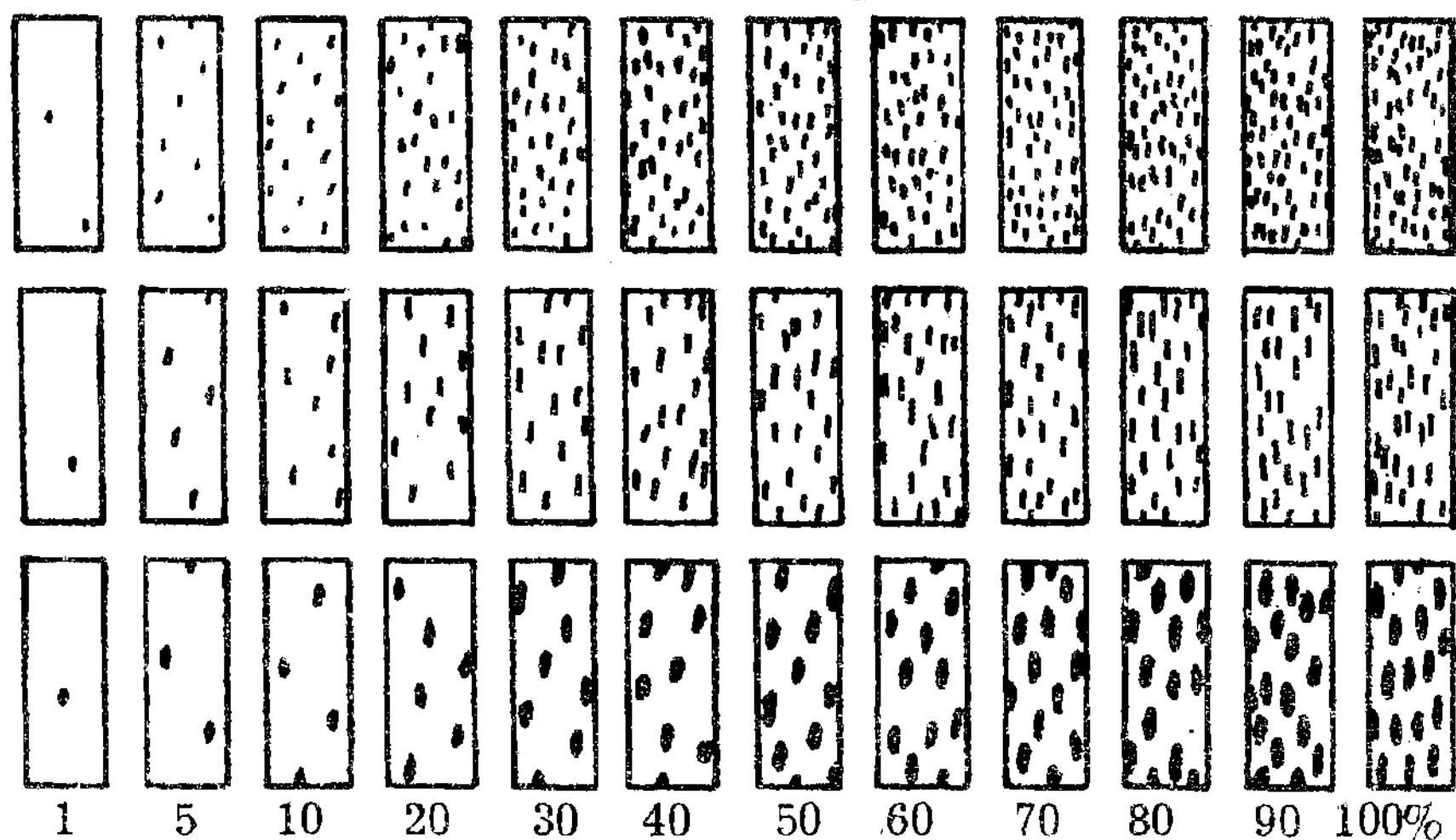


Рис.5. Шкала Петерсона для оценки степени поражения растений стеблевой и бурой ржавчинами (в процентах)

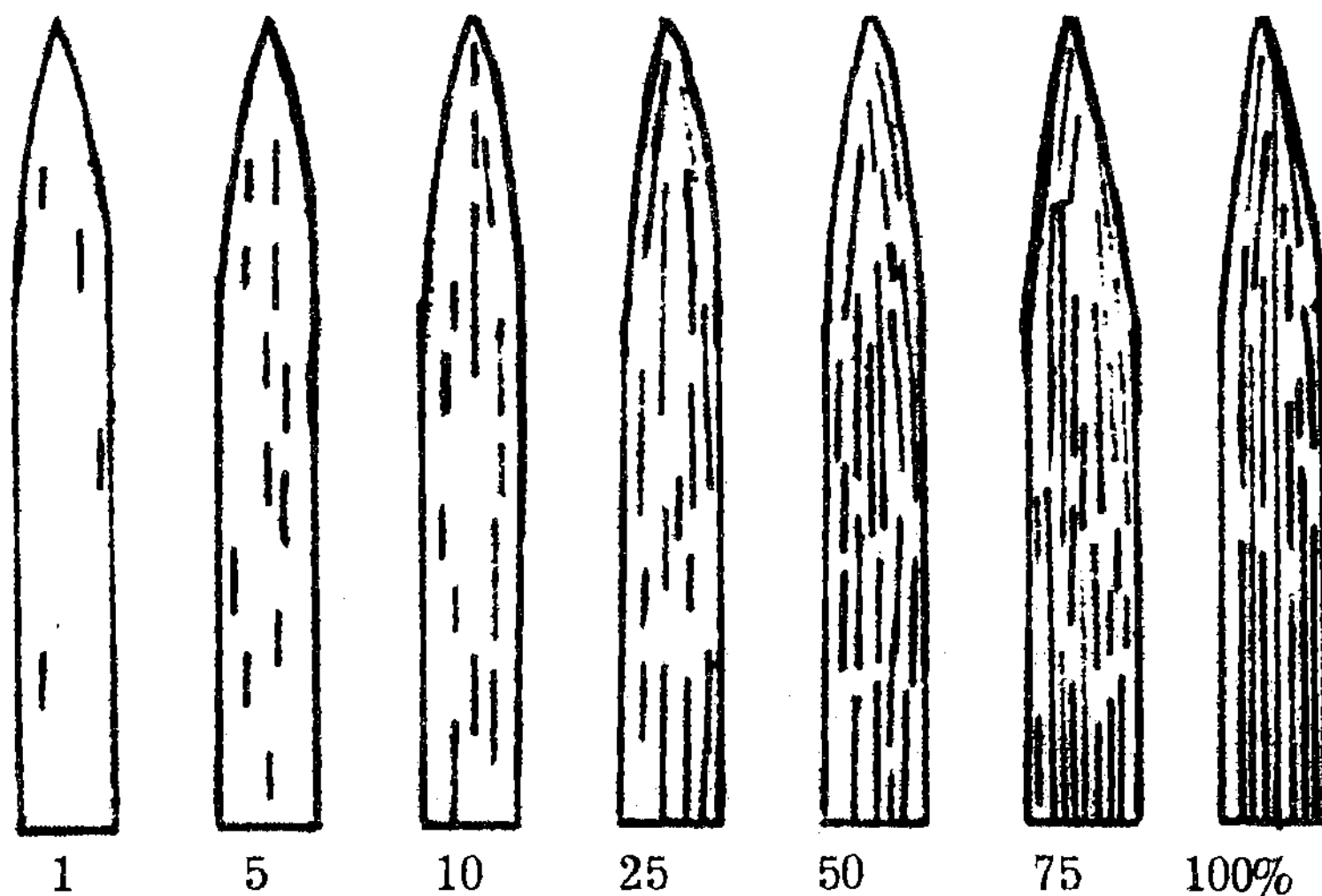


Рис.6. Шкала Маннерса для оценки степени поражения листьев злаков желтой ржавчиной (в процентах)

При учете средней пораженности растений видами ржавчины на поле запись ведут по формам, представленным в таблицах 11 и 12. При одновременном проявлении двух видов ржавчины для каждого листа (стебля) запись ведут в виде дроби, отмечая в числителе пораженность

Таблица 11. Форма записи для учета средней пораженности бурой ржавчиной

№ учетных точек	Количество пустул или степень поражения, %				Средняя
	Ярус листьев сверху вниз				
	1	2	3	4	
1					
2					
10					

В среднем по полю					

Таблица 12. Форма записи для учета средней пораженности стеблевой ржавчиной

№ учетных точек	Количество пустул или степень поражения, %				Средняя
	Номер междоузлия сверху вниз				
	1	2	3	4	
1					
2					
10					

В среднем по полю					

одним видом ржавчины, в знаменателе - другим. Среднее поражение растений пробы вычисляют и записывают для каждого вида ржавчины отдельно (табл.13).

Таблица 13. Форма записи пораженности листьев пшеницы бурой (в числителе) и желтой (в знаменателе) ржавчины (%)

Порядок стеблей	Ярус листьев сверху вниз				Среднее поражение растений	
	1	2	3	4	Бурая ржавчина	Желтая ржавчина
1	0/0	5/0	10/3		5	1
2	0/0	10/20	10/40	40/40	15	25
10	0/0	2/0	10/0	20/20	8	5
Среднее поражение пробы					3.0	3.1

Головня. Учеты проводят в конце молочной - начале восковой спелости или перед уборкой, отдельно по видам болезни. На делянках берут по 25 проб, на полях площадью до 100 га - 100 проб по 10 растений. Если обследуемая площадь превышает 100 га, то это поле делят на несколько участков, чтобы с каждого из них отобрать отдельный сноп. Распространенность (%) головни определяют по видам, подсчитывая количество пораженных стеблей в снопах. Пыльную головню удобнее учитывать в фазу колошения - цветения, когда пораженные растения лучше заметны в посеве.

Фузариоз колоса. Учеты начинают в фазу колошения. На полях или делянках просматривают по 50 колосьев в 20 местах. Последний учет проводят перед уборкой по апробационным снопам одновременно с учетом головневых заболеваний. Для определения степени поражения используют иллюстрированную шкалу (рис.7)

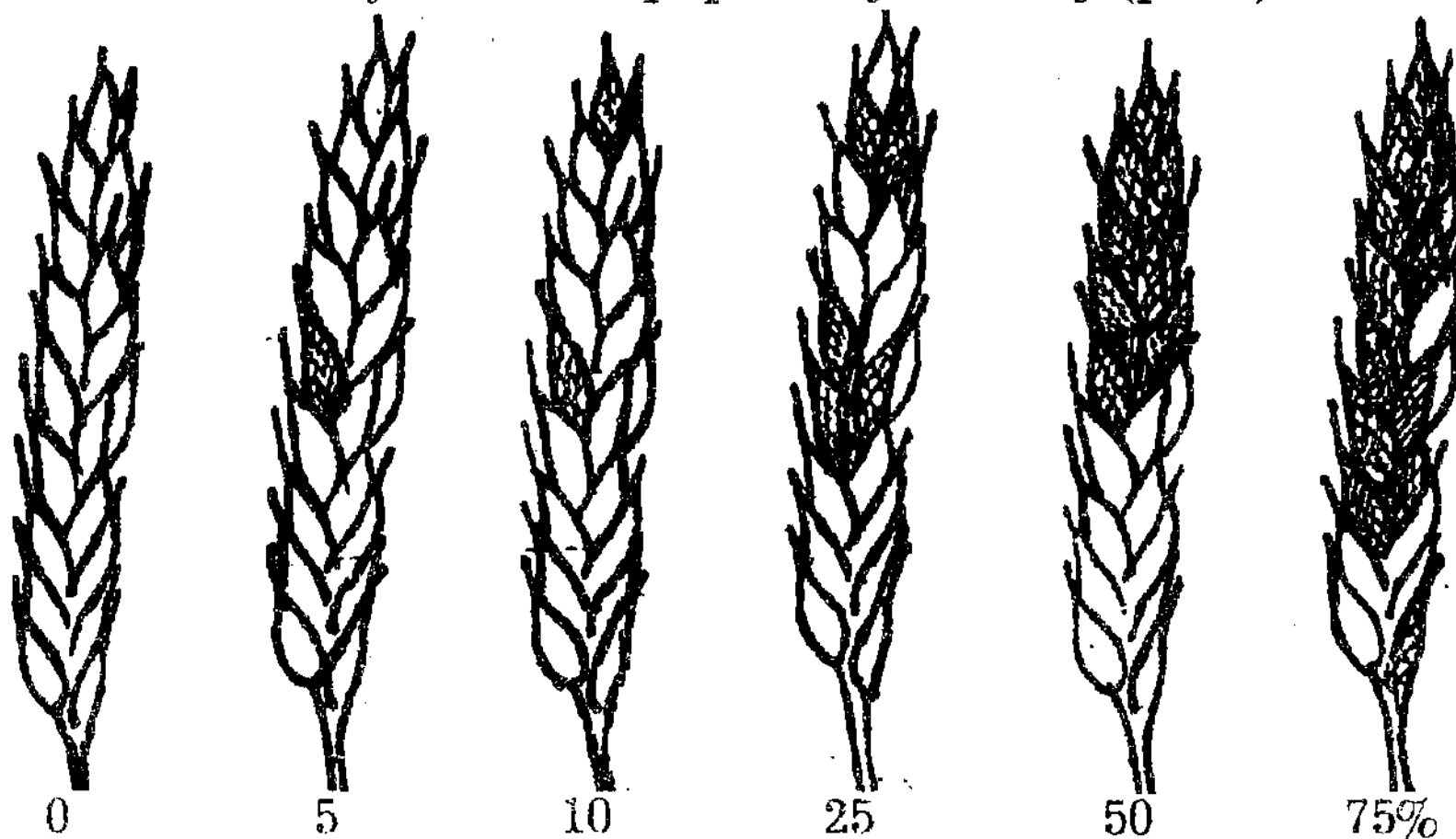


Рис.7. Шкала оценки степени поражения колоса пшеницы фузариозом (в процентах)

или следующую шкалу (в баллах): 0 - признаков повреждения нет,
 1 - проявление заболевания охватывает до 10% поверхности колоса,
 2 - то же до 25%,
 3 - то же до 50%,
 4 - то же свыше 50%, а затем по формулам (1) и (3) рассчитывают распространенность и развитие болезни.

Методы учета сорных растений

Определение засоренности посевов осуществляется с разными целями:

1 - для получения сведений об общей засоренности полей, получаемые при этом данные позволяют принимать объективные решения о целесообразности защитных мероприятий; кроме того, эти данные дают возможность предсказать последующую засоренность полей в севообороте и организовать профилактические мероприятия;

2 - для детального учета обилия и видового состава, динамики засоренности, влияния систем защиты растений и т.п. в стационарных условиях полей, где проводится работа по совершенствованию защиты сельскохозяйственных культур от комплекса вредных организмов. В первом случае учеты проводят, в основном, глазомерным методом, во втором - количественным и количественно-весовым методами.

При маршрутных обследованиях больших площадей для полной ботанической и агроэкологической характеристики полей проводят балльную оценку засоренности на площадках в 10 м^2 ($2 \times 5 \text{ м}$) в период кущения зерновых культур и на площадках 100 м^2 ($10 \times 10 \text{ м}$) - в период цветения большинства видов сорных растений. На массивах 100-400 га закладывают 5 таких пробных площадок. В период кущения на площадках отмечают обилие вегетирующих сорных растений в баллах и состояние культуры. В период массового цветения сорняков на площадках размером 100 м^2 устанавливают видовой состав сорных растений, их обилие, указывают занимаемый ярус, высоту, фенофазу культуры и сорняков. На основании обследований в каждом описании указывают тип засоренности и общее обилие сорных растений в баллах по следующей шкале:

- 1 - сорняки встречаются единично,
- 2 - сорняки встречаются изредка,
- 3 - сорняки встречаются часто,
- 4 - сорняки встречаются обильно,
- 5 - сорняки встречаются очень обильно.

При суммарном анализе описаний встречаемость вида выражают в процентах числа площадок, на которых данный вид встречен, к общему количеству площадок. Анализ всех описаний позволяет ус-

тановить характер засорения, общее обилие и встречаемость видов во всем массиве, а также на посевах данной культуры при той или иной технологии возделывания.

Если разные экземпляры одного вида на площадке находятся в различных ярусах, фенофазах и различны по высоте, это также отмечают в описании. Вначале записывают преобладающий ярус, затем высоту и фенофазу. Различают следующие ярусы: I(B) - верхний, II(K) доминирующий (занимаемый культурой), III(C) - средний, IV(H) - нижний ярус.

Маршрутные обследования можно проводить по методике, позволяющей количественно оценить видовой состав сорных растений на больших площадях. Учеты проводят на площадках в 200 см² (14.1×14.1 см) в предуборочный период. Для этого используют квадратную проволочную рамку соответствующего размера. На поле площадью до 100 га включительно закладывают 50 таких учетных площадок, а затем добавляют по 25 площадок на каждые следующие полные или неполные 100 га. На каждой площадке отмечают наличие либо отсутствие того или иного вида сорных растений. По количеству площадок, на которых отмечен тот или иной вид, устанавливают численность сорняков по следующей расчетной таблице (табл.14).

Таблица 14. Расчетная плотность сорных растений (экз/м²) в зависимости от их наличия на учетных площадках размером 200 см²

Число площадок с данным видом	Плотность*, экз/м ²	Число площадок с данным видом	Плотность*, экз/м ²	Число площадок с данным видом	Плотность*, экз/м ²
1	1 (0 ÷ 2)	18	14 (10 ÷ 19)	35	37 (29 ÷ 47)
2	1 (0 ÷ 3)	19	15 (10 ÷ 20)	36	39 (30 ÷ 50)
3	2 (1 ÷ 4)	20	16 (11 ÷ 21)	37	41 (31 ÷ 52)
4	3 (1 ÷ 5)	21	17 (12 ÷ 22)	38	44 (34 ÷ 56)
5	3 (2 ÷ 6)	22	18 (13 ÷ 24)	39	46 (36 ÷ 59)
6	4 (2 ÷ 6)	23	19 (14 ÷ 25)	40	49 (39 ÷ 63)
7	5 (3 ÷ 7)	24	20 (15 ÷ 27)	41	53 (41 ÷ 67)
8	5 (3 ÷ 8)	25	21 (16 ÷ 28)	42	56 (44 ÷ 78)
9	6 (4 ÷ 9)	26	22 (17 ÷ 29)	43	60 (47 ÷ 78)
10	7 (4 ÷ 10)	27	24 (18 ÷ 31)	44	65 (51 ÷ 84)
11	8 (5 ÷ 11)	28	25 (19 ÷ 33)	45	71 (55 ÷ 92)
12	8 (5 ÷ 12)	29	27 (20 ÷ 35)	46	77 (60 ÷ 103)
13	9 (6 ÷ 12)	30	28 (21 ÷ 36)	47	86 (66 ÷ 117)
14	10 (7 ÷ 14)	31	30 (23 ÷ 38)	48	92 (70 ÷ 127)
15	11 (7 ÷ 15)	32	31 (24 - 40)	49	120 (88 - 194)
16	12 (8 ÷ 16)	33	33 (25 - 42)	50	212 (125 ÷ ...)
17	13 (9 ÷ 18)	34	35 (27 ÷ 45)		

*В графе "плотность" указано среднее количество сорняков на 1 м²; в скобках - минимальные и максимальные границы плотности на 1 м².

Учет засоренности полей для определения необходимости применения гербицидов проводят количественным методом. Для этого поле проходят по диагонали и через равные промежутки накладывают учетную рамку размером 0.25 м^2 ($50 \times 50 \text{ см}$). На полях площадью до 50 га рамку накладывают в 10-ти точках, до 100 га - в 15, более 100 га - 20 точках. Внутри рамки подсчитывают все сорняки и определяют их видовой состав. Результаты учета сопоставляют с экономическими порогами вредности сорняков и принимают решение: необходимо или нет применение гербицидов. Посевы озимых культур обследуют в конце осенней вегетации и весной после начала отрастания сорняков. Яровые культуры обследуют в начале кущения.

На стационарных полях учеты сорняков проводят совместно с учетами других вредных организмов в учетных точках, либо на постоянных площадках. Учеты проводят в указанные сроки с добавлением учета перед уборкой урожая, используя количественный и количественно-весовой методы. В учетных точках работа проводится на площадках 0.25 м^2 , а при учетах многолетних корнеотпрысковых сорняков - 1 м^2 . На постоянных площадках используется вся их площадь. При этом подсчитывают число сорняков по видам и их общее количество, определяется их высота, занимаемый ярус, фаза развития и биомасса. Для определения биомассы на учетной площадке выдергивают все сорные растения. Обрезают корни и, доведя до воздушно-сухого состояния, взвешивают. Поскольку на постоянных площадках вырывать ничего нельзя, то для оценки биомассы рядом с ними закладывают связанные площадки, состоящие из нескольких площадок (по количеству планируемых учетов). При каждом очередном учете сорняки выдергивают на одной из этих площадок. В исследованиях обязательен учет всех видов сорных растений. Виды, неизвестные исследователю или сомнительные, следует гербаризировать для последующего определения.

Хорошим показателем оценки засоренности полей служит проективное покрытие сорных растений. Исходя из степени покрытия площади верхними частями растений, оценка засоренности дается по 5-балльной шкале:

- 0 - сорняков нет,
- 1 - проективное покрытие до 10%,
- 2 - проективное покрытие 11-25%,
- 3 - проективное покрытие 26-50%,
- 4 - проективное покрытие более 50% площади (рис.8).

Размерность шкалы от 1 ко 2 баллу отражает пороговый уровень обилия для большинства сорных растений по их проективному покрытию (не выше 10-12%). Более детально оценить проективное покрытие позволяет шестибальная шкала (табл.15).

Для полной характеристики засоренности посевов учитывают потенциальную засоренность почвы семенами сорных растений.

Балл	а	б	в	г	%
I					10
II					25
III					50
IV					>50

Рис.8. Шкала глазомерной оценки засоренности по проективному покрытию сорняками поверхности почвы (в баллах и процентах): а и б - равномерное рассеивание сорняков на площади, в - очаговое произрастание, г - сплошное произрастание

Таблица 15. Шкала покрытия почвы сорняками (в баллах)

Баллы	Степень покрытия почвы сорняками
1	Сорняки встречаются единично, степень покрытия близка к нулю, 1-3 сорняка на 10 м ²
2	Степень покрытия до 5%, 3-5 сорняков на 1 м ²
3	Степень покрытия 5-20%, 5-15 сорняков на 1 м ² , культурные растения доминируют над сорняками
4	Степень покрытия 20-50%, 20-30 сорняков на 1 м ² , культурные растения еще доминируют над сорняками
5	Степень покрытия 50-70%, число сорняков равно или больше числа культурных растений, культура под угрозой
6	Степень покрытия 75-100%, сплошное засорение, сорняки значительно преобладают над культурными растениями

Почвенные пробы отбирают из пахотного горизонта почвенным буром диаметром 3.5-5.0 см. в 4-5-кратной повторности в 5-10 местах поля (всего от 20 до 50 проб) осенью после вспашки и ранней весной. При отсутствии бура пробы берут лопатой площадью 20×25 см. Пробы промывают через сито с диаметром отверстий 0.25 мм. Оставшуюся на сите массу, состоящую из крупных частиц почвы, семян сорняков, растительных остатков, разделяют с помощью насыщенных растворов пищевой соли или поташа, в которых семена сорняков и растительные остатки всплывают. Отделенную таким способом фракцию высушивают и выбирают семена сорняков. Семена разбирают по видам, подсчитывают их количество и пересчитывают (с учетом площади бура или лопаты) на 1 м² и на гектар. Число всхожих семян определяют путем проращивания в чашках Петри на фильтровальной бумаге.

Запас органов вегетативного размножения сорняков в почве оценивают путем раскопок на площадках 0.5×2 м, проводимых в местах взятия проб на засоренность почвы семенами сорняков. При засоренности корневищными сорняками корневища выбирают на

глубину 20-35 см в зависимости от видового состава сорняков. Корни и корневища выбирают из почвы вручную, затем определяют их длину, массу и число почек возобновления.

Установив количество семян и оценив запас органов вегетативного размножения в почве, прогнозируют засоренность полей в будущем году и заранее планируют мероприятия по уничтожению сорных растений.

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (Биологический контроль)

Оценка состояния сельскохозяйственных культур (биологический контроль) в процессе вегетации в сочетании с определением степени развития вредных и полезных организмов позволяет принимать обоснованные решения о конкретных мерах (агротехнических или защитных), поддерживающих продуктивность растений на высоком уровне.

Состояние посевов определяют по скорости прохождения фаз развития растений (фенология), по густоте стеблестоя, накоплению биомассы и по конечной их продуктивности. Определение этих показателей на разных этапах развития растений входит составной частью в комплексный биологический контроль посевов. Сущность биологического контроля заключается в получении информации с помощью морфофизиологического анализа о формировании элементов продуктивности в течение вегетации сельскохозяйственных культур. Биологический контроль дополняют производственно-экологической характеристикой поля, что позволяет составить представление о состоянии посева в данном сезоне с учетом благоприятных и неблагоприятных условий, повлиявших на формирование урожая.

С помощью морфофизиологического анализа определяют узловы́е моменты в онтогенезе злаков, когда целесообразно применять азотные подкормки. В основе анализа лежит деление онтогенеза растений на двенадцать этапов, отражающих процесс формирования продуктивности злаковых растений, который условно делят на 4 периода. В первый период (I-II этапы, всходы - третий лист) закладывается количество побегов кущения, количество зародышевых и узловых корней. У озимых злаков первый период длится в течение осени и зимы. Во второй период (III-IV этапы, кущение - начало выхода в трубку) формируются колоски в колосе. Колебания в числе колосков невелики. В течение третьего периода (V-IX этапы, выход в трубку - цветение) формируются цветки в колосках. В четвертом периоде (X-XII этапы, формирование зерновки - полная спелость) формируются, наливаются и созревают зерна. В этот период окончательно устанавливается выполненность зерновки, о чем судят по массе 1000 зерен.

При проведении биологического контроля первые обследования

озимых культур проводят сразу после появления полных всходов, когда устанавливают полевую всхожесть и густоту стояния растений. Подсчет всходов проводят в местах будущих учетных точек или постоянных площадок на отрезках рядков по 0.5 м. Второе обследование посевов проводят перед прекращением осенней вегетации растений. Потенциальную продуктивность учитывают по количеству развитых побегов. Предварительно намечают срок и дозу первой весенней подкормки азотом. Третье обследование проводят в начале весенней вегетации, когда устанавливают количество перезимовавших растений и побегов, этап развития и фазу роста. Определяют необходимость обработки посевов туром для загущенных посевов. Посевы озимых культур на полях с низким плодородием почвы после малоценных предшественников, а также изреженные посевы, недостаточно развитые с осени, подкармливают азотными удобрениями (20-40 кг/га).

Следующее обследование проводят на III-IV этапе органогенеза (кущение - начало выхода в трубку). Основу этого обследования составляет листовая диагностика условий минерального питания растений, для чего в каждой учетной точке поля или рядом с постоянными площадками срезают растения у поверхности почвы. Количество растений в каждой точке подбирается с таким расчетом, чтобы масса общей пробы с поля составила 100 г. Растительные образцы с этикетками помещают в полиэтиленовые мешочки. В лаборатории определяют содержание в них сухого вещества, общего азота, фосфора и калия. Для озимой пшеницы оптимальный показатель содержания азота 5.0-5.5%, фосфора 0.55-0.60% от сухого вещества. В этот период и на хорошо развитых посевах рекомендуется подкормка азотными удобрениями, которая способствует выживанию продуктивного стеблестоя с мощными многоколосковыми колосьями.

Одновременно с листовой диагностикой определяют продуктивную кустистость и количество продуктивных стеблей на 1 м².

На V-VI этапах органогенеза (выход в трубку - начало колошения) повторяют листовую диагностику.

На посевах, предназначенных для получения сильного зерна, проводят тканевую диагностику. С этой целью в учетных точках поля или рядом с постоянными площадками срезают общей сложностью 100-120 растений, из которых отбирают 20 продуктивных стеблей. Тканевую диагностику проводят с помощью полевой экспресс-лаборатории ОАП-1. На каждом стебле выше второго междоузлия на 10-15 мм вырезается пластинка стебля толщиной 1.5-2.0 мм. На кусочек стебля, положенный на предметное стекло, пипеткой наносят каплю 1%-раствора дифениламина. Затем сверху накладывают другое предметное стекло и легким нажимом выдавливают сок. Полученную окраску от взаимодействия сока с дифениламином сравнивают с эталонной цветной шкалой и определяют оценочный балл каждого стебля. Затем баллы суммируют и делят на общее количе-

ство стеблей (20). По среднему баллу устанавливают необходимость проведения внекорневых подкормок. Если средний балл ниже 3.5, подкормки нецелесообразны, так как получить сильную пшеницу на таком посеве невозможно. При среднем балле 3.5-4.5 требуются две подкормки: во время колошения-цветения и налива зерна, при 4.5-5.5 - требуется одна подкормка, если средний балл выше 5.5 - подкормки не требуются.

Период V-VIII этапов органогенеза (выход в трубку - колошение) считается критическим для злаков. В это время происходит максимальный прирост биомассы, а потому проявляется наибольшая потребность в элементах питания. В частности, в этот период накапливается около 50% азота. На V этапе органогенеза (выход в трубку) устанавливают потенциальную продуктивность пшеницы по количеству заложившихся цветков. Подкормка азотом на этом и более ранних этапах способствует формированию не 2-3, а 4-5 цветков в колоске.

На VII-IX этапах органогенеза (колошение - цветение) вновь проводят листовую диагностику, но для анализа берут только три верхних листа нормально развитых главных и вторичных стеблей. Внесение азотных удобрений в этот период понижает редукцию цветков, то есть увеличивает озерненность колоса, повышает массу зерновки и качество зерна.

Для получения динамических характеристик накопления биомассы необходимо брать пробы в следующие сроки:

- 1 - перед уходом растений в зиму,
- 2 - при весеннем возобновлении вегетации,
- 3 - на V-VI этапах органогенеза (выход в трубку),
- 4 - на VIII-IX этапах органогенеза (цветение),
- 5 - на XI-XII этапах органогенеза (восковая спелость).

Пробы берут в точках проведения учетов или рядом с постоянными площадками. В каждой точке срезают по несколько растений (обязательно с узлом куцения) с таким расчетом, чтобы получить сноп из 100-150 растений. Отбор растений проводят утром в одно и то же время. Растения помещают в бумажный пакет и в лаборатории высушивают до постоянного веса. Полученные показатели используют для построения кривых накопления биомассы растениями в процессе онтогенеза, которые показывают влияние экологических факторов на развитие растений и позволяют прогнозировать урожай. Важное значение имеет наличие таких кривых при создании математических моделей продукционного процесса.

На последних этапах органогенеза в период полной спелости устанавливают реальную (биологическую) продуктивность посева по количеству продуктивных стеблей и массе зерновок с каждого колоса и всего растения. С этой целью за несколько дней до уборки урожая, когда влажность зерна близка к 30%, в точках учетов берут по несколько растений с расчетом получения пробного снопа в 100-120

экземпляров. 20 из них используют для оценки структуры урожая. Остальные высушивают до воздушно-сухого состояния и определяют продуктивность в пересчете на одно растение. Описание структуры урожая проводят по следующей форме:

Высота расте- ний, см	Число			Количество в				Масса 1000 зерен
	побегов общих	кущения продук- тивных	сухих	главном колос- ков	боковых зерно- вок	колос- ков	боковых зерно- вок	

При работе с постоянными площадками анализ урожая - очень важный момент, позволяющий оценить влияние на продуктивность растений вредных организмов, поэтому каждую площадку убирают отдельно и анализируют все растения.

Потенциальную продуктивность определяют по результатам учетов показателей элементов продуктивности:

- 1 - количеству растений и стеблей на единицу площади на II этапе органогенеза,
- 2 - количеству колосков в колосе на IV-V этапах,
- 3 - количеству развитых цветков в колосках на VII-VIII этапах,
- 4 - количеству зерновок и их массе на XI-XII этапах.

По результатам этих учетов определяют потенциальную продуктивность по формуле:

$$Y = K \times Z \times B \times C,$$

где Y - потенциальный урожай, K - количество колосков в колосе, Z - количество развитых цветков, B - масса одной зерновки, C - количество продуктивных стеблей на 1 м^2 .

Сопоставление потенциальной и реальной продуктивности позволяет установить недобор урожая. Сравнивая расчетный потенциал продуктивности на разных этапах органогенеза с реальной урожайностью и учитывая метеорологические и другие условия на каждом этапе, можно установить, на каком этапе и за счет каких элементов происходила редукция продуктивности, и подойти к пониманию причин потерь урожая. Сокращение разрыва между потенциальной и реальной продуктивностью - основная задача агробиологического контроля за формированием урожая.

Биологический контроль за развитием яровых культур отличается от контроля за озимыми только тем, что первое обследование проводят весной после появления полных всходов, когда делают те же учеты, что и во время первого (осеннего) обследования озимых культур. В дальнейшем обследования яровых культур не отличаются от обследований озимых.

Многолетнее применение биологического контроля позволяет вскрыть причины получения варьирующих по годам показателей урожайности и давать дифференцированную по этапам органогенеза оценку агроприемов и воздействия вредных организмов на сельскохозяйственные растения.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННОСТИ РАСТЕНИЙ И ПОТЕРЬ УРОЖАЯ

Для характеристики фитосанитарного состояния посева и прогнозирования его продуктивности большое значение имеет оценка поврежденности растений и потерь урожая. Если интенсивность развития болезни в значительной мере характеризует степень поражения растений, то плотность популяции вредителей не всегда прямо связана с поврежденностью. В этой связи помимо количественных учетов членистоногих необходимо установить внешние признаки их воздействия на растения.

Принципы определения поврежденности/пораженности растений вредителями и болезнями

Формы повреждения или поражения растений вредителями и болезнями разнообразны: утрата части листовой поверхности, травмирование стеблей, уничтожение репродуктивных органов и др. Большинство типов повреждений не служат показателями степени снижения урожая. Однако, без их количественной характеристики нельзя оценить фитосанитарное состояние посева.

Поврежденность/пораженность полей вредителями или болезнями, вызывающую гибель растений и ведущую к изреженности посева, оценивают либо в процентах, либо в баллах. Приняты следующие градации баллов:

- 0 - погибших растений нет,
- 1 - слабая изреженность (погибло до 25% растений),
- 2 - средняя изреженность (погибло 26-50% растений),
- 3 - сильная изреженность (погибло более 50% растений).

При частичном объедании листьев степень поврежденности листовой поверхности определяют по следующей балльной шкале:

- 0 - повреждения отсутствуют,
- 1 - слабая поврежденность (уничтожено до 5% листовой поверхности), 2 - средняя поврежденность (уничтожено 6-25% листовой поверхности),
- 3 - сильная поврежденность (уничтожено 26-50% листовой поверхности),
- 4 - очень сильная поврежденность (уничтожено более 50% листовой поверхности).

Заселенность вредителями или распространенность болезней оценивают по проценту поврежденных или пораженных болезнью растений или стеблей, причем, в последнем случае, следует разделять поврежденность главных и боковых стеблей.

При оценке поврежденности репродуктивных органов устанавливают процент поврежденных от общего числа просмотренных органов.

Поражение листьев, стеблей и репродуктивных органов растений болезнями оценивается по степени проявления заболевания (см. выше).

Установив показатель интенсивности повреждения вредителями или поражения болезнями в каждой учетной точке, путем объединения данных можно установить средний балл или процент поражения всего посева.

Принципы определения потерь урожая

Потери урожая - итоговый показатель фитосанитарного состояния посева. Учет потерь урожая в течение ряда лет позволяет оценить эффективность защиты растений не только в отдельные годы, но и установить тенденцию изменения потерь при многолетнем применении той или иной системы защиты растений.

При подборе методов оценки потерь урожая следует различать два типа воздействия вредных организмов на сельскохозяйственные растения: 1 - полное уничтожение растений и 2 - снижение продуктивности растений.

В первом случае недобор урожая определяют по проценту погибших растений, но при этом не учитывают возможность компенсации потерь на популяционном уровне, поэтому потери несколько завышаются. Если на поле можно взять пробы с неповрежденных участков, то учесть компенсацию позволяет использование формулы:

$$P = Ax - By,$$

где P - потери урожая, A - урожай растения с неповрежденного участка посева, B - то же с поврежденного участка, x - количество растений на единице площади неповрежденного участка, y - то же на поврежденном участке.

Во втором случае в зависимости от характера поражения или повреждения растений используют разные подходы. Наиболее просто рассчитать потери по формулам:

$$P = Ay - x, \tag{4}$$

где P - потери урожая, A - урожай неповрежденного растения, y - количество растений на единице площади, x - фактический урожай с единицы площади, или

$$P = Ay - Bx, \tag{5}$$

где P - потери урожая, A - урожай неповрежденного растения, B - урожай поврежденного растения, y - общее количество растений на единице площади, x - количество поврежденных растений.

Однако, с помощью этих формул верный результат можно получить только при отсутствии компенсации потерь за счет лучшего развития неповрежденных растений (компенсация популяционного уровня). Если популяция растений способна компенсировать потери, то применяют формулу:

$$P = (A - D)y - (B - A)x, \quad (6)$$

где P - потери урожая, A - урожай неповрежденного растения неповрежденной части посева, B - урожай неповрежденного растения поврежденной части посева, D - урожай поврежденного растения, x - количество неповрежденных растений на единице площади, y - количество поврежденных растений.

Значительно упростить оценку потерь урожая позволяет применение формулы:

$$P = 100(A - a)/A, \quad (7)$$

где P - потери урожая (%), A - урожай неповрежденного растения, a - средний урожай 1 растения на поле.

Пользуясь формулой (7), не надо учитывать степень развития вредных организмов на поле и выделять поврежденные растения. Основная трудность - отбор неповрежденных растений, особенно если следы вредного воздействия внешне проявляются недостаточно четко. Мало пригодна эта формула для определения потерь урожая от вредных организмов, проявляющих избирательность в отношении степени развития растений. Большое достоинство метода - возможность оценки влияния на урожай комплекса вредных организмов. Для этого надо лишь найти на поле растения, неповрежденные ни одним из вредных организмов. Средний урожай растения на поле аккумулирует влияние всего вредного комплекса, поэтому сопоставляя урожай неповрежденного растения со средним урожаем 1 растения, взятого без выбора, получаем потери от комплекса вредных организмов.

Ориентировочное представление о потерях урожая можно получить, используя показатели вредоносности. Для этого достаточно сопоставить результаты учетов степени развития вредных организмов после окончания вреда и показатели вредоносности последних.

Если на посеве вредила одновозрастная популяция насекомых, то потери определяют по формуле:

$$P = (A \times n)/10, \quad (8)$$

где P - потери урожая (ц/га), A - потери от 1 особи вредителя (г), n - численность вредителя (m^2).

Если растения повреждала разновозрастная популяция, то для определения потерь надо знать вредоносность каждого возраста.

Расчеты проводят по формуле:

$$P = \Sigma(A \times n) / 10, \quad (9)$$

где P - потери урожая (ц/га), n - количество вредителей каждого возраста, A - показатель вредоносности соответствующего возраста.

Для оценки потерь урожая от болезней растений расчеты ведут по шкалам пораженности (см. выше) при учтенной конечной степени развития болезни.

Потери урожая от комплекса вредных организмов можно оценить, суммируя потери от каждого из них. Такой подход дает приемлемые результаты, когда показатели вредоносности отдельных видов невысоки (не более 10%). При более высоких показателях простое суммирование дает неверный результат, так как не учитывается взаимодействие вредных видов.

Используя показатели вредоносности, можно прогнозировать потери урожая по результатам наблюдений за развитием вредных организмов в течение вегетации зерновых культур.

Оценка потерь урожая от вредных насекомых

Вредная черепашка. Потери урожая вызывают весной перезимовавшие клопы, летом - личинки и имаго нового поколения. Перезимовавшие клопы отрицательно влияют на количественные показатели урожая, причем чем раньше наносится повреждение, тем полнее растения компенсируют его воздействие на урожай (табл.16).

Таблица 16. Вредоносность перезимовавших клопов вредной черепашки в зависимости от фазы развития пшеницы во время повреждения

Признак	Фазы развития пшеницы		
	Кущение	Выход в трубку	Рост стебля
Потери урожая от 1 клопа (г)	3	4	8

Потери урожая прогнозируют по формуле (8).

Одна особь нового поколения за время развития личинки до окончания питания имаго в среднем повреждает около 50 зерен, что составляет 0.5-0.7% зерен (в зависимости от величины урожая) при плотности популяции 1 особь/м². Снижение качества зерна проявляется при повреждении 2-5% зерен. По результатам учетов молодых личинок прогнозируют ожидаемую поврежденность зерна. Использовать показатели вредоносности для определения поврежденности зерна по численности вредной черепашки перед уборкой урожая нецелесообразно, так как проще и вернее это сделать, отобрав пробы

зерна во время уборки.

Серая зерновая совка. Вредоспособность гусениц совки быстро увеличивается по мере их роста и развития (табл.17).

Таблица 17. Вредоспособность гусениц зерновой совки

Признак	Возраст гусениц						
	1-П	Ш	1У	У	У1	УП	УШ
Потери зерна от 1 гусеницы (мг)	10	25	70	152	283	488	1367

Прогнозируя потери урожая по результатам учета молодых гусениц в начале молочной спелости посева, следует учитывать естественную смертность гусениц, которая, в среднем, близка к 50%, и ожидаемые сроки уборки урожая. При ранней уборке на полях преобладают гусеницы пятого возраста, вредоносность которых невелика. Запаздывание с уборочными работами влечет за собой быстрое нарастание потерь. Учет гусениц перед уборкой позволяет определить потери по вышеприведенной формуле оценки потерь урожая для разновозрастной популяции (9). Определение потерь по проценту поврежденных зерен в пробах зерна не дает надежных показателей, так как значительная часть сильно поврежденных зерен теряется во время уборки (более 50%), поэтому реальные потери бывают в 2-3 раза выше учтенных.

Хлебная жужелица. Основную опасность представляют личинки, вызывающие изреженность посевов. Степень изреженности зависит от плотности популяции вредителя, фазы развития растений и густоты посева. При плотности популяции 1 личинка/м² изреженность посева показана в таблице 18.

Таблица 18. Изреженность посева (%) в зависимости от фазы развития пшеницы, густоты стеблестоя и возраста личинок хлебной жужелицы

Фазы развития пшеницы	Стеблей/м ²	Возраст личинок		
		1	2	3
Всходы	200-300	3	10	25
	400-600	1	3	8
Всходы - 3-й лист	200-300	1	6	10
	400-600	0.3	1	3
Кущение осенью	200-300	0.5	2	5
	400-600	0.1	0.5	1

Установив плотность популяции жужелицы, прогнозируют конечную изреженность посева, а по ней - потери урожая:

Изреженность (%)	Потери (%)	Изреженность (%)	Потери (%)
5	1.8	30	26.2
10	7.2	50	49.1
20	13.5	-	-

Определить потери урожая по изреженности посева перед уборкой нельзя, поскольку неизвестно, в какой степени изреженность связана именно с личинками жужелицы.

Злаковые тли. Из-за динамичности развития популяций тлей прогнозировать потери урожая по результатам отдельных учетов нецелесообразно. Наиболее надежные показатели могут быть получены при систематических наблюдениях по средней численности тлей в 2-3 последних учетах с использованием шкалы (табл.19).

Таблица 19. Вредоспособность злаковой тли в зависимости от вида пшеницы и погоды

Условия сезона	Потери массы зерна от 1 тли (мг)	
	Мягкая пшеница	Твердая пшеница
Засушливые	7	9
Средние	6	7
Влажные	3	4

Расчеты ведут по формуле:

$$P = (A \times n \times y) / 10000,$$

где P - потери урожая (ц/га), A - потери от 1 тли (мг), n - тлей на колосе, y - колосьев на 1 м².

Хлебные жуки. Жуки очень подвижны и легко перемещаются по полю, поэтому для получения надежных показателей плотности популяции следует взять среднее из 2-3 учетов. Поскольку 1 жук снижает урожай в среднем на 200 мг, потери подсчитывают по формуле:

$$P = 200 \times n \times z,$$

где P - потери (г/м²), n - средневзвешенная численность жуков на м², z - продолжительность питания жуков на посевах (сутки).

Кроме того, потери урожая по культурам можно установить по следующим показателям:

Культуры	Потери от 1 жука (г/м ²)	Культуры	Потери от 1 жука (г/м ²)
Озимая рожь	1.8	Озимая пшеница	3.1
Ячмень	2.1	Яровая пшеница	5.7

Перед уборкой урожая потери определяют, сопоставляя урожай поврежденных и неповрежденных растений по формулам (4) или (5).

Пьявица. Потери урожая от жуков пьявицы определяют по проценту поврежденной листовой поверхности. При повреждении более 50% потери урожая близки к 10-15%. При повреждении 75-100% озимая пшеница теряет около 20% урожая, а овес - до 67%. При по-

вреждении флаг-листа на 75-100% урожайность снижается на 10-13%. Потери урожая от личинок пьявицы прогнозируют либо по проценту повреждения листьев, либо по численности личинок:

Личинок на 1 стебель	Потери урожая (%)
0.5	1-2
1.0	3-4
1,5	6-7
2.0	8-10

Перед уборкой урожая потери определяют, сопоставляя урожай поврежденных и неповрежденных растений по формулам (4) или (5).

Внутристеблевые вредители. Повреждение растений на фазе 1-2 листьев ведет к их гибели, что частично компенсируется за счет лучшего развития сохранившихся растений. Потери урожая прогнозируются по степени изреженности посева с учетом того, что изреженность до 30% компенсируется посевом, или пользуясь формулой (6). Потери урожая поврежденных, но не погибших растений, оценивают в зависимости от характера повреждения. Если поврежден главный стебель, то урожай снижается на 50%, если - боковой, то на 15%. Потери урожая устанавливают по формуле:

$$P = (50x - 15y) / 100,$$

где P - потери (%), x - процент поврежденных главных стеблей, y - процент поврежденных боковых стеблей.

Если учтены поврежденные растения без разделения стеблей, то потери урожая можно оценить по коэффициенту вредоносности, равному примерно 30%. Установить потери перед уборкой трудно, так как поврежденные растения к этому времени теряются.

Хлебные пилильщики. Потери урожая оцениваются по проценту заселенных личинками стеблей. Снижение массы зерна поврежденных стеблей колеблется в широких пределах, но в среднем близко к 10-15%. Перемножив один из этих показателей на процент заселенных стеблей, получаем потери урожая. Сделать это можно либо по результатам учета личинок, либо после уборки урожая по проценту заселенных личинками стеблей стерни.

Пшеничный трипс. Потери урожая определяют по результатам учета личинок, принимая во внимание тесную зависимость их вредоносности от погоды и скороспелости сорта пшеницы:

Скороспелость, погода	Потери массы зерна от 1 личинки (мг)
Скороспелые сорта или засушливое лето	0.5
Среднеспелые сорта или умеренно теплое лето	1.0
Позднеспелые сорта или холодное влажное лето	2.0

Потери урожая определяют по формуле:

$$P = A \times n \times z,$$

где P - потери урожая, A - потери массы зерна от 1 личинки, n - личинок на 1 колосе, z - колосьев на единице площади.

Оценка потерь урожая от болезней растений

Прогнозирование потерь урожая от болезней основывается на прогнозе развития болезни в зависимости от погодных условий года. Установив интенсивность развития болезни на данный период, по состоянию погоды прогнозируют ее конечное развитие и соответствующие потери урожая.

Корневые гнили. Недобор урожая определяют путем учета изреживания посева и снижения продуктивности пораженных болезнью, но не погибших стеблей (мягкая пшеница) (табл.20).

Таблица 20. Потери урожая от изреживания посева и снижение продуктивности стеблей пшеницы, пораженных корневой гнилью

Погибло всходов (%)	Потери урожая (%)		Балл поражения растений	Снижение урожая больных стеблей (%)	
	Неблагоприятный год	Обычный год		Неблагоприятный год	Обычный год
10	5	0	1	5	0
25	10	5	2		
40	35	15	3	50	35

Для оценки потерь урожая в зависимости от степени развития корневой гнили применяется следующая шкала (табл.21).

Таблица 21. Шкала потерь урожая пшеницы в зависимости от развития корневой гнили

Развитие болезни (%)	Потери урожая (%)	Развитие болезни (%)	Потери урожая (%)
11 - 16	0 - 5	32 - 36	11 - 23
17 - 21	3 - 9	37 - 41	13 - 27
22 - 26	6 - 14	42 - 46	16 - 32
27 - 31	8 - 18	47 - 51	18 - 36

На твердой пшенице потери урожая на 15-20% выше. Например, если потери урожая мягкой пшеницы составляют 10%, то твердая пшеница потеряет 12%.

Мучнистая роса. На озимых культурах на вредоносность муч-

нистой росы большое влияние оказывает степень ее развития осенью или в начале весны. В весенне-летний период максимальное проявление болезни наблюдается в период колошения - цветения. По этому показателю потери урожая устанавливают по шкале (табл.22).

Таблица 22. Шкала потерь урожая от мучнистой росы

Максимальное развитие болезни (%)	Потери урожая (%)				
	Яровая пшеница	Озимая пшеница Развитие осенью		Озимая рожь Развитие весной	
		слабое (10-15%)	сильное (20-30%)	слабое (1-10%)	сильное (30-40%)
20	8.0	9.0	12.0	0.0	0.0
30	10.5	11.0	14.0	0.0	3.5
40	13.0	13.0	16.0	0.0	7.5
50	15.5	15.0	18.0	2.5	13.0
60	18.0	16.5	20.0	8.0	18.0
70	21.0	-	-	13.0	23.5
80	-	-	-	18.5	30.0
90	-	-	-	24.0	34.5

Сильное поражение (30-75%) осенью прикорневых и нижних стеблевых листьев озимых культур обуславливает во время зимовки гибель растений на 10-40%. Потери урожая ячменя на каждый процент развития мучнистой росы после 20% колеблются от 0.5 до 0.8% в зависимости от условий года.

Ржавчина. Потери урожая от ржавчины зависят от интенсивности ее развития и от срока первичного поражения. Потери урожая пшеницы от бурой и желтой ржавчины определяют по шкале (табл.23).

Таблица 23. Шкала потерь от бурой и желтой ржавчины в зависимости от фазы развития пшеницы в начале поражения

Конечное развитие болезни (%)	Потери урожая (%) при сроках первичного поражения:				
	Бурая ржавчина			Желтая ржавчина	
	Колошение	Цветение	Молочная спелость	Колошение	Налив зерна
5	0.7	0.2	-	0.0	0.0
10	3.0	1.0	0.0	6.0	3.4
20	7.8	2.3	0.8	12.0	5.8
40	20.0	10.0	3.0	24.0	13.3
60	32.0	18.0	8.8	36.0	22.2
80	41.5	26.5	14.4	48.0	28.5
100	50.0	35.0	20.0	60.0	33.0

Если желтая ржавчина поражает колосья пшеницы, то потери урожая определяют по следующей шкале:

Интенсивность поражения колосьев		Потери урожая
Баллы	%	(%)
1	1-25	2.6
2	26-50	17.9
3	51-75	23.2
4	76-100	29.6

Для оценки потерь урожая пшеницы целесообразно учитывать степень проявления болезни в начале колошения и в период полной спелости зерна (табл.24).

Таблица 24. Потери урожая в зависимости от степени развития ржавчины в начале колошения и в период полной спелости пшеницы

Развитие болезни в начале колошения (%)	Потери урожая (%) при проявлении болезни в фазу полной спелости зерна (%)		
	0	5	10
10	5	12	20
20	9	17	24
40	18	26	34
60	27	35	43
80	36	44	52
100	45	53	61

Заметное снижение урожая озимой ржи от бурой ржавчины проявляется при степени развития болезни в период колошения 40% и выше, а на более позднем этапе (молочная спелость) даже сильное проявление болезни не оказывает существенного влияния на урожай (табл.25).

Таблица 25. Потери урожая в зависимости от фазы развития озимой ржи во время максимального развития бурой ржавчины

Развитие болезни (%)	Потери урожая (%) при развитии болезни в фазу	
	колошения	молочной спелости
10-24	0.5	2.0
25-39	13.8	4.0
40-65	25.5	2.2
> 65	29.4	1.6

Потери урожая овса от корончатой ржавчины определяют по шкале:

Развитие болезни (%)	Потери урожая (%)	Развитие болезни (%)	Потери урожая (%)
10	2.6	60	14.6
20	7.2	80	16.5
40	11.9	100	17.9

Листовые пятнистости. Потери урожая пшеницы от септориоза определяют по шкале (в скобках - возможные колебания):

Развитие болезни (%) на флаг-листе	Потери урожае (%)	Развитие болезни (%) на флаг-листе	Потери урожае (%)
< 30	10 (9-14)	51-75	30 (16-50)
31-50	20 (10-36)	> 75	40 (32-55)

Для определения потерь урожая озимой ржи и ячменя от ринхоспориоза можно воспользоваться шкалой (табл.26).

Таблица 26. Потери урожая в зависимости от степени развития ринхоспориоза на фазе колошения озимой ржи и ячменя

Развитие болезни в фазу колошения (%)	Потери урожая (%)		
	Озимая рожь	Озимый ячмень	Яровой ячмень
10	0.0	0.0	3.0
20	9.9	11.2	7.3
30	15.4	17.1	11.7
40	20.9	23.0	16.1
50	26.4	28.9	20.5
60	29.1	34.8	24.9

Потери урожая от сетчатой пятнистости ячменя определяют по шкале (табл.27).

Таблица 27. Потери урожая в зависимости от развития сетчатой пятнистости ячменя и фазы развития растений

Развитие болезни (%)	Потери урожая (%) при развитии болезни в фазы	
	Выхода в трубку	Колошения
5	8.7	3.0
10	15.8	6.2
15	22.9	9.4
20	30.0	12.6
25	37.1	-

Головневые заболевания. При учете потерь урожая от головневых заболеваний следует иметь в виду, что полная вредоносность этих болезней складывается из явных и скрытых потерь, причем чем сильнее поражение, тем слабее проявляются скрытые потери. Недобор урожая зерновых культур (пшеница, рожь, ячмень, овес) от головневых заболеваний с учетом скрытых потерь устанавливают по шкале (табл.28).

Оценка потерь урожая от сорняков

Потери урожая от комплекса сорняков определяют либо по их количеству на единице площади, либо по проценту засоренности. В первом случае пользуются шкалой (табл.29).

Таблица 28. Шкала потерь урожая от головневых заболеваний

Проявление головни (%)	Потери урожая (ц/га)	
	Озимые культуры	Яровые культуры
0.10	0.11	0.19
0.25	0.24	0.41
0.50	0.44	0.80
0.75	0.57	1.04
1.00	0.64	1.20
1.50	0.75	1.25
2.00	0.82	1.31
2.50	0.86	1.34
3.00	0.91	1.38

Таблица 29. Шкала потерь урожая от сорняков

Культура	Потери урожая (%) при числе сорняков на 1 м ²							
	5	10	15	25	50	75	100	200
Озимая пшеница	1.9	3.6	5.3	8.6	15.8	22.0	27.1	41.0
Яровая пшеница	1.8	3.4	5.1	8.3	15.7	22.0	27.6	43.9
Ячмень	1.5	3.1	4.7	7.4	13.5	18.8	23.2	34.9

Если в качестве показателя используют процент засоренности, то при увеличении засоренности на 1% процент потерь урожая будет равен:

Озимая пшеница	0.50	Яровой ячмень	0.25
Яровая пшеница	0.25	Овес	0.25
Озимая рожь	0.33	Зерновые	0.50
Озимый ячмень	0.33	(в среднем)	

Снижение урожая зерновых культур от отдельных видов сорняков определяют по шкале (табл.30).

Таблица 30. Потери урожая от разных видов сорняков

Виды сорняков	Снижение урожая (%)	
	в расчете на единицу показателя засоренности 1 сорняк/м ²	1% проективного покрытия почвы
Подмаренник цепкий	1.16	0.69
Редька дикая	1.85	0.98
Мокрица	0.69	1.19
Горец (виды)	1.79	0.54
Пикульник	1.47	1.09
Ромашка непахучая	3.13	0.94
Овсюг	0.26	0.61
Метлица	3.13	1.56
Кострец	0.26	0.70
Райграс	0.40	0.80

ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОРОГИ ВРЕДНОСТИ

В современной защите растений преобладает использование средств активного подавления вредных организмов. Применение их небезопасно для окружающей среды и связано с определенными расходами. Поэтому важно учитывать, насколько целесообразно их применение при том или ином уровне заселенности (пораженности) посева вредным объектом. Естественно, что размеры возможных потерь следует предвидеть до того, как они будут причинены вредным видом посеву. Прогнозировать потери можно, сопоставив результаты учета степени развития вредного вида и показателей его вредности (см. выше) или используя экономические пороги вредности. В нижеследующих таблицах (31-33) приведены рекомендованные для Российской Федерации экономические пороги вредности вредителей, болезней и сорняков зерновых культур.

Таблица 31. Экономические пороги вредности основных вредителей зерновых культур

Вредители	Фаза растения в период учетов и обработок	Экономический порог вредности
Вредная черепашка Клопы	Кущение	Озимая пшеница: 1.5-2.0 перезимовавших клопа/м ² , при сухой весне - 1 клоп/м ² Яровая пшеница: 1-2 перезимовав. клопа/м ² , в засушливые годы - 0.5 клопа/м ²
	Личинки	8-10 личинок/м ²
Хлебная жужелица	Молочная спелость	5-6 личинок/м ² на обычных посевах, 2 лич/м ² на сильной и твердой пшенице
	Всходы	1-4 личинки/м ²
	Кущение, осень	3-6 личинок/м ²
Пьявица	Отрастание озимых весной	3-5 личинок/м ²
	Кущение - выход в трубку	40-50 жуков/м ²
Злаковые тли	Выход в трубку	0.5-1.0 личинка/стебель или повреждение 15% листовой поверхности
	Колошение	10 тлей/стебель или заселение 50% стеблей
	Налив зерна	5-10 тлей/колос или 50 тлей/10 взмахов сачком 20-30 тлей/колос
Хлебные жуки	Цветение - налив зерна	3-5 жуков/м ²
Злаковые мухи (шведская муха, зеленоглазка, меромиза)	Всходы - кущение	40-50 мух/100 взмахов сачком или 6-10% поврежденных главных стеблей в начале лета мух
	Озимая муха	Всходы - кущение озимых
	Отрастание озимых весной	10% поврежденных главных стеблей

Гессенская муха	Всходы, кущение	10-15 жизнеспособных пупариев/м ² , 20% стеблей с яйцами мухи, 5-10% поврежденных стеблей в начале кущения или 30-50 мух/100 взмахов сачком
Стеблевые блохи	Кущение	30 жуков/100 взмахов сачком или 10% поврежденных стеблей в начале заселения посева
Хлебный пилильщик	Колошение	40-50 имаго/100 взмахов сачком
Злаковая листовертка	Кущение - выход в трубку	50-60 гусениц/м ²
Проволочники	Перед посевом	10-12 личинок/м ²
Озимая совка	Всходы	Озимая пшеница: 3-5 гусениц/м ² Озимая рожь: 5-8 гусениц/м ²
Нестадные саранчовые	Всходы - кущение	5-10 особей/м ²
Хлебная полосатая блоха	Всходы - кущение	30 блох/10 взмахов сачком или 25-65 жуков/м ² (чем хуже состояние всходов, тем ниже порог)
Серая зерновая совка	Налив зерна	Обычные посевы: 20 гусениц/100 колосьев (во влажные годы - 10, в сухие - 30 гусениц/100 колосьев) Семенные посевы: 10 гусениц/100 колосьев (во влажные годы 6-8 гусениц, в сухие - 10-20 гусениц/100 колосьев)
Пшеничный трипс	Выход в трубку	8-10 имаго/стебель или 30 имаго/10 взмахов сачком
	Формирование зерна	40-50 личинок/колос
Луговая совка	Всходы - кущение	8-10 гусениц/м ²
Злаковые цикады	Колошение	100 цикад/5 взмахов сачком
Комплекс второстепенных вредителей (цикады, хлебные клопки, тли)	Цветение	100-150 экз./10 взмахов сачком
Мышевидные грызуны	Всходы - кущение озимых	10 колоний или 50-100 жилых нор/га
	Отрастание - колошение озимых весной	5-15 колоний или 75-100 жилых нор/га
	Всходы - кущение яровых	10 колоний или 50 жилых нор/га
Суслики	Отрастание - колошение	Озимые и яровые культуры: 5 сусликов или 20-30 жилых нор/га
Овсяная нематода	В начале вегетации	Овес: 1 яйцо/г почвы Ячмень, пшеница: 3 яйца/г почвы

Таблица 32. Экономические пороги вредоносности
основных болезней зерновых культур

Болезни	Фаза растения в период учетов и обработок	Экономический порог вредоносности
Снежная плесень озимых	Кущение (весной)	20% пораженных растений
Гельминтоспориозная гниль яровой пшеницы	Перед посевом	15-20 конидий в 1 г воздушно-сухой почвы (чернозем южный и южно-солонцеватый) 50-60 конидий в 1 г воздушно-сухой почвы (чернозем луговой и обыкновенный)
ярового ячменя		12% инфицированных семян (засушливые годы) 34% инфицированных семян (влажные годы)
Гельминтоспориозно-фузариозная гниль зерновых	Перед посевом	10-15% зараженности семян патогенным комплексом
Мучнистая роса пшеница	Начало вегетации	5% пораженных растений
ячмень	Начало вегетации	3-5% пораженных растений (при прогнозе эпифитотии)
рожь	Колошение	15-20% развития болезни
Ржавчина бурая хлебных злаков	Колошение	20% развития болезни
	Колошение	30% развития болезни
стеблевая	Начало вегетации	3-5% пораженных растений (при прогнозе эпифитотии)
желтая	Колошение	3-5% пораженных растений (при прогнозе эпифитотии)
карликовая	Колошение	10% развития болезни
Септориоз листьев пшеницы	Молочная спелость	40% развития болезни
	Колошение	5% развития болезни
	Цветение	30% развития болезни
Сетчатая пятнистость ячменя	Молочная спелость	40% развития болезни
Ринхоспориоз ржи и ячменя	Начало вегетации	3-5% пораженных растений (при прогнозе эпифитотии)
Головневые заболевания	Выход в трубку	10% развития болезни
Комплекс аэрогенных инфекций (ржавчина, мучнистая роса, пятнистости листьев)	Флаговый лист - цветение	15-20% развития болезни в среднем на лист или 30% - на 3-м листе сверху
	Выход в трубку	5% развития болезни
	Колошение - цветение	10-20% развития болезни
	Выход в трубку - колошение	10-20% развития болезни
	Полная спелость	0.2-0.3% пораженных колосьев
	Выход в трубку	Первые признаки появления любого заболевания (при прогнозе эпифитотии)
	Колошение - цветение	Развитие болезней в пределах 10% в среднем на лист

Таблица 33. Экономические пороги вредоносности (ЭПВ) основных сорняков зерновых культур (экз./м² в фазу кущения)

Виды сорняков	ЭПВ	Виды сорняков	ЭПВ
Латук татарский	3	Мак-самосейка	36
Пырей ползучий	3-6	Ежовник обыкновенный (куриное просо)	40-50
Ромашка непахучая	5	Торица полевая	50-70
Дескурения Софии	5	Ярутка полевая	50-70
Аистник цикутный	6	Звездчатка средняя	70-100
Гречища татарская	7	Виды щетинника	125
Гречишка вьюнковая	7	Бодяк щетинистый	1-3 розетки/м ²
Вьюнок полевой	5-8	Бодяк полевой	2-3 розетки/м ²
Дымянка Шлейхера	10	Осот полевой	2-4 розетки/м ²
Хориспора тонкая	11	Комплекс однолетних двудольных сорняков	
Горчица полевая	12	в посевах	
Подмаренник цепкий	4-14	озимой пшеницы	20
Щирица колосистая	12-15	яровой пшеницы	15-18
Овсюг обыкновенный	10-16	ячменя	30-40
Марь белая	9-18	Зерновые колосовые	7% проектив- ного покрытия почвы
Метлица обыкновенная	10-20		
Двойчатка лучистая	11-21		
Пикульник обыкновенный	15-18		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, проведение наблюдений за развитием вредных организмов в указанные выше сроки (табл.1-5) позволяет оценить состояние сельскохозяйственных растений и воздействие на них вредных организмов.

Сопоставление этих показателей дает возможность прогнозировать потери урожая в зависимости от состояния растений и степени развития вредных организмов, что, в свою очередь, позволяет подбирать соответствующие методы защиты растений. В некоторых случаях можно ограничиться улучшением состояния растений с целью повышения их сопротивляемости вредным воздействиям, например, с помощью подкормок, в других ситуациях необходимы истребительные мероприятия. Выбор методов защиты растений зависит от ожидаемых потерь урожая и общего состояния агроценоза.

Учет степени развития вредных организмов позволяет оценить потери урожая при той или иной экологической обстановке в агроценозе. Если проводились защитные мероприятия, а затем продолжались учеты согласно системам, можно установить хозяйственную эффективность проведенного мероприятия, сравнивая прогнозируемые потери урожая без проведения защитных мероприятий и реально полученные потери.

Наконец, по результатам учетов вредных организмов при принятии решения о необходимости проведения защитных мероприятий

можно воспользоваться экономическими порогами вредоносности (табл.16-18).

Таким образом, фитосанитарная диагностика позволяет усовершенствовать защиту растений с учетом экономических и экологических требований с минимальным отрицательным воздействием на взаимоотношения компонентов агроценоза.

Литература

Афанасенко О.С. Методические указания по диагностике и методам полевой оценки устойчивости ячменя к возбудителям пятнистостей листьев. Л., ВИЗР, 1987, 20 с.

Воронин К.Е., Шапиро В.А., Пукинская Г.А. Биологическая защита зерновых культур от вредителей. М., 1988, 197 с.

Временные методические рекомендации по оценке потерь урожая от вредителей и болезней полевых культур. Л., ВИЗР, 1981, 36 с.

Исследования в полевых и производственных опытах по изучению эффективности систем питания растений в комплексе с другими средствами химизации. М., 1991, 186 с.

Контроль за фитосанитарным состоянием посевов сельскохозяйственных культур в Российской Федерации. Воронеж, 1988, 334 с.

Куперман Ф.М., Пономарев В.И. Биологический контроль за зерновыми культурами (аналитический обзор). М., 1972, 80 с.

Методические рекомендации по оценке фитосанитарного состояния посевов пшеницы при интенсивных технологиях возделывания. Л., ВИЗР, 1985, 67 с.

Методические рекомендации проведения комплексных исследований по созданию зональных моделей блока защиты растений в экологически безопасных зерновых комплексах. Л., ВИЗР, 1990, 60 с.

Методические указания по использованию критериев эффективности природных популяций энтомофагов и энтомопатогенов. М., 1990, 79 с.

Поляков И.Я., Танский В.И., Кряжева Л.П. Прогностическое обеспечение защиты зерновых. /Защита растений, 5, 1986, с.11-13.

Поляков И.Я., Левитин М.М., Танский В.И. Фитосанитарная диагностика в интегрированной защите растений. М., 1995, 208 с.

Рекомендации по применению экономических порогов вредоносности главных вредителей зерновых культур. М., 1986, 30 с.

Родина Н.А., Ефремова З.Г. Методические рекомендации по селекции ячменя на устойчивость к болезням и их применение в НИИСХ Северо-Востока. М., 1986, 26 с.

Харченко Г.Л., Буров В.Н. К вопросу о возможности применения цветных ловушек для изучения динамики лета злаковых мух. /Зоолог. журнал, 69, 11, 1990, с.141-143.

Ченкин А.Ф. (ред.). Фитосанитарная диагностика. М., 1996, 320 с.

Ченкин А.Ф. (составитель). Справочник по защите растений. М., 1985, 415 с.

Чумаков А.Е., Захарова Т.И. Вредоносность болезней сельскохозяйственных культур. М., 1990, 125 с.

Экономические пороги вредоносности сорных растений в посевах основных сельскохозяйственных культур. М., 1989, 22 с.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ, ОПРЕДЕЛЕНИЮ И ПОДБОРУ ВИДОВ РОДА *TRICHOGRAMMA* WESTW. (HYM. TRICHOGRAMMATIDAE) ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРАКТИКЕ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

А.П.Сорокина

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

Род *Trichogramma* Westw. - одна из наиболее важных в практическом отношении групп паразитических перепончатокрылых, представленная исключительно паразитами яиц насекомых. В практике защиты растений трихограммы занимают главное место среди биологических средств борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур. Для борьбы с комплексом листогрызущих совок и кукурузным мотыльком используются соответственно "совочные" и "кукурузные" формы *T. evanescens* Westw., с лутовым мотыльком и гороховой плодожоркой - соответствующие формы *T. pintoi* Voeg., с комплексом листоверток в садах - формы *T. telengai* Sor. и *T. dendrolimi* Mats., приспособленные к этой группе вредителей (форма, условное обозначение различных внутривидовых подразделений, характеризующихся особыми биологическими или экологическими свойствами). Применение трихограмм методом выпусков в природу основано на промышленной технологии их разведения.

Однако потенциальные возможности рационального использования трихограмм остаются не вполне реализованными. Применение находит небольшое число видов против ограниченного круга вредителей. Эффективность выпусков трихограмм не всегда высока и стабильна. Одна из причин неудовлетворительной эффективности - неправильный выбор вида или внутривидовой формы.

Прогресс в использовании трихограмм может быть достигнут путем правильного подбора форм указанных выше видов, а также новых видов, наиболее эффективных в агроклиматических условиях конкретных регионов. Основанием для проведения таких работ являются сведения о видовом разнообразии трихограмм, их широких пищевых связях в различных отрядах насекомых и наличие внутривидовой и внутривидовой дифференциации на основе топической специализации и более высокой приспособленности к паразитированию за счет определенных хозяев.

Успешное решение этой задачи требует умения строго различать виды трихограмм, знать тонкие стороны их биологии и экологии и роль каждого вида или внутривидовой формы в трофических структурах биоценозов.

В связи с этим возникла необходимость подготовки методиче-

ских рекомендаций, в основу которых положены новые материалы по систематике, трофическим связям трихограмм и диапаузе.

Род *Trichogramma* распространен всесветно и к настоящему времени включает 149 валидных названий. Различные виды характеризуются специфическими требованиями к условиям внешней среды и заражают яйца определенного круга хозяев. Пренебрежение этим обстоятельством при подборе вида для массового разведения и применения может оказаться причиной низкой эффективности осуществляемого мероприятия.

Паразитический образ жизни ведет только личинка, которая питается содержимым яйца хозяина. Количество яиц, откладываемых в одно яйцо хозяина, зависит от его размера. В яйцо зерновой моли (*Sitotroga cerealella*) самка откладывает 1 яйцо, в яйцо *Noctuidae* - от 1 до 3-х яиц, *Pyrustidae* - 1-2, *Sphingidae* - до 40 яиц. Яйца насекомых с очень плотным хорионом или покрытые войлочком трихограмма не в состоянии проколоть яйцекладом и заразить.

При высокой плотности самок и недостатке яиц хозяина происходит изменение функциональной реакции на размер яйца хозяина. В этих случаях в одно яйцо хозяина откладывается значительно большее число яиц, чем в норме. Обычно в таких случаях и перезаражение яиц. Из-за недостатка питательного материала происходит гибель потомства; выжившие особи отличаются мелкими размерами и низкими качественными показателями. При оценке пригодности вида-хозяина трихограммы отдают явное предпочтение свежееотложенным яйцам.

Личинка имеет три возраста. К завершению питания личинки и переходу в фазу предкуколки яйца приобретают черный цвет, что позволяет легко отличить зараженные яйца от незараженных. Окукливается трихограмма внутри яйца хозяина. Отродившиеся из куколок взрослые особи прогрызают отверстие в его оболочке и выходят наружу.

У разных видов р. *Trichogramma* длительность бездиапаузного развития и ее зависимость от температуры в общем сходны, например, продолжительность преимагинального развития *T. evanescens* Westw. при постоянной температуре 30°C составила 7-8 дней, при 25° - 9, при 21° - 16, при 15° - 40. Различия сроков развития у разных видов при благоприятных термических режимах измеряются обычно 1-2 днями.

Нижний порог развития трихограмм лежит в пределах 8.6-10.4°C.

На длительность преимагинального развития влияет вид хозяина и фотопериод. В яйцах хозяев, предпочитаемых данным видом трихограммы, развитие от яйца до вылета имаго происходит быстрее, чем в яйцах неспецифических хозяев. Длинный день оказывает

стимулирующее влияние на скорость развития и синхронность отрождения взрослых особей.

Диapaуза у трихограмм формируется при пониженной температуре в период развития личинок и возникает на фазе предкуколкн. Наибольшее количество диapaузирующих особей наблюдается у трихограмм при 10°C. Установлено, что максимально возможное число диapaузирующих особей, а также состояние наибольшей прочности диapaузы и высокой выносливости предкуколок к длительному воздействию положительных температур при продолжительном периоде хранения наблюдается при воздействии температуры 10°C не только на личинку, но и на предкуколку. Фотопериодические условия при развитии личинок не оказывают или почти не оказывают воздействия на диapaузу.

Существенное влияние на формирование диapaузы оказывают условия развития предшествующего поколения. Склонность к диapaузе развивающегося поколения в значительной степени зависит от фотопериодических условий, в которых развивалось родительское поколение (материнское влияние на диapaузу потомков). Например, у *T.telengai* (= *T.embryophagum*) бессамцовая форма при развитии материнского поколения при температуре 25°C и 16-часовом дне в дочернем поколении наблюдалось от 3.2 до 6.8% диapaузирующих особей. В то же время у потомства от родителей, воспитанных при 25°C и 10-часовом дне, наблюдалось 72.2% диapaузирующих особей.

Склонность к диapaузе в потомстве в значительной степени зависит и от температуры, в которой развивалось родительское поколение. У *T.telengai* пониженная температура (20°C) на фоне короткого дня вызывает в потомстве увеличение количества диapaузирующих особей до 100%. У *T.evanesceus* высокая температура (25°C) в материнском поколении, несмотря на длинный день, повышает тенденцию к диapaузе у потомства. Таким образом, необходимые фотопериодические и температурные условия должны быть предусмотрены уже при развитии предшествующего поколения.

Для всех арренотокических видов трихограммы характерно количественное преобладание самок. Наибольшее количество самок (60-86%) наблюдается в оптимальных условиях температуры и относительной влажности воздуха. Отклонение от этих условий может вызвать значительный сдвиг в соотношении полов в сторону самцов. Например, при оптимальных для *T.principium* Sug. et Sor. условиях 28°C и влажности воздуха 35-40% доля самок в потомстве составила 72%. При температуре 15°C и той же влажности воздуха этот показатель снизился до 42%. Существенное влияние на соотношение полов оказывает возраст самок, тип яйцекладки хозяина (одиночные яйца или яйца, отложенные группами), иногда размер яйца хозяина.

Вылет самцов происходит немного раньше, чем самок. По мере

отрождения последних начинается спаривание. Самки отрождаются с готовым запасом яиц в яичниках. Существует прямая зависимость между длиной тела самки и запасом яиц в ее яичниках. Размеры тела самки в свою очередь зависят от размера яйца хозяина и количества развивающихся в нем особей трихограммы. Например, при развитии в яйцах зерновой моли в яичниках отродившейся самки *T. evanescens* насчитывается 35 яиц, а при развитии в яйцах капустной совки - 80.

При наличии яиц хозяина исходный запас яиц самки реализуют в первые 2 суток. При отсутствии хозяина весь запас зрелых яиц уже через 2 суток полностью подвергается резорбции (Май Фу Кви, 1983). При наличии углеводной подкормки длительность жизни самок и их плодовитость увеличиваются.

Существенное влияние на потенциальную и реализованную плодовитость трихограмм оказывает температура и относительная влажность воздуха в период преимагинального развития и заражения хозяина. Наибольшая плодовитость наблюдается при оптимальном соотношении этих факторов. Для большинства европейских видов оптимальными являются температура 22-25°C и влажность воздуха 60-75%.

Однако оптимальная температура и степень выносливости к условиям, выходящим за пределы оптимума, могут быть различными у разных видов. Поэтому гигротермический оптимум и температурные границы, в которых проявляются паразитическая активность самок, определяются экспериментально для каждого вида.

Воспитание трихограмм в условиях переменных температур не вызывает отличий в плодовитости. Однако диапазон оптимальных температур для яйцекладки у самок, воспитанных в условиях переменных температур, шире, чем у самок, развивающихся при постоянной температуре.

На потенциальную плодовитость трихограммы оказывает влияние качество корма хозяина. Более высокой плодовитостью отличаются особи из яиц хозяев, воспитанных на высококачественных кормовых субстратах. Заметное влияние на плодовитость самок трихограммы оказывает возраст яиц хозяина. По мере продвижения эмбриогенеза яйца хозяина теряют свою привлекательность на заражение. В этих случаях уровень воспроизводства искусственно размножаемых популяций может снижаться в результате уменьшения доли яйцекладущих самок, средней плодовитости яйцекладущей самки, смертности паразита на преимагинальных стадиях и пониженной потенциальной плодовитости особей, завершивших развитие.

Снижение суммарной плодовитости может происходить при переводе популяции на яйца неспецифического хозяина. Например, уровень воспроизводства изолятов из природы может сильно снижаться при их переводе на яйца зерновой моли вследствие резкого уменьшения доли яйцекладущих самок.

По типу пищевой специализации трихограммы относятся к полифагам. Они заражают яйца хозяев из 5 отрядов насекомых: Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Neuroptera. С отрядом Lepidoptera связано подавляющее большинство ее видов (92.1% видов мировой фауны с известной биологией). Виды, связанные с другими отрядами, составляют от 1.4 до 5%. В отряде чешуекрылых хозяева трихограмм отмечены в 25 семействах, но наибольшее число видов связано с 4 надсемействами: Noctuoidea, Pyraloidea, Tortricoidea и Papilionoidea. В отряде двукрылых трихограммы заражают яйца хозяев в 4-х семействах: Scyomyzidae, Diopsidae, Tabanidae, Anthomyiidae, в отряде перепончатокрылых - в семействах Tenthredinidae, Pamphiliidae, Cimbicidae, в отряде жуков хозяевами трихограмм являются преимущественно представители семейства Chrysomelidae.

Несмотря на широкую полифагию, у трихограмм отчетливо проявляется внутривидовая и внутривидовая дифференциация в направлении более высокой специализации в отношении хозяина и мест его обитания. Дифференциация происходит на основе наибольшей приспособленности вида или внутривидовой формы к использованию определенных хозяев или группы хозяев, что реализуется в избирательности микробиотопа хозяина и в наибольшей биологической приспособленности личинок к яйцу данного хозяина, как к источнику пищи. Кайромоны данного вида хозяина оказываются наиболее привлекательными для самок, что позволяет им эффективно осуществлять поиск его яиц для заражения.

Наличие у разных видов специфических требований к среде обитания, наследственно закрепленных стимулов, обеспечивающих ориентацию в пространстве и поиск оптимальных видов хозяев, дает возможность подбора наиболее эффективных видов для использования против определенных вредных видов насекомых.

ВЫЯВЛЕНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ ВИДОВ РОДА TRICHOGRAMMA

1. Сбор материала. Выявление видового состава трихограммы осуществляют методом индивидуального выведения из яиц вредителей, собранных в природе, или методом экспонирования яиц вредителя - мишени, полученных в лабораторных условиях.

Сбор природной трихограммы проводится в различных естественных биотопах и на тех участках агроценозов, где ранее не проводились выпуски трихограммы и не было регулярных химических обработок.

1.1. Техника выведения трихограмм путем сбора яиц насекомых. (Использована работа "Методическое руководство..." (1979)).

1.1.1. Сбор проводится в период откладки яиц еженедельно на стационарных участках и при маршрутных обследованиях. При этом

необходимо учитывать физико-биологические особенности обследуемых участков (размеры, рельеф, степень разнообразия растительности, характер окружающих стационарный участок ландшафтов, возраст многолетних агроценозов, интенсивность применения пестицидов).

Выборки яиц должны быть количественно выражены в соответствии с методикой, принятой для учета данной культуры, то есть либо отнесены к известной площади (например, 0.25 м^2), если сборы проводятся на травянистой растительности, либо к определенному количеству листьев или длине ветви на древесной или кустарниковой растительности. Поскольку трихограммы используют яйца хозяев, различных по систематическому положению, но являющихся членами одного биоценоза, следует собирать не только яйцекладки изучаемого вредителя и филогенетически близких к нему видов, но и яйца представителей других групп насекомых.

При сборе и анализе проб, взятых по краям участков, необходимо учитывать возможность заражения яиц исследуемых хозяев видами трихограммы, проникшими из пограничных биотопов, или видами, случайно попавшими в это сообщество (с помощью ветра). Таким образом, при выявлении видов трихограмм следует принимать во внимание не только видовой состав хозяев и их плотность, но и ряд перечисленных выше факторов.

1.1.2. Яйцекладки необходимо собирать со всех ярусов растительности, поскольку возможно распределение видов трихограммы относительно друг друга в вертикальном направлении, что связано с особенностями микроклимата в разных ярусах растений и межвидовой конкуренцией за пищевые ресурсы.

1.1.3. Яйцекладки собирают, тщательно осматривая верхние и нижние поверхности листьев, стеблей. С целью предотвращения возможного повреждения яиц их вырезают вместе с частью листа или стебля.

1.1.4. Каждую яйцекладку или одиночно отложенное яйцо помещают в отдельную пробирку, вкладывают туда этикетку и закрывают ватным тампоном или тонкой плотной материей с помощью резинки.

1.1.5. Размеры пробирок подбирают в зависимости от величины кладок. Одиночные яйца можно помещать в пробирки размером 7×50 мм, групповые кладки насекомых - в крупные пробирки, например, 25×90 мм или 15×145 мм.

1.1.6. Этикетка должна содержать следующие данные: номер сбора, название хозяина, название растения, его ярус; название станции (лес, сад, луг, поле); указание места сбора (краевая полоса, середина поля; в первом случае необходимо дать краткую флористическую характеристику соседнего участка); географические данные о месте сбора (республика, край, область, населенный пункт, имеющийся на карте, озеро, горная вершина и т.д.); дата сбора; фамилия

сборщика. Надпись на этикетке должна быть обращена к стенке пробирки, чтобы не вынимая ее можно было прочесть.

1.1.7. Если видовую принадлежность хозяина не удастся определить по яйцу, следует вывести личинок и довести их до взрослой фазы.

1.1.8. В лаборатории пробирки размещают на столе запаянными концами к источнику света. В противном случае трихограммы будут набиваться в ватные тампоны, и собранный материал станет непригоден для дальнейшей работы.

1.1.9. Собранный материал необходимо просматривать ежедневно. Следует помнить, что первыми из яиц выходят личинки хозяев, которые могут съесть не только хорион собственного яйца, но и расположенные рядом зараженные яйца. Особенно это относится к совкам. Отродившихся личинок следует своевременно удалить из пробирки. Зараженные трихограммой яйца на 2-5 день после заражения приобретают черную окраску.

1.1.10. При сборе яиц насекомых и выведении из них паразитов необходимо вести журнал, в который записывают данные, изложенные в этикетке (1.1.6). Кроме того, указывают количество собранных яиц каждого вида хозяина и количество зараженных трихограммой. Следует помнить, что кроме трихограмм из яиц возможен вылет представителей других групп паразитических перепончатокрылых. В журнале записывают видовое название каждого выведенного паразита.

1.1.11. Для последующих биологических исследований собранный материал размножают. Для этого вылетевшей трихограмме предлагают яйца естественных хозяев. Наиболее пригодны для этих целей яйца совок, полученные в лаборатории. Однодневные яйца хозяев предлагают или наклеенными на бумажные карточки, или непосредственно на бумаге, на которую были отложены яйца. На карточке или бумаге указывают номер сбора и дату предоставления яиц на заражение. Яйца совки предлагаются из расчета не менее 25 шт. на одну самку. Ежедневно яйца заменяют на свежие, удалив предварительно с карточек трихограмму. После того, как произойдет заражение и трихограмма погибнет, яйца переносят в пробирку большего объема, а мертвую трихограмму используют для определения видовой принадлежности.

1.1.12. Исходная колония для последующего изучения и массового размножения на яйцах лабораторного хозяина должна стартовать не менее чем от 1.5 тысяч особей. Поэтому исходный материал размножают в яйцах естественного хозяина до указанного количества.

1.1.13. При отсутствии яиц естественных хозяев трихограмме, вылетевшей из собранных в природе яиц, предлагают однодневные яйца лабораторных хозяев (мельничной огневки, зерновой моли) из расчета не менее 50 штук на одну самку. Яйца наклеивают на бу-

мажные карточки сильно разведенным клеем ПВА, сырым белком куриного яйца или 20% раствором сахара. Следует помнить, что при первом контакте с яйцами лабораторного хозяина количество самок, участвующих в заражении, не превышает 50%, а иногда составляет всего 2%. Резко снижается и количество отложенных яиц. Для увеличения репродуктивного периода самок и привлечения их к откладке яиц трихограмме ежедневно дают углеводную подкормку (20% раствор сахара или меда). Работая с лабораторными хозяевами, следует помнить, что "отказ" самок природной популяции трихограммы от заражения лабораторных хозяев и низкий уровень реализованной плодовитости сопровождается отбором, который опасен обеднением родительского генофонда, что может привести к непредсказуемым изменениям. Использование лабораторных хозяев для организации лабораторных колоний возможно только в исключительных случаях и при условии пополнения этой колонии исходным материалом, взятым из природы.

1.2. Техника выведения трихограмм методом экспонирования яиц хозяев на карточках.

1.2.1. Для выведения трихограмм и размножения их на первых этапах лабораторного культивирования необходимо располагать достаточным количеством яиц естественных хозяев, получение которых возможно путем:

- а) вылова бабочек на светоловушки;
- б) проведения осеннего массового сбора гусениц последних возрастов и куколок совок, кукурузного мотылька и листоверток, для чего проводят почвенные раскопки на полях капусты, сбор остатков стеблей кукурузы, развешивание ловчих поясов в садах;
- в) массового разведения в лаборатории природных хозяев трихограммы на естественном корме или искусственных питательных средах. Получение бабочек указанными способами проводится по известным методикам.

1.2.2. Бабочек помещают в изоляторы. Для этого можно использовать стеклянные банки или цилиндры, стенки и дно которых закрыты бумагой. На дно ставят сосуды с 5% сахарным раствором. Внутрь помещают "гармошки" из бумаги. Для совок используют фильтровальную бумагу, для листоверток - кальку. Количество бабочек зависит от размера сосуда. В 0.5-литровые банки помещают 2-3 пары (самец, самка) совок или 5 пар листоверток. Ежедневно заменяют углеводную подкормку и бумагу в банках с отложенными яйцами насекомых.

1.2.3. Бумагу с отложенными на нее яйцами разрезают на ленты или вырезают яйца и наклеивают их на карточки. Бумажные ленты и карточки размещают в разных участках исследуемых биотопов.

1.2.4. При отсутствии яиц естественных хозяев экспонируют в разных биотопах яйца лабораторных хозяев (ситотроги, эфестии), наклеенных на карточки. Однако, трихограммы неохотно заражают

яйца этих хозяев.

1.2.5. Количество экспонируемых яиц должно быть достаточно большим, так как часть их может быть съедена хищными насекомыми. Через каждые 3 дня карточки заменяют. Снятые карточки помещают в широкие пробирки. Выведение трихограммы осуществляют, как в п.п. 1.1.4-1.1.13.

2. Техника изготовления препаратов и определение видов трихограмм. Для определения видовой принадлежности трихограмм обязательно изготовление микроскопических препаратов. Исходный материал помещают в жидкость Фора или в канадский бальзам, предварительно обработав его в молочной кислоте или в 5% растворе щелочи (KOH, NaOH).

2.1. Для изготовления жидкости Фора необходимы следующие компоненты: дистиллированная вода, гуммиарабик кристаллический, хлоралгидрат, глицерин. Готовят жидкость Фора в следующей последовательности: гуммиарабик растворяют в дистиллированной воде, выдерживая смесь в термостате при температуре 30-40°C в течение 1-2 суток. Затем добавляют хлоралгидрат, а еще через сутки (после его растворения) - глицерин. Полученную смесь взбалтывают и еще теплую фильтруют через стеклянную вату. На 100 см³ воды требуется 400 г хлоралгидрата и 40 см³ химически чистого глицерина. Хранить жидкость Фора следует в защищенном от света месте в плотно закрытой посуде из темного стекла.

В капле молочной кислоты в часовом стекле или на предметном стекле исходный материал подогревается в пламени спиртовки или в термостате при температуре 30-50°C до размягчения и наступления прозрачности склеротизированных частей тела. Если применяются щелочи, то необходимо пользоваться фарфоровыми тиглями. Нагревать их необходимо только в термостате или на водяной бане, так как на спиртовке щелочь бурно вскипает и разбрызгивается. Во избежание разрушения материала не допускается закипание среды или пребывание его в термостате дольше, чем это требуется для его просветления. Свежезамороженных особей можно помещать непосредственно в каплю жидкости Фора без предварительной обработки.

После просветления материал промывают водой, затем ориентируют на предметном стекле спинкой или брюшной поверхностью кверху, расправляют с помощью тонких препаровальных игл усики и крылья в капле жидкости Фора и осторожно накрывают покровным стеклом. Расположить насекомое в нужном ракурсе удобнее, если помещать под одно покровное стекло только по одному экземпляру. Для этого лучше использовать мелкие покровные стекла, разрезав стандартное стекло на 4 части. При боковом положении материала его определение невозможно. После высыхания препарата покровное стекло по краям заливают лаком или канадским бальзамом. Однако преждевременная обводка препарата канадским баль-

замом (до полного высыхания жидкости Фора) приводит к его почернению и полной негодности для определения вида.

2.2. Наилучшим способом обеспечения надежной сохранности препарата в течение неопределенно долгого времени является фиксация объекта в канадском или пихтовом бальзаме. В этом случае после обработки молочной кислотой или щелочью объект тщательно промывают в дистиллированной воде, затем проводят последовательно через спирты 70°, 96° и абсолютный. Проводку объекта через спирты можно осуществлять непосредственно на предметном стекле, нанося на него капли жидкости. Замену спиртов производят последовательно по мере испарения жидкости (примерно на 80%) или тонкой полоской фильтровальной бумаги. Высыхание объекта недопустимо. В каждом из спиртов объект должен находиться не менее 2 часов 30 минут. После абсолютного спирта непосредственно на объект наносится небольшое количество гвоздичного или кедрового масла, в которых он ориентируется вышеуказанным способом. Избыток масла удаляют тонкой полоской фильтровальной бумаги. При отсутствии масел их можно заменить ксилолом. Далее на объект наносится капля канадского бальзама, размер которой определяется в зависимости от размеров покровного стекла. К краю капли бальзама осторожно подводят край покровного стекла и медленно опускают его так, чтобы под стекло не попали пузыри воздуха.

Изготовленные препараты этикеткируют как и сборы (см. п. 1.1.6). Этикетки пишутся тушью, их можно приклеить к предметному стеклу любым универсальным клеем. Название вида трихограммы пишется после определения.

Для определения трихограммы готовят и временные препараты. Для этого после предварительной обработки объект помещают в каплю молочной кислоты и накрывают покровным стеклом. Такие препараты могут сохраняться в чашках Петри и в бытовом холодильнике около трех дней.

2.3. Определение материала производится после тщательного изучения морфологии трихограмм, описанной в определителе видов мировой фауны (Сорокина, 1993). Определитель построен главным образом на признаках, характеризующих самцов и отчасти самок.

При выведении трихограммы ее видовую принадлежность следует определять не менее, чем по 5 самцам и самкам, отродившимся из каждой кладки яиц.

Иногда из яиц, собранных в природе, отрождаются только самки, которые могут принадлежать или к телитокичным, или аррено-токичным популяциям видов трихограммы. Если имеет место последний случай, то при предоставлении яиц хозяина сразу всем виргинным самкам возможна утрата полученной культуры в связи с отрождением только самцового потомства. Поэтому при отсутствии в выборках самцов целесообразно предоставить для заражения яйца хозяина только отдельным самкам, которых следует содержать при

температуре 25°C и относительной влажности воздуха 75-80% до вылета потомков. Если потомство этих самок будет представлено самцами, то одна часть этих особей предназначается для определения вида, другая часть присоединяется для дальнейшего воспроизводства колонии к оставшимся самкам, которые все это время содержатся при температуре 15-20°C и влажности воздуха 75-80% при обязательном наличии углеводной подкормки.

2.4. Следует учесть, что род *Trichogramma* содержит большое количество внешне сходных, но отличающихся биологическими и экологическими особенностями (например, избирательностью разных хозяев на заражение) видов. Поэтому в сложных случаях для правильного определения вида необходимо привлечение биохимических критериев и признака репродуктивной изоляции в дополнение к морфологическому анализу. Для биохимического анализа высылаются живой материал специалисту - биохимику, владеющему соответствующими методиками. опыты по репродуктивной изоляции могут быть проведены в биологической лаборатории энтомологом. В этих опытах в качестве хозяев трихограмм используются яйца зерновой моли или мельничной огневки, в которых нормально может развиваться не более одной особи паразита.

Для получения виргинных самок одиночные зараженные яйца хозяина изолируют в пробирки длиной 3-4 см, диаметром 0.9 см. Во время вылета трихограмм пробирки просматривают под биноклем и определяют пол отродившихся особей, при этом пробирки с самками отделяют от пробирок с самцами. Для постановки опыта по скрещиваемости между исследуемыми формами, условно названными, например, А и Б, в первом варианте опыта к изолированным самкам формы А подсаживают самцов формы Б; во втором варианте к самкам формы Б подсаживают самцов формы А. В каждом варианте опыта должно быть не менее 30 индивидуальных скрещиваний. Кроме того, в пределах каждой культуры формы проводят контрольные скрещивания, создавая гетеросексуальные пары. Для спаривания трихограмм необходимо не менее трех часов, после чего в пробирки помещают карточки с наклеенными на них яйцами зерновой моли или другого хозяина из расчета 50-60 яиц на одну самку. После вылета потомков учитывают количество пар, давших гетеросексуальное потомство, количество пар, давших только самцовое потомство, среднее количество яиц, паразитированных одной самкой, долю самок в потомстве. Если при вылете потомства получены только самцы, формы А и Б репродуктивно изолированы и принадлежат к разным видам. В случае, когда в потомстве первого поколения имеются самки, следует продолжить опыт по выявлению жизнеспособности гибридного потомства.

Необходимо учитывать, что в полученном после скрещивания F1 гибриды только самки - они диплоидны, так как отрождаются

из оплодотворенных яиц. Самцы гаплоидны, так как они отрождаются из неоплодотворенных яиц и принадлежат к той же форме, что и самки исходной родительской пары. Таким образом, появление гибридных самцов опаздывает на одно поколение. Поэтому зараженные яйца, содержащие потомство первого поколения, еще до вылета имаго вновь изолируют по одному. Часть этого материала помещают при температуре 25°C для вылета гибридных самок и заражения ими яиц хозяев для получения гибридных самцов. Другую часть изолированных яиц помещают в условия пониженной температуры (15-20°C). Сроки пребывания материала в этих условиях рассчитывают таким образом, чтобы вылет гибридных самцов и самок был синхронным. Затем вновь создают гетеросексуальные пары из гибридных самок и самцов для реципрокного скрещивания формы А и Б.

В опытах карточки с наклеенными на них яйцами хозяев необходимо предоставлять только после спаривания и менять их ежедневно в течение всей жизни самки.

Межвидовые гибриды бесплодны или имеют пониженную плодовитость, поэтому необходимо установить, что полученные гибридные формы не менее жизнеспособны, чем родительские. Для этого самок из гибридных линий F1, F2, F3 после оплодотворения изолируют по одной в небольшие пробирки длиной 5 см и шириной 0.9 см. Для заражения им предлагают по 100 яиц зерновой моли или мельничной огневки, наклеенных на бумажные карточки. Пробирки с изолированными самками содержат при температуре 25°C и относительной влажности воздуха $70 \pm 5\%$. В каждом варианте опыта должно быть не менее 30 самок. После вылета потомков учитывают долю самок, откладывающих яйца, их плодовитость, соотношение полов в потомстве, выживаемость преимагинальных стадий.

Жизнеспособность гибридов необходимо проверять также путем возвратного скрещивания. Если в равных условиях эксперимента биологические показатели гибридных форм не ниже, чем родительских, и при любом варианте возвратного скрещивания не наблюдается существенного их снижения, скрещиваемые формы следует отнести к одному виду.

После определения видового состава переходят к анализу сборов и изучению биологических показателей, характеризующих данный вид или популяцию.

3. Анализ сборов.

3.1. Если в сборах обнаружено несколько видов трихограмм, то оценивают относительную роль каждого вида в паразитировании яиц изучаемого вредителя-мишени, а также других видов хозяев с учетом плотности их яиц.

3.2. В каждой выборке, а затем и для всех выборок, подсчитывают количество особей каждого вида трихограммы и долю яиц хо-

зяина, зараженных этим видом.

3.3. О предпочтении яиц изучаемого вредителя-мишени данным видом трихограммы судят по следующим показателям: а) постоянство выведения, когда вид выводится из более чем 50% выборок яиц, б) частота встречаемости (отношение числа особей данного вида к общей численности особей, выраженное в процентах). У видов, доминирующих в комплексе паразитов яиц данного вредителя, показатели частоты встречаемости наиболее высокие.

3.4. При анализе структуры комплекса яйцеедов и оценке степени их трофических связей с определенными видами фитофагов следует учитывать, что в отсутствие основных хозяев трихограммы переходят к заражению яиц альтернативных хозяев, избирая из их числа массовые виды. Поэтому оценка сравнительного воздействия отдельных видов трихограммы на численность фитофагов должна быть увязана с динамикой численности фитофагов в данном биотопе в течение сезона.

Сделанный на основании полевых сборов вывод о предпочтении определенного вида хозяина подлежит экспериментальной проверке при изучении биологических показателей трихограммы.

4. Изучение поисковой способности самок трихограммы. Поисковая способность самок трихограммы изучается путем лабораторных и полевых экспериментов. Лабораторные исследования проводятся в ольфактометрах при групповом содержании самок.

4.1. При групповом содержании трихограммы используется ольфактометр, предложенный Ferreira et al. (1979, рис.). Он изготавливается из органического стекла в форме параллелепипеда размером 10×10×6 см. На дне ольфактометра со стороны задней стенки высверливаются 5 отверстий диаметром 1 см, в которые вставляют 5 стеклянных пробирок с пробками. Через пробки в пробирки вставляют небольшие стеклянные трубочки диаметром 1 мм. Через эти трубочки трихограмма проникает в пробирки с яйцами хозяев. В передней стенке ольфактометра имеется небольшое окошко, в которое вводится трихограмма, а на трех стенках - отверстия по 3.5 см, закрытые очень мелкой латунной сеткой или тканью "мельничный газ". Эти отверстия обеспечивают аэрацию воздуха в ольфактометре.

Яйца хозяев наклеивают на одинаковую площадь карточки - 2 см². Поскольку яйца разных хозяев отличаются по размерам, их число на указанной поверхности будет различным. Карточки с наклеенными на них яйцами помещают в пробирки ольфактометра. При сравнении видов трихограммы с аррентокическим типом партеногенеза при численном соотношении полов (самец:самка) не менее 3:1 в ольфактометр помещают 100 яиц зерновой моли или мельничной огневки, паразитированных каждым видом трихограммы, перед отрождением имаго. При сравнении аррентокического вида с телитокичным у первого отбирают для ольфактометра только самок. Как и у телитокичного вида, самок отбирают в день вылета имаго,

используя при этом слегка увлажненную кисточку, число самок каждого вида должно быть равно 80-100 шт. Ольфактометр освещается только со стороны окошка для ввода трихограммы. Остальные его стороны затемняют черной бумагой. Трихограмма проникает в пробирки с яйцами хозяев через 1-мм трубочки, преодолевая положительный фототропизм и отрицательный геотропизм. Ежедневно утром и вечером в течение 3-х суток отмечают количество особей трихограммы в каждой пробирке.

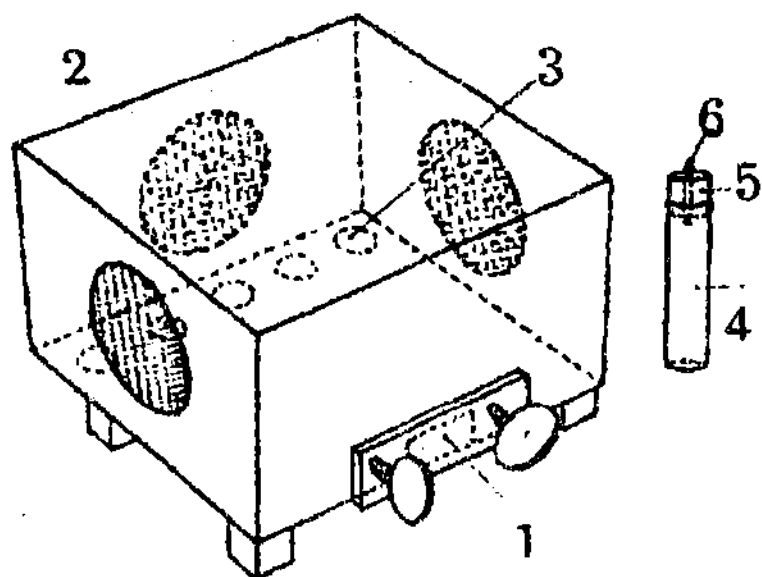


Рис. Ольфактометр

- 1 - окошко для введения трихограмм,
 2 - отверстия для аэрации с сетками,
 3 - отверстия для пробирок,
 4 - корпус пробирки, 5 - пробка,
 6 - трубочка диаметром 1 мм

Поисковую способность вида трихограммы изучают в экспериментах без выбора и с выбором хозяев. В опытах без выбора хозяев в пробирки ольфактометра помещают яйца только одного из изучаемых хозяев.

Например, при сравнительном изучении поисковой способности в отношении яиц кукурузного мотылька, капустной совки и лабораторного хозяина (зерновой моли) в одном опыте в 4 пробирках из 5 (одна пробирка остается пустой) предлагают яйца кукурузного мотылька, в другом опыте яйца капустной совки, в третьем - зерновой моли. Изучаемый вид трихограммы помещают в ольфактометр, как описано выше. Каждый опыт проводится не менее, чем в 3 повторностях.

Показатель поисковой способности трихограммы (J_{cr}) для каждого вида хозяина рассчитывается по формуле:

$$J_{cr} = (3n_1 + 2n_2 + n_3) / P, \quad (1)$$

где n_1 - число особей трихограммы, обнаруженных во всех пробирках в течение первого дня; n_2 = (число особей трихограммы, присутствующих в пробирках в течение 2-го дня) - n_1 ; n_3 = (число особей, присутствующих в пробирках в течение 3-го дня) - ($n_1 + n_2$); P - суммарное количество пробирок, используемых в опытах для каждого вида хозяина. После этого сравнивают показатели поисковой способности для каждого вида хозяина и для каждого изучаемого вида или популяции трихограммы.

Наиболее ясная картина наблюдается в опытах с выбором хо-

зяина. В этих экспериментах одновременно трихограмме предлагают на выбор яйца различных хозяев. Пробирки, в которых они находятся, должны быть расположены в ольфактометре вразбивку. В каждом варианте опыта используют 2 вида хозяина. Одна пробирка из 5 остается пустой. В ней фиксируется случайное попадание трихограммы. В этих опытах для каждого вида хозяина должно быть использовано не менее 15 пробирок. Поисковая способность для каждого изучаемого хозяина рассчитывается также по формуле 1. По этой же формуле определяется показатель подвижности трихограммы (J_{mo}), подсчитанный на пустых пробирках. Привлекательность для заражения определенного вида хозяина рассчитывается по формуле:

$$J_{at} = J_{cr} - J_{mo}. \quad (2)$$

Для сравнимости полученных данных опыты проводятся в одних условиях, благоприятных для большинства видов и популяций трихограммы - температуре 24-25°C и относительной влажности воздуха 60-75%.

4.2. В отсутствие ольфактометра избирательность трихограммы на заражение определенного вида хозяина изучают в энтомологических пробирках при гигротермических условиях, как в п. 4.1.

4.2.1. Берут 1000 зараженных яиц лабораторного хозяина и после массового вылета самок и спаривания их изолируют по одной в энтомологических пробирках. Копуляция трихограммы происходит сразу после отрождения самок, поэтому обычно через 1-3 часа после вылета самки бывают оплодотворены. При изоляции самок учитывают их положительный фототаксис, поэтому пробирку, из которой берут самок, запаянным концом обращают к свету. Трихограмму вылавливают или тонкой слегка увлажненной кисточкой, или узкой полоской плотной бумаги, которую осторожно подводят под конец брюшка самки. После перехода трихограммы на кисточку или конец бумажной полоски их осторожно вводят в изоляционную пробирку, также обращенную запаянным концом к свету, и стряхивают самку. Таким способом изолируют не менее 30 самок. В каждой изоляционной пробирке проверяют пол трихограммы при помощи бинокля или 20-кратной лупы.

4.2.2. Каждой изолированной самке предлагают для заражения яйца различных хозяев - совок, листоверток, огневков, белянок и др., группируя их в одной пробирке по 2 вида, но в разном сочетании в вариантах опыта. Яйца хозяев на бумажных карточках чередуют друг с другом по видам. Размер карточек должен соответствовать размеру пробирки. Для наклейки яиц используют средства, перечисленные в п. 1.1.13. Каждой самке предоставляют по 50 яиц природного хозяина и по 100 яиц лабораторного хозяина. Пробирки закрывают тонкой тканью (батист, бязь, "мельничный газ") и затягивают колечком из тонкой резинки. Яйца предоставляют самкам на

сутки, после чего последних удаляют, а яйца содержат в пробирках до 7 дней.

4.2.3. Ежедневно пробирки осматривают и удаляют личинок, отродившихся из незараженных яиц хозяев.

4.2.4. После почернения зараженных яиц подсчитывают в каждой пробирке количество зараженных и незараженных яиц по каждому виду хозяина в отдельности. Среднее количество зараженных яиц каждого вида хозяина вычисляют методом вариационной статистики. Об избирательной способности изучаемых видов и форм трихограммы судят по количеству самок, заражающих яйца тех или иных хозяев, по проценту заражения яиц данного вида хозяина к общему числу паразитированных яиц. Сделанный на основании лабораторных опытов вывод о наличии избирательности на заражение яиц изучаемого вредителя определенным видом или формой трихограммы проверяют в полевых условиях на кормовом растении вредителя-мишени.

4.3. На полевых культурах для каждого вида или формы трихограммы выбирают 5 одинаковых по размеру и габитусу растений (1 повторность), расположенных рядом. Каждая опытная группа растений (повторности) должна быть удалена одна от другой не менее, чем на 10 м, контрольная - на 40-50 м. Всего в опыте должно быть не менее 3 повторностей.

Яйца изучаемого вида хозяина и альтернативных хозяев по 100 штук каждого вида наклеивают на бумажные карточки в указанном выше порядке и прикрепляют их к листьям растений с нижней стороны. Карточки размещают по всем ярусам растений и частям света. Затем производят выпуск изучаемого вида или формы трихограммы из расчета 100 самок на каждую группу (повторность) растений. На растениях контрольной группы также вывешиваются карточки с наклеенными на них яйцами хозяев, но не выпускается трихограмма. Опыт проводится в течение светового дня с 6 до 21 часа. На протяжении дня фиксируется температура и относительная влажность воздуха.

На плодовых культурах выбирают 6 деревьев. Яйца изучаемых хозяев наклеивают на бумажные карточки в указанном выше порядке и размещают их по 400 штук каждого вида хозяина на дерево, внутри и на периферии кроны, по разным ее ярусам и частям света. Трихограмму выпускают из расчета 20 тыс. самок на дерево. Далее опыт проводят, как указано в п. 4.3.1.

По окончании опыта карточки снимают с растений и группируют яйца по видам хозяев и точкам размещения на растениях; после почернения зараженных яиц подсчитывают количество зараженных и не зараженных яиц. Также поступают с яйцами хозяев, снятыми с контрольных растений. Если в контроле оказываются яйца, зараженные природной трихограммой, то следует определить вид трихограммы, заражавшей яйца в опыте и контроле. В случае выведе-

ния одних и тех же видов в опыте и контроле следует сделать поправку на уровень паразитирования яиц природной трихограммой при подсчете результатов экспериментов. Об избирательной способности видов и форм трихограммы судят по отношению зараженных яиц данного вида хозяина к общему количеству паразитированных яиц всех видов хозяев. При этом особое внимание следует уделить характеру распределения трихограммы по ярусам растения и предпочтению яруса, избираемого хозяином-мишенью для яйцекладки.

После выделения вида или формы трихограммы, предпочитающего на заражение яйца изучаемого хозяина, переходят к изучению их требований к абиотическим факторам внешней среды. Эти исследования позволяют установить оптимальные условия для массового размножения трихограммы, определить степень ее экологической пластичности и соответствие требования энтомофага к факторам внешней среды и условий его применения.

5. Изучение влияния температуры и относительной влажности воздуха на биологические показатели трихограммы.

5.1. Эти исследования проводят при постоянной температуре 15, 20, 25, 30°C и относительной влажности воздуха 30-35%, соответствующей низкой влажности воздуха на полях, и 75-80% при освещении 16 часов в сутки. В таких режимах трихограмму содержат весь период развития и размножения. опыты проводят, используя яйца одного и того же хозяина (зерновой моли, мельничной огневки). Температуру устанавливают в специальных термостатах или камерах с автоматическим регулированием. Влажность устанавливают в эксикаторах с помощью набора солей по существующей методике. В каждом из вышеперечисленных температурных режимов изучается влияние как низкой, так и умеренно высокой влажности воздуха. Таким образом, для каждого исследуемого вида или формы трихограммы требуется не менее 8 вариантов опыта. опыты закладывают в утренние часы, когда трихограмма более активна.

5.2. Первичное заражение яиц трихограммой проводят в период массового лета при температуре 22-24°C и влажности воздуха 60-70%. На 6 часов самкам предоставляют яйца хозяина из расчета 100 яиц на самку. С окончанием времени, отведенного на заражение, самок стряхивают кисточкой. Пробирки с зараженными яйцами содержат в заданных условиях опыта до вылета самок. После массового вылета самок отводят 3 часа на спаривание, затем производят отсадку самок (см. п. 4.1.2.2). Для каждого варианта опыта необходимо изолировать не менее 30 самок.

5.3. В пробирки с отсаженными в них самками помещают карточки с наклеенными на них яйцами хозяина в количестве 100 штук, затем закрывают тонкой тканью и затягивают резинками. Партии пробирок по 30 штук помещают в эксикаторы с установленной в них определенной влажностью. Эксикаторы размещают в камерах с ав-

томатически регулируемой температурой и освещением. Для лучшей сравнимости данных экспериментов все варианты опыта выполняют одновременно от одного лабораторного поколения трихограммы. Партии пробирок в каждом варианте опыта этикеткируют. В этикетках указывают вид трихограммы, географическое название популяции, название растения, на котором первоначально был собран изучаемый материал, название хозяина, дату опыта, его гигротермические условия.

5.4. Ежедневно пробирки осматривают, фиксируют начало вылета трихограммы, массовый вылет и окончание вылета. Таким образом устанавливают продолжительность развития в зависимости от гигротермических условий среды, динамику вылета и продолжительность жизни взрослых особей.

5.5. После отмирания трихограммы под биноклем подсчитывают количество яиц, зараженных каждой самкой. Выживаемость потомства в период преимагинального развития определяют по количеству летных отверстий и числу вылетевших особей. Учет погибших на преимагинальных стадиях производится путем вскрытия зараженных яиц без летных отверстий. Соотношение полов в потомстве учитывается при подсчете вылетевших особей.

5.6. Путем статистической обработки полученных данных определяют оптимальные гигротермические условия, при которых наблюдается наибольшая выживаемость потомков, наиболее высокий процент самок в потомстве и наибольшая плодовитость самок. Одновременно анализируют степень экологической пластичности трихограммы путем сравнения биологических показателей в условиях, выходящих за пределы оптимума.

6. Изучение условий, контролирующей диапаузу. Диапауза позволяет осуществлять накопление и длительное хранение живого материала, чем объясняется важность изучения особенностей ее формирования у трихограмм. Как указано выше, наиболее благоприятной для формирования диапаузы у трихограмм является температура 10°C. Фотопериод не оказывает (или почти не оказывает) влияния на диапаузу развивающегося потомства. Однако у ряда видов и их географических популяций на тенденцию к диапаузе развивающегося поколения существенное влияние могут оказывать фототермические условия развития родительского поколения. Для выяснения наличия и характера материнского влияния на диапаузу дочернего поколения требуется постановка специальных экспериментов.

6.1. Вылетевшим самкам трихограммы предлагаются однодневные яйца зерновой моли из расчета 100 яиц на одну самку на бумажных карточках. Заражение яиц осуществляется в течение суток при температуре 22-25°C и относительной влажности воздуха 60-75%.

6.2. Чтобы оценить наличие и характер материнского влияния на тенденцию к диапаузе дочернего поколения, партию зараженных яиц делят на 4 равные части. Две из них помещают при температуре 25°C в два разных фотопериодических режима - 16 и 10 часов. Две другие части помещают при 20°C в такие же два фотопериодических режима. Таким образом, в материнском поколении мы имеем 4 партии материала. После вылета самкам предоставляют яйца зерновой моли для заражения (см. п. 6.1), после чего их помещают при 10°C. Каждая из 4-х партий должна быть снабжена этикеткой, в которой указывается название вида (популяции), фототермический режим в родительском поколении, дата заражения. Материал находится при 10°C вплоть до вылета бездиапаузных особей.

6.3. Учет результатов опыта проводят путем вскрытия зараженных яиц. Диапаузирующими считаются особи, не окуклившиеся в течение 2-х недель после окончания вылета бездиапаузных особей. В каждом варианте опыта необходимо вскрыть не менее 100 яиц. Если при подсчете процента диапаузирующих особей обнаруживаются существенные различия между вариантами опыта, причиной таких различий может быть влияние условий развития родительского поколения. Анализ результатов опыта завершают выделением условий в родительском поколении, при которых у потомков наблюдается наибольшее количество диапаузирующих особей.

Разработка технологии использования отобранных видов трихограммы в программах защиты растений является отдельным исследованием, основанным на математических подходах и выполняемым с учетом плотности яиц хозяина, соотношения хозяин:паразит и особенностей возделывания защищаемой культуры.

Содержание маточных культур энтомофага, массовое его разведение для последующих выпусков в природу осуществляется в соответствии с "Методическими указаниями по промышленному производству трихограммы на биофабриках" (1983), рекомендациями "Технология производства и применения трихограммы в РСФСР" (1990) и другими методиками.

Литература

Май Фу Кви. Экспериментальное исследование энтомофагов рода *Trichogramma*. Автореф. кандид. дисс., Л., 1983, 22 с.

Методическое руководство по выявлению, определению и изучению трихограммы. М., 1979, 57 с.

Методические указания по промышленному производству трихограммы на биофабриках. МСХ СССР, ВАСХНИЛ, ВНИИБМЗР. Под ред. Ш.М.Гринберга, А.С.Абапкина, В.А.Черкасова. М., 1983, 76 с.

Сорокина А.П. Определитель видов рода *Trichogramma* Westw. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) мировой фауны. М., 1993, 76 с.

Технология производства и применения трихограммы в РСФСР. Рамонь, 1990, 61 с.

Ferreira L., Pintureau B., Voegele J. Un nouveau type d'olfactometre. Application a la mesure de la capacite de recherche et a la localisation des substances attractives de l'hote chez les *Trichogrammes* (Hym., Trichogrammatidae). /Ann. Zool. Ecol. anim., 11, 2, 1979, p.271-279.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОПЫТНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОМУ ИСПЫТАНИЮ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА ХИТИНА В ЗАЩИТЕ ШАМПИНЬОНОВ ОТ ВРЕДИТЕЛЕЙ

Е.П.Мокроусова, И.Н.Глазунова

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Необходимым элементом технологии выращивания шампиньонов является применение химических средств защиты растений. Однако, параллельно с ростом их применения выявлялись побочные эффекты, которые не только значительно снижают эффективность самого метода, но и делают его опасным. Многие инсектициды могут аккумулироваться в почве, что создает предпосылки для загрязнения продукции.

Новый подход, обещающий разрешить эти трудности, найден и связан с использованием регуляторов роста и развития насекомых (РРН) - ингибиторов синтеза хитина (ИСХ) и ювеноидов. На их основе были созданы высокоэффективные против двукрылых препараты зарубежного и отечественного синтеза. В ВИЗР в последние годы ведутся исследования по разработке и технологии их использования, организации производственных испытаний.

ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ВРЕДИТЕЛЕЙ ШАМПИНЬОНОВ

Наиболее распространенными и опасными вредителями шампиньонов являются личинки двукрылых насекомых, относящихся к семействам *Sciaridae*, *Phoridae*, *Cecidomyiidae*. Потери, вызываемые этими насекомыми, достигают 38-40% планируемого урожая, а в отдельных случаях мицелий и плодовые тела полностью уничтожаются.

Сем. сциарид (ликориид); *Sciaridae*; *Diptera*. Грибные комарики этого семейства в наибольшей степени распространены и представляют обширную группу двукрылых насекомых, повреждающих шампиньон при искусственном выращивании. В шампиньонницах можно встретить примерно 12 видов этого семейства, однако наиболее вредоносны *Lycoriella solani*, *L.auripila*, *L.fucorum*, *Bradisia brunripes*. По внешнему виду все сциариды мало различаются. Имаго мелкие, длиной 2-4 мм, голова темноокрашенная, шаровидная, опущенная книзу; глаза фасеточные, почковидной формы; антенны длинные, нитевидные, состоящие из 15-16 члеников. Грудь черная, на ней находится пара прозрачных крыльев с постоянным жилкованием и ярко выраженной костализацией (рис.1а). Ноги удлиненные, вершины голеней ног имеют по одной шпоре, средние и задние - по две шпоры. Брюшко удлиненно-коричневое, заостренное к заднему концу, сверху темное, снизу желтоватое, оканчивающееся

яйцекладом у самок и гипопигием у самцов. Взрослые самки активны в течение 5 дней, самцы - на несколько дней больше.

Самка откладывает 150-170 яиц по одному или группами по 20-40 штук в субстрат, покровный материал или на плодовые тела. Яйца белые, блестящие, полупрозрачные, овальной формы и длиной от 0.15 до 0.7 мм (у разных видов), развитие в яйце в зависимости от температуры продолжается от 4 до 10 дней.

Вредящая фаза - личинки, развиваются в зависимости от температуры и влажности 8-16 дней. За этот период личинка проходит четыре возраста, каждый из которых характеризуется определенным размером головной капсулы. Личинка последнего возраста достигает длины 5-8 мм, имеет черную головную капсулу, тело ее состоит из 12 сегментов, покрыто прозрачной кутикулой, сквозь которую просвечивает темный кишечник. Личинки окукливаются в субстрате, покровном материале, реже - внутри плодовых тел в тонком паутинном коконе.

Вредоносность личинок сциарид велика. Они уничтожают ризоморфы, вызывая массовую гибель зародышей плодовых тел, проникают в плодовые тела, прогрызая в них многочисленные ходы. Кроме того, комарики являются переносчиками растительных болезней и грибных болезней.

Куколка белого цвета с более темной спинной стороной, усаженной короткими черными волосками. К моменту вылета грибного комарика куколка становится черной. В зависимости от окружающей среды куколка развивается 5-7 дней.

Общая продолжительность цикла индивидуального развития колеблется от 24 до 38 дней.

Сем. горбатов, Phoridae; Diptera. Наибольший вред шампиньону причиняют мухи *Megaselia agarici*, *M. nigra*, *M. palterata* и др. Мухи-горбатки встречаются в шампиньонницах реже, чем грибные комарики-сциариды, но способны наносить большой ущерб культуре шампиньона.

Мухи этого семейства - насекомые со вздутой горбовидной грудью, крепкими ногами и утолщенными бедрами. Крылья прозрачные с продольным, типичным для семейства и резко выраженным жилкованием по переднему краю. Длина тела 3-4 мм, на голове короткие усики (рис.1в). Самки горбатов очень плодовиты, в одной кладке может быть от 100 до 200 яиц. Продолжительность развития яйца 5-10 дней.

Личинки крупные, длиной около 4 мм, белого цвета, головная капсула светлая, редуцированная, имеющая вид гибкого хоботка, задний отдел тела утолщен. Развитие личинки длится 7-14 дней. Окукливаются личинки в пупариях в поверхностных слоях покровного материала.

Личинки питаются мицелием и тканями плодовых тел, прогрызая многочисленные ходы, в результате чего плодовые тела темнеют

и загнивают. Кроме того, форииды переносят возбудителей различных болезней, например, сухой гнили плодовых тел.

Куколка овальная, желтовато-белая, длиной около 2 мм, с двумя черными дыхальцами; развивается от 4 до 7 дней в зависимости от температуры.

Общий цикл развития - от 20 до 35 дней.

Сем. галлиц, Cecidomyiidae; Diptera. Для культуры шампиньона наиболее вредоносны *Mycophila speyeri*, *M. barnesi*, *Heteropeza rugosa* (рис.1б). Взрослые особи очень мелкие, длиной 1-2 мм с четко видимыми усиками, крылья имеют продольное жилкование. Имаго живут 2-3 дня.

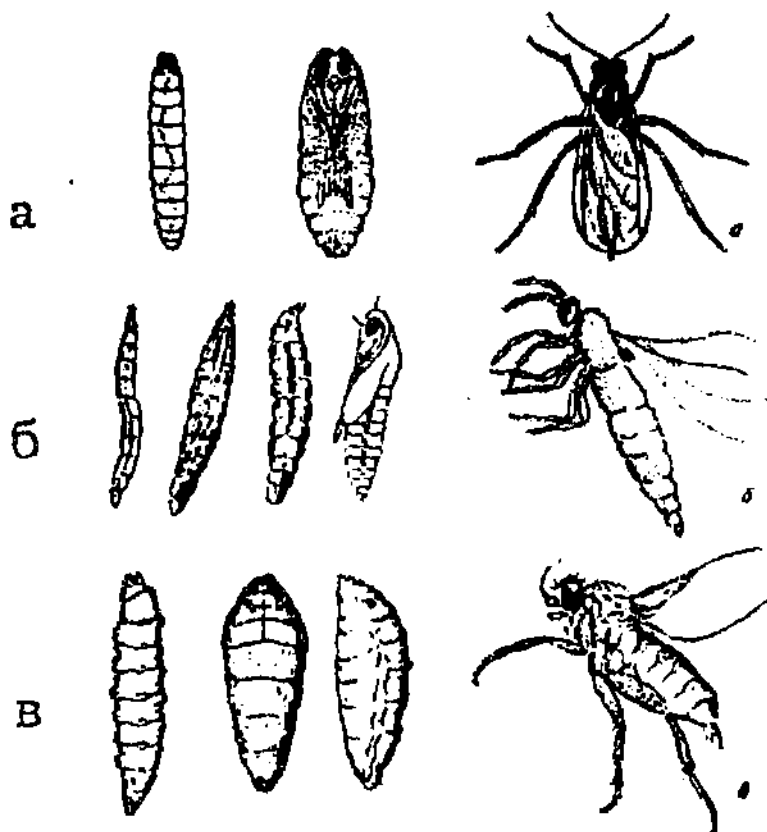


Рис. 1. Грибные комарики и мухи

а - комарик сем. Sciaridae

б - комарик сем. Cecidomyiidae

в - муха сем. Phoridae

Галлицам свойственен жизненный цикл, отличающий их от основных представителей двух предыдущих семейств. Характерная особенность представителей этого семейства - способность личинок к бесполому размножению (педогенезу). В течение 5-6 недель жизни личинок происходит смена поколений через каждые 7-8 дней. Из каждой личинки отрождается от одной до десяти личинок следующего поколения. Кроме того, личинки галлиц при наступлении неблагоприятных условий способны впадать в анабиоз. В этом состоянии личинка, содержащая в себе молодых личинок, темнеет и становится твердой. При наступлении благоприятных условий цикл развития продолжается.

Личинки галлиц питаются мицелием шампиньонов, соединительными ризоморфами, вызывая массовое увядание и гибель зародышей плодовых тел. Наблюдается скопление личинок у основания ножек грибов. Одновременно личинки вбуравливаются в ножку плодового тела, прогрызают поверхностные ходы и проникают под шляпку, скапливаясь там в большом количестве. Этот тип повреждений характеризуется появлением желтоватых или оранжевых полос вдоль поверхностных ходов, вследствие чего плодовые тела теряют товарный вид, несмотря на пригодность к употреблению.

В связи с указанными особенностями цикла развития личинок галлиц они редко окукливаются в шампиньонницах. Окукливаются они в коконе, иногда в виде пупария, внутри слоя покровного материала. Куколка, в зависимости от условий температуры и влажности, развивается 8-14 дней.

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА ХИТИНА

При оценке перспектив применения РРН против вредных двукрылых большинством исследователей предпочтение отдается ингибиторам синтеза хитина - ИСХ (личинным ингибиторам). Эта группа РРН имеет много общих черт с другими биологически активными веществами (аналогами ювенильного гормона, антиювенильными препаратами, аналогами личиночного гормона экдизонами), но имеет и свои особенности. К настоящему времени создано немало различных ИСХ. Основные и наиболее активные соединения приведены ниже.

Наименование препарата	Особенности действия
Дифторбензурон, димилин 25 сп	Нарушение процессов линьки. Овицидное и стерилизующее действие на некоторых видах
Тетфторбензурон, номолт 15 кэ, СМЕ-134	То же
Хлорфлуазурон, эйм-120, ССА-112913	Нарушение процессов линьки. Стерилизующий эффект для многих видов
Циромазин, тригард	Нарушение процессов линьки у двукрылых насекомых

Наиболее характерным признаком ИСХ подобно другим БАВ, отличающим их от традиционных инсектицидов, является отсутствие при рекомендуемых дозах применения прямого токсического эффекта. Воздействие ИСХ на насекомых не приводит к их немедленной гибели, но резко нарушает последовательность процессов онтогенетического развития, что приводит к неспособности нормального завершения онтогенеза, подавлению репродуктивных функций.

Особенностью ИСХ является широкий диапазон чувствительности насекомых к ним. При действии ИСХ на личинок младших возрастов наступает их гибель при очередных после обработки линьках.

Под влиянием действия личинных ингибиторов на старшие возрасты наблюдаются отсроченные эффекты, проявляющиеся в снижении жизнеспособности насекомых на последующих этапах онтогенеза. Овицидное действие ИСХ наиболее полно проявляется при откладке яиц на обработанные поверхности. Существенно, что чувствительность яиц к ИСХ изменяется на протяжении их развития. Например, яйца вредителя шампиньонов *Lycoriella solani* наиболее чувствительны к ИСХ в первые 0-24 часа. В дальнейшем эффективность препаратов этой группы снижается и к третьему дню при оп-

тимальных условиях температуры и влажности становится минимальной. Действие ИСХ на куколок сопровождается формированием уродливых нежизнеспособных имаго, а обработка взрослых насекомых может приводить к нарушениям репродуктивных функций, проявляющимся в снижении общей плодовитости самок, частичной или полной стерилизации у отдельных видов или ослаблении жизнеспособности яиц.

Важно подчеркнуть, что на протяжении каждой фазы происходит закономерное изменение уровней чувствительности к ИСХ, различия которых могут достигать 100 раз и более. В связи с этим важным условием получения высокой эффективности воздействия ИСХ на популяции вредителей является точное соблюдение сроков проведения обработок, которые, как правило, должны проводиться в момент откладки яиц или при преобладании в популяции личинок младших возрастов.

Указанные особенности ИСХ в сочетании с длительным (до 14 недель) сохранением активности позволяют в ряде случаев однократной обработкой вызвать нарушение развития всех или большинства фаз вредителя.

ИСХ мало токсичны для человека и теплокровных животных, слабо токсичны для почвенных микроорганизмов и не накапливаются в ощутимых количествах в пищевых продуктах. Последнее обстоятельство позволяет применять ИСХ в борьбе с вредными двукрылыми на шампиньонах.

Для обеспечения оптимальных сроков проведения обработок необходимо правильное понимание технологии выращивания защищаемой культуры в момент ее заселения вредителем.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА ХИТИНА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ШАМПИньОНОВ ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Основные технологические приемы выращивания шампиньонов

Технологический процесс выращивания шампиньонов включает в себя четыре взаимосвязанные операции: приготовление питательного субстрата (компоста), подготовку покровного почвенного материала, выращивание посадочного материала-мицелия и выращивание культуры шампиньона.

В соответствии со схемой технологического процесса в грибоводстве используют две системы выращивания грибов - однозональную и многозональную (двух-, трехзональные). Они различаются по способу выращивания, механизации технологических процессов и, соответственно, по объемам производственных зданий и культивационных помещений.

Однозональная система предусматривает выполнение всех производственных процессов, начиная с момента наполнения помещения субстратом, в одном помещении - камере выращивания. При многозональной системе используется несколько специальных помещений: в одном из них производят пастеризацию питательного субстрата, в другом - проращивание мицелия и т.д. Применение многозональной системы требует неоднократного перемещения культуры шампиньона по техническому коридору (рис.2).



Рис.2. Заселение культивационных камер двукрылыми вредителями шампиньонов при различных системах выращивания грибов

Различия в технологических процессах выращивания шампиньонов по однозональной и многозональной системам определяют различия в фенологии вредителей и, соответственно, в сроках использования ИСХ.

Определение сроков обработки ингибиторами синтеза хитина

Вредители шампиньонов проникают в помещения для выращивания грибов и приступают к откладке яиц, когда компост вентилируется после пастеризации высокими температурами. Такие инвазии шампиньонных мух приводят к развитию первой генерации в течение 3-4 недель после откладки яиц.

В условиях однозональной системы выращивания грибов компост доставляется к культивационным камерам и загружается на стеллажи без предварительной пастеризации, которая производится позднее, в этих камерах выращивания (рис.2Б). После пастеризации в течение суток при температуре 55°C и охлаждения компост инокулируется мицелием и покрывается полиэтиленовой пленкой или бумагой для сохранения необходимой влажности (14 дней). Эти технологические приемы обеспечивают уничтожение вредителя, уже заселившего компост при его транспортировке и загрузке, а также предохраняют его от дополнительного заселения кладками шампиньонных мух, обитающих в культивационных камерах. Таким образом, при этой технологии массовое заселение культивационных гряд яйцами шампиньонных мух происходит уже после снятия защитного покрытия в период нанесения покровной почвы.

В условиях многозональной системы выращивания грибов, при которой пастеризация компоста проводится в специальных тоннелях, его заселение вредителями происходит в тех же тоннелях после его охлаждения и в дальнейшем - при транспортировке по технологическому коридору, при укладке на культивационные стеллажи и после посадки мицелия (рис.2А).

Максимальную эффективность и своевременное предупреждение повреждений мицелия и грибов ингибиторы синтеза хитина дают при применении их в период массовой откладки яиц и в начале отрождения личинок. В этом случае гибель вредителей начинается еще в фазе яйца и достигает максимума в период развития первого и второго возрастов личинок. Наиболее подходящим сроком обработки ИСХ при однозональной технологии выращивания шампиньонов являются первые три дня после нанесения покровной почвы. При использовании многозональных технологий оптимальным сроком применения ИСХ может быть период сразу после вентилирования и охлаждения компоста перед посевом мицелия.

Снижение численности вредителей с помощью ингибиторов синтеза хитина

К настоящему времени известно несколько десятков ИСХ, среди которых против вредителей шампиньонов в наибольшей степени используются димилин, номолт и тригард (табл.1).

Таблица 1. Высокоэффективные ингибиторы синтеза хитина против вредителей шампиньонов (по Дмоку, 1993)

Наименование препарата	Рекомендуемая норма расхода, г/м ² д.в.
Димилин, 25 сп	0.8 - 1.0
Номолт, 15 кэ	0.2 - 0.5
Тригард, 15 кэ	0.8 - 1.0

Наиболее активен димилин, действующее вещество которого дифторбензурон-мочевина входит в состав препарата, выпускаемого в Нидерландах. Производство препарата планируется и в Российской Федерации. Димилин выпускается в виде 25% смачивающегося порошка и используется в виде суспензии при поливе культивационных гряд шампиньонов с помощью поливочной машины, обычно используемой при культивировании грибов в шампиньонницах. При этом последний срок применения - не менее чем за 25-30 дней до уборки урожая шампиньонов.

Для снижения численности вредных двукрылых димилин и его аналоги применяют в количестве от 0.2 до 1 г/м² д.в. при норме расхода рабочей жидкости 1-1.5 л/м². При внесении димилина в компост норма расхода должна быть увеличена до 10 г/м² д.в. Если исходная плотность мух очень высока, необходимо предварительно использовать какой-либо имагоцид, а затем приступить к программе применения ИСХ. При использовании димилина в условиях однозональной системы выращивания грибов достаточно одной обработки в первые три дня после нанесения покровной почвы для полного подавления вредителей. В условиях многозональной системы возможна двукратная обработка. Однако, если вторую обработку проводить также в первые дни после нанесения покровной почвы, лучше использовать другие регуляторы роста и развития насекомых, высокоэффективные против поздних этапов развития вредителей. К их числу относятся, прежде всего, ювеноиды - апекс, ювемон и др.

МЕТОДЫ УЧЕТА ЧИСЛЕННОСТИ НАСЕКОМЫХ

С целью получения точной информации о сроках развития вредителей и динамике их численности до и после опрыскивания ИСХ необходим еженедельный учет количества почвообитающих фаз и имаго.

Методы выделения личинок и куколок двукрылых вредителей шампиньона из почвосодержащих субстратов

Выделение насекомых из почвосодержащей среды обитания осуществляется путем взятия проб по общепринятой методике. На культивационных грядах в камере культивирования шампиньона отбирается не менее 5 образцов питательного субстрата объемом 150-200 мл каждый. Пробы, выделенные с разных участков, объединяют в один образец, тщательно перемешивают, делят на 4 части, из которых отбирают равные объемы в единую пробу 100 мл, и ее анализируют.

Наиболее простым, не требующим специальной подготовки, методом анализа пробы, выделенной из компоста или покровной почвы, является прием ручной разборки, когда весь материал просмат-

ривают под бинокулярной лупой. Ручная разборка питательного субстрата позволяет выделить практически все преимагинальные фазы развития насекомых, однако этот метод является наиболее трудоемким.

Второй способ извлечения личинок и куколок из почвенного образца заключается в помещении пробы 100 мл в воронку, сверху снабженную стеклянным колпачком, улавливающим взрослых шампиньонных мух после завершения личиночно-куколичного развития.

Третьим и наиболее точным является метод флотации, основанный на использовании соединений, способствующих выделению насекомых (40% раствор сахара, серного цинка, хлористого натрия и др.). При использовании этого метода проба 100 мл субстрата заливается 1 л воды с добавлением 20 мл спирта и после тщательного перемешивания отстаивается в течение 0.5 часа. Для удаления посторонних включений из образца пробу промывают затем через систему сит 2.5 мм, 1 мм и 0.5 мм. Фракцию с сита 0.5 мм, в которой в основном могут присутствовать личинки вредных двукрылых, смывают и помещают в 40% раствор сахара, далее отстаивают в течение одного часа или центрифугируют 1 минуту со скоростью 3 тыс. оборотов/мин. В обоих случаях жидкость с плавающими насекомыми декантируют на фильтр, расправляют его, помещают в чашку Петри и просматривают под бинокулярной лупой.

Метод световых клеевых ловушек

Метод основан на способности большинства имаго двукрылых насекомых привлекаться светом с длиной волны, соответствующей синей части спектра. Световая ловушка представляет собой лампу дневного света длиной 60 см с каркасом диаметром 15 см, на который натягивается полиэтиленовая пленка с четырьмя ловчими клеевыми поверхностями с наружной стороны размером 7×8 см. Такая лампа устанавливается в культивационной камере на 20 минут. Еженедельный отлов насекомых дает представление о видовом составе и динамике численности вредных двукрылых.

Сопоставление показателей плотности популяций, полученных методами с использованием световых клеевых ловушек и выделения преимагинальных фаз из почвосодержащих субстратов, позволяет определить наличие корреляционной связи между уловами имаго и числом находящихся в почве личинок и куколок. При помощи регрессионного анализа показано, что даже небольшое количество отловленных сциарид (*Lycoriella* spp.) свыше 5 экз/ловушку за 20 минут свидетельствует о превышении экономического порога вредности личинок, равного 1 личинке на 123 г почвенного материала).

Метод световых клеевых ловушек является наименее трудоемким и самым простым. С помощью этого метода можно установить

начало, проследить динамику лета вредителей шампиньонов и определить целесообразность проведения защитных мероприятий. Использование описанного метода значительно повышает производительность труда обследователей помещений на зараженность различными группами вредных двукрылых, позволяет сократить масштабы применения химических обработок, что способствует не только улучшению экологической обстановки, но и экономит большое количество пестицидов.

Определение биологической активности ингибиторов синтеза хитина

Методы оценки результатов обработки ИСХ несколько отличаются от таковых, применяемых при производственных испытаниях инсектицидов. Это отличие связано с временем проявления эффектов. Если результаты применения инсектицидов начинают проявляться уже через несколько часов после обработки, а окончательно эффективность большинства соединений можно оценить на 3-5 сутки, то для ИСХ проявление эффекта можно оценивать не раньше, чем через 10-14 дней. При этом необходимо иметь в виду, что результаты обработки могут проявляться и на последующих стадиях развития, выражаясь в снижении жизнеспособности и плодовитости имаго, появлении в кладках стерильных яиц, увеличении смертности эмбрионов и личинок младших возрастов следующей генерации.

В связи с этим, общий конечный эффект воздействия однократной обработки ИСХ на динамику популяций вредителей может в несколько раз превышать таковой, определенный на основе учета изменений численности личинок и куколок через 14 дней после обработки или появления взрослых особей первого поколения.

Наиболее целесообразно использовать три основных метода оценки эффективности ИСХ в условиях производственных испытаний. Первый из них основан на определении снижения численности особей в вариантах с обработкой ИСХ по сравнению с контролем при условии одинаковой первоначальной численности (при отсутствии насекомых), например, при однозональной системе выращивания шампиньонов, когда обработка ИСХ осуществляется в момент начала заселения культивационных камер. Учеты численности вредителей проводятся еженедельно. Количество проб зависит от плотности насекомых и должно обеспечивать получение достоверных данных о наличии или отсутствии эффекта к концу развития первой генерации.

Расчет эффективности ($\mathcal{E}\%$) ведется по формуле:

$$\mathcal{E}\% = 100(1 - A/B),$$

где A - плотность вредителя на опытном участке после обработки

его ИСХ, В - плотность вредителя на контрольном участке в то же время.

В условиях многозональной системы выращивания грибов расчет эффективности при повторной обработке проводится с использованием показателей исходной численности вредителя в опыте и контроле:

$$\mathcal{E}\% = 100(1 - B_a/A_b),$$

где А - плотность вредителя на опытном участке до обработки, В - то же после обработки, а - плотность вредителя в контроле до обработки опытного участка, в - то же после обработки опытного участка.

Эти приемы позволяют получить объективные данные о сравнительной эффективности испытываемых препаратов, однако дают несколько заниженную оценку их влияния на динамику численности вредителя. Они не учитывают возможных эффектов, связанных со снижением жизнеспособности окрыляющихся имаго, сокращением их плодовитости и проявлением стерилизующих эффектов. Учесть подобные отложенные эффекты позволяет третий метод, основанный на сопоставлении изменений численности вредителя в двух последовательных генерациях. Этот метод наиболее успешно может применяться на производственных комплексах - в шампиньонницах, когда обрабатываются отдельные, часто герметизированные камеры и соблюдается необходимое в данном случае требование территориальной разобщенности контроля и опыта. Кроме того, метод пригоден и с учетом вредителей шампиньонов, дающих не менее двух генераций за период одного оборота культуры. При оценке эффективности сопоставляются данные по плотности одной и той же фазы развития вредителя родительского и дочернего поколений в контроле и в варианте с обработкой.

Вычисление ведется по формуле:

$$\mathcal{E}\% = 100(A_b - aB)/A_b,$$

где А - плотность родительского поколения в опыте, В - плотность дочернего поколения в опыте, а - плотность родительского поколения в контроле, в - плотность дочернего поколения в контроле.

Производственная проверка димилина и его аналогов на комплексе по выращиванию шампиньонов АО "Лето" (Санкт-Петербург) показала, что ИСХ по эффективности значительно превосходят традиционные инсектициды. Однократная обработка димилином культурационных гряд в первые три дня после нанесения покровной почвы на 94-96% подавляет развитие сциарид с преобладанием в них видов *Lycoriella auripila*, *L. solani* в 1 и 2 поколениях и заменяет две обработки пиретроидами, разрешенными к применению на шампиньонах. Аналогичные результаты могут быть получены, по мне-

нию ряда авторов, при работе с насекомыми из сем. Phoridae. Однако, для представителей сем. Cecidomyidae действие ИСХ мало изучено. Как правило, для предотвращения их массового появления в шампиньонницах необходимо соблюдать комплекс профилактических мероприятий, которые сводятся к следующему:

- строгое соблюдение санитарно-гигиенических правил в шампиньоннице и чистоты на прилегающей территории, ежедневное удаление остатков субстрата и грибных отходов с территории шампиньонницы,

- компостирование субстрата следует проводить на специальной площадке с твердым покрытием или в закрытом помещении с соблюдением гигиенических норм,

- пастеризацию субстрата необходимо проводить при строгом соблюдении регламента - при температуре 58-60°C в течение 6-12 часов.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА ХИТИНА

Практически все известные ингибиторы синтеза хитина малотоксичны для теплокровных животных и человека, имеют ЛД₅₀ более 1000 мг/кг и могут быть отнесены по степени токсичности к IV группе химических средств защиты (малотоксичные).

По стойкости они относятся к группе "стойкие" и не обладают высокой летучестью.

Тем не менее, работа с ИСХ требует соблюдения правил техники безопасности, устанавливаемых при работе с химическими веществами и пестицидами. Необходимо предотвращать попадание препаратов на кожные и слизистые покровы, в глаза, ротовую полость и дыхательные пути, применяя специальную рабочую одежду, резиновые перчатки, респираторы. При случайном контакте с препаратом тщательно промывают загрязненные поверхности щелочной или мыльной водой и протирают спиртом.

Литература

Буров В.Н., Сазонов А.П. Биологически активные вещества в защите растений. М., 1987, 200 с.

Буров В.Н. Методы испытаний гормональных препаратов (регуляторов роста, развития и размножения насекомых). Методические указания. Л., ВИЗР, 1983, 34 с.

Девочкин Л.А. Шампиньоны. М., 1989, 174 с.

Dmoch L. Zasady stosowania pestycydow przy zwalczaniu szkodnikow w pieczarkarneath zwalczania postaci doroslych muchowek. /Pieczarki, 3, Warszawa, 1992, p.4-8.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РАЗВЕДЕНИЮ И ПРИМЕНЕНИЮ ХИЩНОГО КЛЕЩА *NEOSEIULUS CUCUMERIS* В БОРЬБЕ С ПРОЗРАЧНЫМ ЗЕМЛЯНИЧНЫМ КЛЕЩОМ

Ю.И.Мещков

Всероссийский НИИ фитопатологии, Москва

Введение

Земляничный клещ *Phytonemus pallidus* (Banks) является одним из наиболее опасных вредителей садовой земляники. В результате обследований, проведенных в 1990-1993 гг., фитофаг был выявлен во всех специализированных ягодководческих хозяйствах Московской области. Несмотря на агротехнические мероприятия, направленные на оздоровление посадочного материала и проведение ухода, на плантациях плодоносящей земляники наблюдается ежегодное накопление земляничного клеща, приводящее через 3-4 года эксплуатации насаждений к их сильному повреждению. Значительной численности вредитель может достигать в годы с сухим и жарким летом. Например, в АОЗТ им.Ленина (Ленинский район) в августе 1990 г. заселенность растений первого года посадки достигала 14% при средней плотности популяции земляничного клеща 6.7 особи/лист, что соответствовало численности 23.5 особи/растение. В необычайно засушливое лето 1992 г. заселенность растений аналогичного поля (первый год посадки) повысилась до 35%, а плотность популяции достигала 99.3 особи/растение.

Развитие и размножение земляничного клеща проходит на молодых неразвернувшихся листьях. В результате повреждения физиологически молодых тканей происходит торможение роста листьев, снижается урожайность на 40-70%, растения теряют засухоустойчивость, снижается зимостойкость, иммунитет, меньше образуется цветков (Савдарг, 1958; Goto, Tsuchizaki, 1980).

Земляничный клещ ведет скрытный образ жизни в течение большего периода вегетации растений. Наиболее эффективны в борьбе с этим вредителем системные пестициды. Но только на маточниках и в питомниках разрешены препараты на основе эндосульфана (тиодан, 35% к.э., тиодан, 50% с.п., эндосел, 35% к.э.), тогда как на плодоносящих плантациях возможно применение лишь контактного пестицида (карбофос, 50% к.э.), уничтожающего лишь свободноживущих особей вредителя. Однако применение химических препаратов приводит к массовой гибели природных врагов земляничного клеща.

Среди естественных врагов земляничного клеща первостепенное значение имеют хищные клещи фитосейиды. В Московской области

на землянике садовой наиболее обычным является *Neoseiulus herbarius*. Реже встречаются другие виды хищных клещей *N. zwoelferi*, *N. reductus* и *Typhlodromips rademacheri*. На индивидуальных садовых участках фитосейиды сдерживают рост численности вредных клещей в течение вегетационного периода. В промышленных хозяйствах из-за пестицидного пресса видовое разнообразие и суммарное обилие фитосейид низкие, следствием чего является постоянный и неконтролируемый популяционный рост земляничного клеща.

В лаборатории акарологии и энтомологии ВНИИФ изучены возможности использования естественных врагов земляничного клеща, обосновано применение перспективного акарифага *Neoseiulus cucumeris*, лабораторная культура которого ввезена в Россию из Западной Европы профессором Г.А.Бегляровым в 1989 г.

Биологические особенности хищного клеща *Neoseiulus cucumeris*

N. cucumeris относится к семейству фитосейидных клещей Phytoseiidae отряда Parasitiformes. Взрослые особи небольшие (длина самки 0.6 мм, самца - 0.43 мм), желтовато-коричневые, весьма подвижны. Яйца беловатые, овальной формы (0.23 × 0.18 мм). Молодые особи малоподвижные, окраска тела от прозрачного до молочно-белого. Личинки шестиногие, не питаются. После первой линьки клещи приступают к питанию.

N. cucumeris является космополитом. Он обнаружен во многих странах Европы (в том числе на территории бывшего СССР), в Северной и Южной Америках, Египте, Израиле, Индии, Новой Зеландии и в Австралии. Хищник обитает на разнообразных древесных, кустарниковых и травянистых растениях, обычен в подстилке и в гнездах грызунов (Mogaes et al., 1986).

Как и большинство представителей семейства *N. cucumeris* является активным акарифагом. Его жертвами могут быть тетранихидные, тарзонемидные, пироглифидные и акароидные клещи.

Вид корма оказывает влияние на продолжительность развития и плодовитость хищного клеща. Из таблицы видно, что при питании земляничным клещом нимфы *N. cucumeris* развиваются в 1.5-2.5 раза быстрее, чем при питании обыкновенным паутиным клещом, а самки раньше приступают к откладке яиц и в течение репродуктивного периода характеризуются высокой плодовитостью.

При сравнительном испытании выпуска на растения земляники нескольких видов фитосейид установлено, что хищники по-разному используют имеющиеся пищевые ниши. В отличие от *N. herbarius* и *N. reductus*, большинство особей *N. cucumeris* после выпуска концентрируются на молодых неразвернувшихся листьях, являющихся местами локализации и размножения земляничного клеща, и лишь

незначительная часть особей остается на взрослых листьях в колониях паутинного клеща.

Таблица. Развитие *N. cucumeris* при питании разными видами клещей, повреждающих землянику ($t=25^{\circ}\text{C}$, $\text{RH}=80\%$)

Биологические показатели	Вид корма	
	обыкновенный паутинный клещ	земляничный клещ
Продолжительность развития самок (сут.)	9.8 ± 0.6	6.2 ± 0.3
Продолжительность развития самцов (сут.)	8.9 ± 0.9	6.0 ± 0.2
Продолжительность репродуктивного периода (сут.)	34.7 ± 8.4	20.6 ± 4.2
Плодовитость (яиц)	31.8 ± 8.9	45.6 ± 9.9
Среднесуточная плодовитость (яиц)	0.9 ± 0.1	2.2 ± 0.2
Соотношение полов в потомстве (самка:самец)	1.56 : 1	2.13 : 1
Истинная скорость роста популяции	0.089	0.187

По демографическим показателям *N. cucumeris* при питании земляничным клещом ($t=25^{\circ}\text{C}$) превосходит всех изученных фитосейидных клещей. Так, для *N. herbarius* истинная скорость роста (r) составляет 0.127, *N. reductus* - 0.172, а для *N. cucumeris* - 0.187.

Массовое разведение хищного клеща *N. cucumeris*

Для целей массового разведения *N. cucumeris* наиболее пригоден в качестве корма удлиненный клещ *Tyrophagus putrescentiae*. Расчеты показывают, что при питании этим кормом хищнику присуща наиболее высокая скорость роста популяции (r), равная 0.205.

Хищных клещей разводят на пшеничных отрубях отсеянной фракции более 2 мм. В ходе подготовки субстрата отруби прогревают при 60°C в течение 24 часов, а после остывания увлажняют. На каждый 1 кг отрубей с помощью опрыскивателя добавляется примерно 200 мл воды при тщательном перемешивании. Для заселения используют маточную культуру удлиненного клеща (4 тыс. особей/ cm^3) и культуру хищного клеща (60 самок/ cm^3). С этой целью в каждые 4 объемные части отрубей вносится 1.5 объемные части субстрата с удлиненным клещом и 0.5 объемные части субстрата с хищником.

Подготовленный таким образом новый субстрат размещают по садкам. Оптимальный объем субстрата в садке при разведении *N. cucumeris* - 1.5 л. Каждый садок представляет собой две ёмкости (стеклянные кристаллизаторы) разных размеров, вставленные одна в другую, с таким расчетом, чтобы зазор между их стенками был не

менее 3-5 см. В большую (внешнюю) емкость садка наливают 200 мл воды, а стекло, покрывающее садок, сдвигают, оставляя зазор 1.5-2 см, что обеспечивает поддержание влажности воздуха над субстратом в садке на уровне 80-90 %. Для улучшения аэрации и предотвращения слеживания субстрата его необходимо периодически (раз в 2-3 дня) перемешивать.

Численность *N.cucumeris* за 14 дней увеличивается с 5 до 60 самок/см³. По истечении этого срока культивирования хищника можно использовать для колонизации на растения.

Проведение испытаний биологической эффективности хищного клеща *N.cucumeris* на садовой землянике

Колонизация *N.cucumeris* на посадки садовой земляники обеспечивает высокую эффективность и защитное действие до конца вегетационного периода. Оптимальным временем колонизации акарифага является период цветения земляники. В этот период норма выпуска хищника составляет 20 самок/растение. При более поздней колонизации (период начала плодоношения) норма выпуска *N.cucumeris* увеличивается от 40 до 100 самок/растение.

Перед транспортировкой субстрат с хищным клещом пересыпают в полиэтиленовые пакеты (60 × 100 см), заполняя не более 1/2 объема, и, не закрывая их плотно, помещают в холодильник при +5°C на 2-3 часа. В течение этого времени температура в субстрате снижается, что обеспечивает благоприятные условия для хищника во время перевозки.

При выпуске хищного клеща путем ручного посева целесообразно смешать субстрат с инертным наполнителем (чистые отруби, древесные опилки и т.п.) в пропорции, обеспечивающей единовременный выпуск неосейулюса на каждое растение по требуемой норме в небольшом (5 см³ субстрата) объеме. При норме выпуска 20 самок/растение смешивается 1 объемная часть субстрата с хищным клещом (плотность популяции 60 самок/см³) и 15 объемных частей наполнителя, при норме 40 самок/растение - соответственно 1 и 7 частей.

Основными показателями биологической эффективности применения *N.cucumeris* являются данные, характеризующие изменение численности земляничного клеща, степень поврежденности растений, динамику численности компонентов в системе "хищник-жертва".

Обследование растений земляники на плантациях 1-го, 2-го и 3-го годов посадки с целью выяснения степени заселенности земляничным клещом проводится в три срока: в весенний период (начало мая), после сбора ягод (июль) и перед уходом клещей на зимовку (сентябрь). В случае обнаружения земляничного клеща проводится

специальный учет, позволяющий определить плотность популяции вредителя, границы распространения очага, степень повреждения.

В день выпуска хищного клеща или за 1-2 дня до этого проводят первый учет численности вредных клещей, в дальнейшем еженедельно или раз в две недели до окончания вегетации растений. С этой целью отбирают пробу по 50 молодых неразвернувшихся листьев из различных рядов опытного и контрольного участков.

Подсчет числа клещей на листьях проводится в лаборатории с использованием бинокулярного микроскопа. Обнаруженных хищных клещей необходимо идентифицировать, для чего изготавливают временные или постоянные препараты.

Данные, характеризующие изменения численности вредных клещей на опытных и контрольных участках, начиная с момента выпуска хищника, позволяют рассчитать биологическую эффективность акарифага. Для этого рекомендуется пользоваться следующей формулой:

$$\mathcal{E} = 100 \left(1 - \frac{K_1(O_2 + O_3 + \dots + O_n)}{O_1(K_2 + K_3 + \dots + K_n)} \right),$$

где \mathcal{E} - биологическая эффективность, K - численность земляничного клеща в контроле, O - численность земляничного клеща в опыте, $0, 1, 2, \dots, n$ - порядковый номер учета.

Результаты испытаний хищного клеща

Для выяснения эффективности применения *N. cucumeris* против земляничного клеща нами первоначально были испытаны три нормы выпуска: 1, 10 и 100 самок акарифага на растение. Опытты проводились в ОПХ "Кучино" Балашихинского района и в АОЗТ "Ильинское-Усово" Красногорского района Московской области в 1992 г. В ОПХ "Кучино" исходная плотность популяции вредителя составляла в среднем 50 особей/лист, в АОЗТ "Ильинское-Усово" - 20 (среднее число молодых листьев на растении - 9.5 и 10.8 соответственно).

Установлено, что при высокой норме выпуска (100 самок) численность акарифага снижается, на растениях встречались в основном самки, реже яйца. При низких нормах (1 и 10 самок) хищник способен в течение месяца накапливаться на растениях. Кроме самок на растениях встречались яйца, личинки и нимфы хищника.

При колонизации клеща в ОПХ "Кучино" по 1 и 10 самок/растение, что соответствовало примерно соотношению в системе "хищник-жертва" 1:500 и 1:50, биологическая эффективность акарифага в период формирования цветочных почек достигала 52.1 и 75.5%, соответственно. Наблюдаемый рост численности вредителя был незначительным по сравнению со всплшкой численности земляничного клеща на контрольном участке, где хищника не выпуска-

ли. При норме выпуска *N.cucumeris* 100 самок/растение (соотношение хищник-жертва 1:5) популяция земляничного клеща подавлялась через 2 недели и стабилизировалась до конца вегетационного периода на экономически неопасном уровне. Биологическая эффективность *N.cucumeris* достигала 88.0%.

Аналогичные результаты были получены в АОЗТ "Ильинское-Усово". При нормах выпуска 1 и 10 самок/растение (соотношение хищник-жертва 1:200 и 1:20) эффективность применения *N.cucumeris* достигала 60.9-70.4%, численность вредителя стабилизировалась на уровне 0.5-9.3 особи/лист. В случае увеличения нормы выпуска до 100 самок/растение (соотношение - 1:2) эффективность акарифага достигала 84.5% при стабилизации численности вредителя на уровне 0.2 особи/лист.

В 1993 г. (ОПХ "Кучино") проводились испытания по применению *N.cucumeris* в весенний период во время массового цветения земляники. Были испытаны 2 нормы выпуска хищника: 20 и 40 самок/растение. Установлено, что весенняя колонизация *N.cucumeris* при численности земляничного клеща 0.2-0.7 особи/лист независимо от нормы выпуска обеспечивает высокую биологическую эффективность (86.2 и 95.7%, соответственно).

При сильном заселении растений земляничным клещом применение *N.cucumeris* способом наводняющего выпуска обеспечивает быстрое подавление роста численности фитофага. В середине вегетационного опыта (июль 1994 г., ВСТИСП) численность фитофага достигала в среднем 168.9-204.9 особи/лист. Местный вид *N.herbarius* из-за своей малочисленности не влиял на популяцию земляничного клеща до конца вегетационного периода. После выпуска *N.cucumeris* (19 июля) на опытный участок по норме 300 самок/растение наблюдали резкое снижение численности вредителя до уровня 6.2 особи/лист. По мере уничтожения земляничного клеща *N.cucumeris* в основном мигрировал, однако на растении всегда оставалось несколько самок этого вида. Численность местного вида (*N.herbarius*) оставалась такой же низкой, как и в контроле (0.2 особи/лист). Установлено, что в течение месяца *N.cucumeris* расселялся на расстояние 1.5-2 м из мест первоначального выпуска.

Литература

Савдарг Э.Э. Земляничный клещ. М., 1958, 64 с.

Goto T., Tsuchizaki T. Necrotic symptoms on strawberry buds caused by the cyclamen mite (*Steneotarsonemus pallidus* Banks). /Res. Bull. of Hokkaido Nat. Agr. Exp. Station, 128, 1980, p.1-6.

Moraes G.J., McMurtry J.A., Denmark H.A. A catalog of the mite family Phytoseiidae. References to taxonomy, synonymy, distribution and habitat. EMBRAPA, Brasilia, DF. 1986, 353 p.

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕРОМОННЫХ ЛОВУШЕК НА ПРЕДПРИЯТИЯХ ХЛЕБОПРОДУКТОВ

А.П.Сазонов, И.В.Шамшев, О.Г.Селицкая, И.Н.Глазунова,
И.Н.Каретникова, Т.В.Иванова, Е.Л.Арнольди, В.Н.Буров

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Зерно и продукты его переработки служат пищей для ряда видов насекомых. Одними из наиболее распространенных и опасных вредителей на мукомольных, крупяных, комбикормовых и семяобработывающих заводах, кондитерских фабриках, хлебозаводах и других предприятиях являются мельничная (*Ephestia kuehniella*), шоколадная (*E.elutella*) и южная (*Plodia interpunctella*) огневки. Кроме непосредственного уничтожения продуктов, эти насекомые резко ухудшают их качество, загрязняя отходами жизнедеятельности, а также образуя комья муки, приводящие к преждевременному износу оборудования.

Традиционным методом борьбы с этими насекомыми на предприятиях системы хлебопродуктов является фумигация помещений пестицидами. Однако, это связано с большими техническими сложностями, вызванными необходимостью остановки производственного процесса. Кроме того, даже самое тщательное соблюдение регламентов по применению токсичных веществ всегда таит в себе опасность попадания их в выпускаемую продукцию или отравления персонала предприятий. Здания комбинатов хлебопродуктов часто отличаются сложностью планировки, оборудования и коммуникаций, что в свою очередь затрудняет проветривание помещений после применения пестицидов. Кроме того, применение пестицидов на предприятиях по производству хлебопродуктов регламентировано жесткими санитарно-гигиеническими нормами.

Использование феромонных ловушек позволяет сократить (а в некоторых случаях полностью исключить) количество химических обработок и тем самым избежать негативных последствий применения пестицидов на предприятиях, поддерживая численность вредителей на хозяйственно неощутимом уровне.

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРОМОННЫХ ЛОВУШЕК

Половые феромоны - соединения, вызывающие направленное движение особей определенного пола к источнику запаха. У бабочек половые феромоны выделяет самка. Насекомые способны улавливать присутствие в воздухе ничтожно малых количеств феромонов.

В практических целях используют искусственный аналог природного феромона насекомого (обычно его в этом случае называют синтетическим половым аттрактантом). Наиболее широко половые

аттрактанты используются для обнаружения очагов вредных видов, для надзора за популяцией вредителей (мониторинг), позволяющего сигнализировать своевременные сроки проведения защитных мероприятий, и непосредственно для борьбы с вредными видами насекомых путем массового отлова в феромонные ловушки специальных конструкций или методом нарушения феромонной коммуникации между полами у вредных насекомых.

Для мониторинга и массового отлова вредителей используются специальные феромонные ловушки. Принцип их действия заключается в том, что самцы, прилетев на запах аттрактанта, находящегося в ловушке, фиксируются на поверхности, покрытой тонким слоем незасыхающего клея. В случае массового непрерывного отлова самцов бабочек происходит резкое снижение их количества. Это приводит к увеличению доли неоплодотворенных самок и, как следствие, к постепенному истреблению вредителя. Тем самым, феромонные ловушки позволяют снижать численность вредителя и поддерживать ее на хозяйственно неощутимом уровне без применения химических обработок или сократить их количество.

Метод дезориентации основан на размещении многочисленных испарителей с искусственным феромоном, нарушающим естественное поведение самцов насекомых и, в результате, предотвращающим нахождение ими самок. В настоящее время этот метод используется пока только в научных целях.

ФЕРОМОННЫЕ КОМПЛЕКТЫ ДЛЯ МОНИТОРИНГА И МАССОВОГО ОТЛОВА ОГНЕВОК

Феромонная приманка

В составе полового феромона самок мельничной огневки идентифицированы два соединения - Z9E12-14Ac и Z9E12-14OH в соотношении 5.6:1.2. В качестве феромонной приманки для отлова самцов мельничной огневки использовались либо синтетический аналог Z9E12-14Ac, либо смесь Z9E12-14Ac и Z9E12-14OH, 9:1. Основной компонент Z9E12-14Ac кроме мельничной огневки привлекает и другие виды огневок из вредителей запасов.

Синтетический аттрактант наносится на специальную препаративную форму (различные типы резины (чаще красная), полиэтиленовые ампулы и запаивные с двух сторон стержни из различных полимерных материалов), позволяющую обеспечить сохранение их привлекательности в течение 1.5-2.0 месяцев. До использования феромонные капсулы хранят в холодильнике в пакетах из фольги или в стеклянных сосудах с притертой пробкой. Феромонные капсулы при использовании берут чистыми руками, так как насекомые чувствительны к некоторым посторонним запахам.

Аттрактант для отлова мельничной, шоколадной и южной огневок (Z-9-E-12-тетрадекадиен-1-ил ацетат, 1 мг, отеч.) под названием

"кюнемон" включен в "Список" препаратов, разрешенных для применения на предприятиях в системе хлебопродуктов.

Ловушки

Для отлова огневок разработаны и используются ловушки трех типов: закрытые ловушки с клеевой поверхностью, ловушки в виде лент и ловушки-живоловки.

Эти типы ловушек могут быть использованы как для обнаружения и мониторинга популяции вредителя, так и для контроля его численности посредством массового отлова самцов.

Комплект закрытой клеевой ловушки состоит из корпуса, испарителя феромона и клеевых вкладьшей.

Ловушка-лента представляет собой полосу из ламинированной полиэтиленом бумаги с односторонним клеево-феромонным покрытием. Ловушки этого типа выбрасываются после заполнения фиксирующей поверхности отловленными бабочками.

Ловушки-живоловки состоят из корпуса, испарителя феромона и контейнера для отлова насекомых. Этот тип ловушек более эффективен в сильно запыленных мукой помещениях.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРОМОННЫХ ЛОВУШЕК ДЛЯ МОНИТОРИНГА И МАССОВОГО ОТЛОВА

Мониторинг

Очень часто установление факта присутствия вредителей запасов в складских и производственных помещениях возможно только по имагинальной стадии. Обнаружение личинок может быть затруднено вследствие малой численности вредителя, сложности производственного оборудования и непрерывности производственного процесса, а также из-за хранения сырья и продуктов его переработки в разного рода упаковках. Кроме того, непрерывный оборот сырья и продукции всегда таит в себе угрозу завоза вредителя.

Мониторинг бабочек с помощью феромонных ловушек позволяет своевременно обнаруживать нарастание их численности и относительно точно локализовать очаги заселения.

Для обнаружения мельничной огневки необходимо размещать 1 ловушку на 700-1000 м³ (в неотопливаемых помещениях при достижении температуры 10°С и выше).

Результаты мониторинга используются при планировании возможных защитных мероприятий. Отлов более 3 бабочек на ловушку в сутки указывает на необходимость начала их массового отлова.

В случае дальнейшего увеличения количества отлавливаемых бабочек (более 15 экз/ловушка/сутки) должна проводиться химическая обработка с предварительной зачисткой доступных механизмов и оборудования.

При обнаружении отдельного очага заселения вредителя проводится визуальное уточнение его размеров и локальная химическая обработка.

Массовый отлов

Размещение ловушек. В помещениях предприятий ловушки размещаются из расчета одна ловушка на 125-200 м³, независимо от их типа, на высоте не менее 1.5 м над уровнем пола. Ловушки следует развешивать на расстоянии не менее 1 м от работающих механизмов (вибрация оборудования снижает эффективность отлова). Следует также избегать размещения ловушек в местах, где возможны большие выбросы муки, снижающей качество клеевых поверхностей вкладышей. Ловушки следует размещать равномерно по всему помещению с учетом возможных мест развития и локализации вредителя.

Обслуживание ловушек. Учеты отловленных бабочек в ловушках рекомендуется проводить через каждые 7-10 дней. При использовании клеевых ловушек вкладыши заменяются по мере заполнения бабочками 2/3 клеевой поверхности.

Диспенсеры с феромоном в ловушках заменяют через каждые 1.5-2.0 месяца. Корпусы ловушек меняют по мере их износа.

Влияние различных факторов на эффективность массового отлова. К основным факторам, влияющим на эффективность массового отлова, относятся: состояние популяции вредителя, особенности помещений предприятий, технология применения ловушек и организация профилактических мероприятий.

Эффективность массового отлова зависит от плотности популяции вредителя. Если численность вредителя в помещениях предприятия велика (при стабильно высоких отловах в ловушки на стенах и оборудовании находится большое количество сидящих бабочек), то может быть рекомендовано предварительное проведение химической обработки.

Помещения предприятий можно классифицировать на отапливаемые и неотапливаемые, по объему, типу производственного оборудования, степени запыленности. Влияние этой группы факторов в большей степени косвенное. В помещениях с высокой степенью запыленности оседание муки на клеевую поверхность ловушек приводит к резкому снижению их эффективности. Наличие крупногабаритного и сложного оборудования уменьшает радиус действия ловушек, препятствуя распространению феромона.

Несоблюдение рекомендованной плотности размещения ловушек, а также неудачная схема их размещения отрицательно сказываются на эффективности массового отлова. То же самое можно сказать о несоблюдении периодичности замены диспенсеров и клеевых вкладышей.

В любом случае, неперемным условием эффективного исполь-

зования феромонных ловушек для массового отлова огневков является регулярное проведение общепрофилактических мероприятий. Удаление просыпей муки в помещениях и периодическая зачистка доступных механизмов и оборудования позволяют уменьшить скрытые очаги развития вредителя. По возможности более частое открывание люков позволяет отлавливать бабочек, скапливающихся внутри механизмов.

Сравнение массового отлова с химическим методом защиты (фумигация). Фумигация помещений до последнего времени оставалась основным способом борьбы с огневками на предприятиях в системе хлебопродуктов. Массовый отлов бабочек в сочетании с профилактическими мероприятиями рассматривается в качестве альтернативного мероприятия. В связи с этим ниже перечислены основные преимущества (+) и недостатки (-) обоих методов.

Массовый отлов ловушками	Фумигация
(+) Не требуется остановки производственного процесса	(-) Необходима остановка производственного процесса
(+) Используются нетоксичные соединения	(-) Используются высокотоксичные соединения
(-) Высокая степень селективности	(+) Широкий спектр действия
(-) Не дает быстрого эффекта	(+) Дает быстрый эффект
(-) Продолжительное мероприятие, требующее периодической замены расходуемых материалов	(+) Единовременное мероприятие
(+) Не требуется специальной подготовки помещений	(-) Требуется специальная подготовка помещений
(+) Не требуется специального инструктирования персонала и его удаления на время проведения защитного мероприятия	(-) Обязательно специальное инструктирование персонала и его удаление на время проведения защитного мероприятия

Как видим, массовый отлов имеет ряд важных преимуществ по сравнению с фумигацией. При его проведении не требуется специальной остановки производства; используются нетоксические соединения. В то же время, этот метод эффективен при низких плотностях популяции вредителей. При интенсивном заселении можно рекомендовать проведение локальных обработок инсектицидами с последующим применением метода массового отлова ловушками.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФЕРОМОННЫХ ЛОВУШЕК

При попадании энтомологического клея на поверхность кожи его удаляют тампоном, смоченным подсолнечным маслом. Можно также протереть руки небольшим количеством муки и затем все это смыть водой. Необходимо избегать попадания энтомологического клея на одежду, так как оставляемые им пятна практически не смываются. При проведении учетов необходимо соблюдать осторожность и соответствующие меры безопасности около работающих механизмов. После окончания работ руки моют с мылом.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ФЕРОМОННЫХ ЛОВУШЕК ДЛЯ СЕРОЙ ЗЕРНОВОЙ СОВКИ НА ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЕ

И.Я.Гричанов*, В.К.Ажбенов**

**Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург*

***Казахский НИИ защиты растений, Алма-Ата*

Серая зерновая совка - наиболее опасный вредитель яровой пшеницы в степной зоне Северного Казахстана, а также в некоторых районах Башкирии, Оренбургской, Челябинской, Омской, Новосибирской областей и Алтайского края. Основным средством борьбы с ней являются авиационные обработки полей против гусениц. Среди современных направлений защиты растений от вредителей важное значение придается феромонам, использование которых обеспечивает рациональную организацию защиты сельскохозяйственных культур. Применение половых феромонов уменьшает отрицательное влияние пестицидов на окружающую среду, в частности, на энтомофагов, на фоне ограниченных химических обработок получают развитие агротехнические и биологические методы борьбы с вредителями.

В практике защиты зерновых культур для учета бабочек и прогноза развития серой зерновой совки используют ловушки с бродящим раствором рафинадной патоки или сахара (Шек и др., 1984; Ажбенов, 1988). Между тем, установлен основной компонент полового аттрактанта для бабочек этого вредителя, проявивший хорошую биологическую активность в сравнении с пищевыми приманками (Гричанов и др., 1988; Гричанов, Вахер, 1988, 1989). Обнаружено, что в эколого-географических условиях Западной Сибири и Северного Казахстана половой аттрактант более видоспецифичен (отлавливает 95-100% целевого вида) и стабилен (действует свыше 15 дней), чем пищевой, а феромонная ловушка более удобна в обслуживании, чем паточное корытце. Определена зависимость между отловом самцов на половой аттрактант и численностью гусениц серой зерновой совки на пшенице (Гричанов и др., 1989).

Настоящие рекомендации составлены на основании исследований, проведенных ВИЗР при участии КазНИИЗР в 1987-1990 гг. в Целиноградской, Кустанайской, Карагандинской, Актюбинской, Павлодарской областях Казахстана, в Башкирии, Оренбургской, Новосибирской областях и Алтайском крае России.

Половые аттрактанты

В настоящее время известны половые аттрактанты ряда жуков-щелкунов, серой зерновой, озимой, восклищательной совок и некоторых других вредителей пшеницы. В условиях Западной Сибири и

Северного Казахстана наиболее перспективно применение полового аттрактанта серой зерновой совки.

Основным компонентом препаративной формы ХС-2 (производственное объединение "Флора", г. Тарту, Эстония) является альдегид цис-11-гексацетеналь с одной двойной связью, нанесенный на отрезки резиновой трубки длиной 1.5 см с дозой 2 мг на капсулу. В настоящее время это действующее вещество производят также в г.Щелково (Московская область), Уфе (Башкирия) и Алма-Ате (Казахстан). Аттрактивность феромона сохраняется 15-30 дней на уровне не менее половины активности свежего аттрактанта.

Феромонные капсулы используют в течение года после их изготовления. До использования их следует хранить в холодильнике в закрытой упаковке.

Феромонная ловушка

Испытывалась и показала удовлетворительные результаты трехгранная ловушка Атракон АА производства ПО "Флора" с площадью ловчей поверхности 400 см², изготовленная из ламинированной бумаги "Тетрапак" размером 29×48 см. Средняя треть этого листа размером 14×28 см служит днищем ловушки. Лист бумаги складывается в виде трехгранной призмы, края полученной ловушки шириной 1-1.5 см загибаются внутрь.

Комплект феромонной ловушки содержит одну картонную заготовку ловушки Атракон АА, три резиновые капсулы с синтетическим аттрактантом ХС-2 и пятнадцать клеевых вкладышей с клеем "Пестификс". При сборке на дно ловушки помещается клеевой вкладыш из ламинированной бумаги, в центре ловушки на проволоке подвешивается капсула с феромоном. Готовые ловушки прикрепляют к заранее вбитым в землю (под углом 60 градусов) кольцикам длиной 1.5-2 м, примерно на 20-30 см выше верхушек растений. С ростом растений ловушки периодически поднимают на соответствующую высоту. Горизонтальная ось ловушки должна совпадать с направлением господствующего в ночные часы ветра.

Размещение ловушек на полях. После получения карт размещения сельскохозяйственных культур контролируемую площадь посевов яровой пшеницы (в одном или нескольких хозяйствах) разбивают на группы полей с близкими агротехническими условиями (например, одного и того же сорта, срока сева, предшественника). В каждой группе выделяют типичное поле со средними агротехническими характеристиками (в том числе по численности вредителей в предыдущем сезоне или в осенне-весенний период). На каждом таком поле перед началом лета бабочек серой зерновой совки (около 15 июня) устанавливают по 5 феромонных ловушек с расстоянием между ними 150-200 м. При невозможности установки ловушек по середине поля их размещают в ряд вдоль границы участка, учитывая

преобладающий ночной ветер. Например, если основное направление ночного ветра северное, то ловушки устанавливаются вдоль северного края поля так, чтобы феромонные облака покрывали учетное поле к югу от ловушек. Допускается помещать ловушки на межах полей (кроме заросших деревьями и густым кустарником), на телеграфных столбах и т.п.

Обслуживание ловушек

Обслуживание ловушек проводит специально обученный обследователь под руководством агронома по защите растений. За каждым обследователем закрепляются контрольные поля в количестве, которое зависит от марки приданного ему транспортного средства, длины маршрутного обследования и поставленных перед ним задач. За день один обследователь может проверить 50-75 ловушек при длине автомобильного маршрута обследования 100-150 км.

Отловленных бабочек учитывают через каждые три дня, а в период массового лета бабочек (более 10-15 самцов за ночь) - ежедневно. Бабочки серой зерновой совки удаляются из ловушек при каждом учете, для чего ловушка с торцевой стороны открывается путем выдвигания наружу нижних углов треугольного отверстия. Следует избегать излома его сторон и нарушения тем самым размера отверстия ловушки. Окончание массового лета бабочек регистрируют при устойчивом значительном (в 5-10 раз от максимального) снижении суточного отлова бабочек. После этого трехдневные учеты продолжают вести до конца июля.

Для удобства работы ловушки необходимо пронумеровать и записать на карточке адрес ловушки. Запись результатов вылова бабочек в ловушки удобно делать на карточке из плотного картона или в специальных журналах учета по форме:

Хозяйство _____, бригада _____, поле _____,
площадь _____ га

Дата учета	Количество отловленных самцов, номера ловушек					Среднее кол-во самцов, экз/лов.		Примечание
	1	2	3	4	5	за 1 учет	нарастающий итог	

В примечаниях отмечают период выколашивания пшеницы, среднюю температуру воздуха и осадки в этот период (по данным ближайшей метеостанции), номера испорченных ловушек и другие сведения при необходимости. Замену капсулы с аттрактантом проводят через каждые 10-15 дней. При сильном загрязнении клеевой поверхности следует заменять вкладыш. Нужно учитывать, что при попадании в ловушку более 10 бабочек совок клеевая поверхность ловушки сильно загрязняется и уловистость ее резко снижается. Поэтому в период массового лета бабочек вредителя клеевые вкладыши необходимо заменять ежедневно. При низкой численности

зерновой совки замену вкладыша производят по мере загрязнения или высыхания, а также после сильного дождя, но не реже, чем через 10 дней. Поскольку сам корпус ловушки, независимо от продолжительности ее действия, не снижает уловистости, замена его не производится. Нужно следить за тем, чтобы дно ловушки располагалось горизонтально во избежание стекания клея.

Практическое применение

Наблюдение за динамикой лета серой зерновой совки проводят с целью картирования полей и определения очагов заселения, прогноза численности, сигнализации сроков и определения необходимости проведения летних обследований пшеницы и борьбы с гусеницами. Чтобы получить хорошую картину динамики лета, лучше всего представлять данные учета в виде графических схем в координатах: дата учета - количество отловленных самцов (в пересчете на одну ловушку за ночь). На графике отмечают начало и окончание лета, период максимального лета, пики лета бабочек. Наиболее важные количественные показатели - максимальный суточный отлов бабочек и суммарный отлов самцов на одну ловушку за период массового лета. Полученные на типичном поле данные экстраполируют на всю группу полей с одинаковыми агротехническими характеристиками и используют для прогностических целей.

Картирование полей и определение очагов заселения. По окончании массового лета бабочек серой зерновой совки данные учетов анализируют с целью выявления участков с повышенной (очаговой), средней и низкой плотностью популяции. По величине отлова самцов феромонными ловушками поля картируют, разделяя их на три основные группы:

первая - участки с низкой плотностью популяции - при отлове до 150 бабочек серой зерновой совки в ловушку за период массового лета или до 15 - за ночь,

вторая - со средней плотностью - при увеличении средних уловов соответственно до 200-400 или до 20-40 самцов в ловушку,

третья - с высокой плотностью - при отлове соответственно свыше 400 или свыше 40 самцов в ловушку.

Выявленные очаги повышенной численности (высокая плотность бабочек на рядовых посевах и средняя плотность - на семенных посевах яровой пшеницы) нуждаются в особенно пристальном внимании во время обследования посевов для выявления гусениц вредителя. В хозяйства и бригады с установленными очагами заселения необходимо в первую очередь выделять средства защиты растений.

Сигнализация сроков проведения обследований и обработок посевов

Летнее обследование посевов необходимо провести в период

массового появления в колосьях пшеницы гусениц 2 возраста. При этом используют таблицу Г.Х.Шека и др. (1984).

Таблица 1. Определение времени обследования посевов на появление молодых гусениц зерновой совки

Температура воздуха в период массового лета бабочек и выколачивания пшеницы, °С	Число дней от массового лета бабочек и выколачивания пшеницы до начала обследования
16 - 17	22
19 - 20	15
23 - 24	11

Важно установление конкретной даты, от которой отсчитываются сроки начала обследования посевов, так как в некоторые годы период массового лета бабочек растягивается на три недели и более. Поэтому для апробации предлагается следующая методика. При ярко выраженном одном пике лета бабочек, вдвое-втрое превышающем средний уровень отлова в период массового лета самцов, сроки начала обследования отсчитываются от даты максимального суточного отлова бабочек. При наличии двух и более пиков лета имаго примерно одинаковой интенсивности за точку отсчета принимается дата максимума по каждому пику и могут быть рекомендованы обследования в несколько туров.

Начало обработок посевов (при их необходимости) назначается через 4 дня после проведения обследований с учетом требуемого времени для сбора, сушки и анализа колосьев. Более точно сроки начала обработок в конкретном районе Северного Казахстана рассчитывают по фенотипическому календарю (Ажбенов, 1988), считая, что от начала массового лета бабочек до массовой откладки яиц проходит 5-7 дней.

Прогноз численности и определение необходимости борьбы с гусеницами

Вредоносность гусениц серой зерновой совки зависит от степени совпадения массового лета бабочек и выколачивания пшеницы, плодовитости самок, продолжительности периода от отрождения гусениц до созревания пшеницы, от выживаемости гусениц в этот период. В годы с засушливой жаркой погодой экономические пороги вредоносности примерно вдвое превышают пороги во влажные и относительно прохладные годы (Шек и др., 1984; Ажбенов, 1988).

Определение целесообразности проведения обследований и обработок против гусениц основывается на мысли, что количество самцов, отловленных ловушками, позволяет в какой-то мере судить о будущей численности гусениц на полях. С помощью феромонных ловушек можно только приблизительно прогнозировать необходи-

мость борьбы с гусеницами серой зерновой совки. Более или менее установленными можно считать следующие критерии (табл. 2).

Таблица 2. Критерии отлова бабочек для сигнализации сроков (или отмены) обследований яровой пшеницы и борьбы против серой зерновой совки

Погодные условия и вид посевов яровой пшеницы	Пороговый отлов самцов в ловушку		Сроки обследований и обработок после массового лета, дней
	Максимальный суточный	За весь период массового лета	
Сухая и жаркая погода:			
-семенные посевы	15	150	
-рядовые посевы	40	400	11-15
Влажная и прохладная погода:			
-семенные посевы	7	75	
-рядовые посевы	20	200	15-22

При меньшем отлове бабочек можно отказаться от проведения летних обследований и защитных мероприятий против гусениц зерновой совки. С превышением указанных критериев проводят сплошное обследование полей, чтобы определить численность гусениц выше экономического порога вредоносности и выделить поля, подлежащие химической обработке. Пока не установлена плотность бабочек, при которой можно назначать проведение химических обработок без предварительного обследования посевов.

Отлов самцов на контрольных полях со средними условиями экстраполируют на всю группу полей в хозяйстве с одинаковыми характеристиками.

Расчет экономической эффективности применения ловушек с синтетическим половым аттрактантом

Расчет экономической эффективности применения феромонных ловушек для надзора за вредителями производится на основе частичной замены и повышения качества стандартных методов учета численности, сокращения кратности обработок, повышения урожайности и качества зерна. При расчете сопоставляются варианты с применением и без применения феромонных ловушек. Необходимо строго следить, чтобы опытные и контрольные поля (бригады, хозяйства) обладали одинаковыми агротехническими характеристиками как в год испытания, так и в предыдущие годы. Затраты на защиту растений складываются из:

- затрат на приобретение инсектицидов, биопрепаратов и т.д.,
- стоимости внесения препарата,
- затрат на обследование полей стандартными методами и с применением ловушек,
- транспортных расходов,

- затрат на уборку, послеуборочную обработку, хранение, перевозку и реализацию дополнительного урожая,
- накладных расходов (общепроизводственные и общехозяйственные расходы).

Поскольку изменения урожайности и общих затрат на выращивание урожая зачастую недостоверны, экономический эффект от применения половых аттрактантов обычно рассчитывается из экономии средств или труда в затратах на защиту растений. При этом экономия средств на защите растений представляет собой чистый доход хозяйства.

Техника безопасности при работе с феромонными ловушками

Синтетические феромоны - практически негтоксичные вещества, которые привлекают только один или несколько видов насекомых и не опасны для других животных и человека. При работе с феромонными материалами нужно соблюдать общие меры предосторожности: заправку ловушек феромонными материалами следует проводить в проветриваемом помещении или непосредственно в поле при развешивании. После работы нужно вымыть руки с мылом. При попадании клея на руки его удаляют с помощью тампона, смоченного растительным маслом.

Капсулы с аттрактантом следует хранить в плотно закрытых стеклянных банках или полиэтиленовых пакетах в прохладном месте (при температуре 3-5°C). Для хранения феромонных капсул можно использовать бытовые холодильники, находящиеся в нежилом помещении. Хранить аттрактанты вместе с продуктами запрещается. И использованные ловушки уничтожают вместе с феромонными капсулами, закапывая в землю в специально отведенном месте.

Литература

Ажбеков В.К. Сроки обследования и проведения защитных мероприятий в борьбе с серой зерновой совкой (рекомендации). Алма-Ата, 1988, 28 с.

Гричанов И.Я., Вахер П.Л. Полевой скрининг аттрактивных веществ для самцов серой зерновой совки. Феромоны насекомых и разработка путей их практического использования. /Сб. науч. тр., Л., ВИЗР, 1988, с. 40-44.

Гричанов И.Я., Вахер П.Л. Аттрактивность некоторых синтетических соединений для самцов серой зерновой совки. /Изв. АН ЭССР. Биол., 38, 3, 1989, с.185-188.

Гричанов И.Я., Кирюков Е.И., Карпенко В.И. Зависимость между отловом самцов на половой аттрактант и численностью гусениц серой зерновой совки на пшенице. /Бюлл. ВИЗР, 74, 1989, с.25-29.

Гричанов И.Я., Рагитин А.А., Ковалев Б.Г., Конюхов В.П., Болтыхова В.В. Исследование полового феромона серой зерновой совки *Arctea anceps*. /Бюлл. ВИЗР, 76, 1994, с.77-80.

Гричанов И.Я., Цанкина Л.Б., Грязнова А.С. Аттрактант для самцов серой зерновой совки. /Защита растений, 6, 1988, с.48.

Шек Г.К., Ажбеков В.К., Ездюклов Н.Я. и др. Рекомендации по учету, прогнозу и мерам борьбы с серой зерновой совкой. М., 1984, 32 с.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ
ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ ПШЕНИЦЫ
Puccinia recondita Rob.ex Desm.f.sp.*tritici*

Л.А.Михайлова, Е.И.Гультяева, Н.В.Мироненко

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Бурая ржавчина пшеницы, вызываемая грибом *Puccinia recondita* Rob.ex Desm f.sp.*tritici* наносит существенный урон производству зерна в России, особенно в районах Поволжья, Северного Кавказа, ЦЧЗ, где она развивается практически ежегодно, нередко достигая эпифитотийного уровня. В Поволжье и в прилегающих районах в годы эпифитотий ржавчины потери зерна достигают 20-30% и более; при умеренном поражении растений, которое наблюдается почти ежегодно, урожай снижается на 5-10% (Лебедев и др.,1994). Л.В.Мешкова (1979) сообщила, что потери урожая от бурой ржавчины в Западной Сибири и Зауралье составляют в годы эпифитотий 30% и более. В среднем по СНГ по данным А.Е.Чумакова ежегодные потери урожая от бурой ржавчины составляют 4-6% (Чумаков,1964), в условиях эпифитотий 50-70% (Степанов,Чумаков, 1956).

Условием успеха селекции на устойчивость, а также решения задачи длительного сохранения устойчивости, является знание закономерностей изменчивости популяций патогена, в особенности связанной с естественным отбором по вирулентности, а также таких параметров популяций, как их ареалы, степень взаимовлияния на состав в результате миграции спор. Перечисленные проблемы могут быть решены посредством изучения состава популяций в различных географических точках, на различных растениях-хозяевах или в различные временные промежутки. Для идентификации особей популяции могут быть использованы вирулентность к растениям-тестерам, морфология спор, молекулярные маркеры.

На территории СНГ *P.recondita* f.sp.*tritici* размножается в основном бесполо, хотя в некоторых районах (Украина, Кавказ и др.) виды *Thalictrum* имеют широкое распространение и, таким образом, половой процесс может играть некоторую роль в возобновлении и изменчивости популяций. В связи с преимущественным бесполом размножением популяция возбудителя бурой ржавчины пшеницы состоит из клонов, то есть потомства одной вегетативно размножившейся клетки (урединиоспоры). Все споры, произведенные от исходной споры, равноценны по генотипу, так как ее потомки содержат два гаплоидных ядра, идентичных ядрам исходного дикариона.

Популяционные исследования *P.recondita* f.sp.*tritici* имеют следующие практические аспекты:

- определение частоты встречаемости вирулентных клонов к пред-

полагаемому донору устойчивости к болезни (оценка эффективности генов устойчивости),

- изучение механизмов изменчивости популяций патогена, в том числе вследствие внедрения в производство новых сортов пшеницы,
- изучение ареалов и путей миграции спор с целью координации селекции на устойчивость в различных географических районах.

ПРИЗНАКИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МАРКИРОВАНИЯ КЛОНОВ *Puccinia recondita* f.sp.*tritici*

Для определения состава популяций и решения других задач популяционных исследований необходимо, чтобы особи популяции (клоны) были маркированы различными признаками - фенами. Основными требованиями к маркирующим признакам являются их стабильность в проявлении, наследуемость и легкая регистрируемость.

Вирулентность к сортам и линиям пшеницы с известными генами устойчивости

а) Сорта и линии, используемые

для дифференциации клонов гриба по вирулентности

Для ржавчинных грибов - облигатных паразитов - наиболее доступным фенотипическим признаком является вирулентность к специально подобранным сортам-дифференциаторам (тестерам вирулентности). Для дифференциации отбирают сорта, которые различают по вирулентности клоны гриба независимого происхождения, представляющие одну и ту же или разные популяции.

Для маркирования вирулентностью клонов *P.recondita* f.sp.*tritici* используются сорта-дифференциаторы, предложенные Мэйнсом и Джэксоном в 1926 г., моногенные линии сорта Thatcher и линии сортов Wichita и Red Bobs, в основном созданные в Канаде. Линии получены посредством беккроссов, они близки друг другу по генотипу, но отличаются наличием одного из генов устойчивости.

Стандартный набор Мэйнса и Джэксона включает следующие сорта: Malakoff (Lr1), Carina (Lr2b,LrB) Brevit (Lr2b=Lr2³, LrB), Webster (Lr2a), Loros (Lr2³), Mediterranean (Lr3a), Hussar (Lr11), Democrat (Lr3a).

Список моногенных линий для тестирования вирулентности клонов *Puccinia recondita* f.sp.*tritici* (McIntosh et al.,1995)

Lr1. 5DL.Centenario/6*Thatcher, R.L.6003;Malakoff/6* Prelude, R.L.6028; Wichita* 4/Malakoff.

Lr2a.2DS. Webster/6*Thatcher, R.L.6016;Prelude*6/Webster, R.L. 6018; Wichita*4/Webster.

Lr2b. 2DS. Thatcher*6/Carina, R.L.6019; Prelude*6/Carina, R.L.6021; Red Bobs*6/Carina, R.L.6020.

Lr2c. 2DS. Thatcher*4/Brevit, R.L.6022; Prelude*5/Brevit, R.L.6024; Red Bobs*6/Brevit, R.L.6023. Thatcher*6/Loros, R.L.6025; Prelude*6/Loros, R.L.6027; Red Bobs*6/Loros, R.L.6026. Wichita*4/Loros.

Lr3a. 6B. Democrat/6*Thatcher, R.L.6002; Wichita*4/Mediterranean; Sinvalocho/6*Prelude, R.L. 6029.

Lr3bg. 6B. Bage/8*Thatcher R.L.6042.

Lr3ka. 6B. Klein Anniversario/6*Thatcher, R.L.6007; Klein Anniversario/6*Prelude, R.L.6030.

Lr9. 6BL. Thatcher*6/Transfer, R.L.6010; Wichita*4/Transfer. Lr9 перенесен от *Aegilops umbellulata* в генотип Chinese Spring (Transfer).

Lr10. 1A. Exchange/6*Thatcher, R.L.6004;

Gabo6*/Thatcher, R.L.6143; Lee/6*Prelude, R.L.6031; Selkirk/6*Thatcher, R.L.6145; Timstein/6*Thatcher, R.L.6146; Cs*5/Timstein 1A; CS*6/Kenya Farmer 1A.

Lr11. 2A. Thatcher*6/El Gaucho, R.L.6048, Thatcher*6/Hussar, R.L.6053; Wichita*6/Hussar, KS7110704.

Lr12. 4B. Ген устойчивости взрослых растений. Exchange/6*Thatcher, R.L.6011.

Lr13. 2BS. Ген устойчивости взрослых растений. Возможно проявление и в более ранних фазах роста растений. Thatcher*7/Frontana, R.L.4031; Red Bobs*6/Manitou, R.L.6067.

Lr14a. 7BL. Selkirk*6Thatcher, R.L.6013; Chinese Spring*6/Hope 7B Lr14b. 7BL. Maria Escobar*/6Thatcher, R.L.6006;

Thatcher*6/Rafaela, R.L.6056

Lr14ab. Рекомбинантная линия Selkirk/6*Thatcher//Maria Escobar/6*Thatcher, R.L.6039.

Lr15. 2DS. Thatcher*6/Kenya W1483, R.L.6052.

Lr16. 4B. Exchange/6*Thatcher, R.L.6005.

Lr17. 2AS. Klein Lucero/6*Prelude, R.L.6041; Klein Lucero*6/Thatcher, R.L.6008; Thatcher*6/EAP26127, R.L.6055, Thatcher*6/Rafaela, R.L.6054.

Lr18. 5BL. South Africa 43/7*Thatcher, Thatcher*6/Sabikei 12, R.L.6090.

Lr19. 7DL. Agatha C.I.14048.

Lr20. 7AL. Thatcher*6/Timmo, R.L.6092, Federation*3/Kenya W744, Chinese Spring*5/Axminster 7A.

Lr21. 1D. Ген устойчивости взрослых растений, возможно проявление в фазе проростков. Thatcher*6/R.L.5406 (Tetra Canthatch/*Triticum tauschii* var. *meyeri* R.L.5289), R.L.6043.

Lr22. 2DS. Ген устойчивости взрослых растений.

Lr22a. Thatcher*6/R.L.5404, R.L.6044, выделен из *T. tauschii* var. *strangulata* R.L.5271.

Lr22b. имеется в генотипах Canthatch, Marquis, Thatcher.

Lr23. 2BS. Lee FL310/6*Thatcher, R.L.6012, Chinese Spring*7/Kenya Farmer 2B, CS*6/Timstein 2B.

- Lr24. 3DL или 3BL Thatcher*6/Agent, R.L.6064.
 Lr25. 4BS. Thatcher*7/Transec, R.L.6084.
 Lr26. 1B(1BL1RS). Thatcher*6/ST 1.25, R.L.6078,
 Federation*4/Kavkaz.
 Lr27+Lr31 (LrT). 3BS. Комплементарные гены CS*6/Норе 3B,
 CS*7/Ciano 67 3B, CS*7/Ciano 67 5B.
 Lr28. 4AL. CS 2A/2M 4/2(C77.2); CS 2D/2M 3/8(C77.1)
 Thatcher*6/C77.1 R.L.
 Lr29 7DS. CS 7D/Ag \neq 11, Thatcher*6//CS7D/Ag \neq 11, R.L.6080.
 Lr30.(LrT)4AL. Thatcher*6/Terenzio, R.L.6049.
 Lr32. 3D. Thatcher*7//R.L.5497-1(T.tauschii)/Marquis-K, R.L.6080.
 Lr33. 1BL. Thatcher*6/P.L.58548, R.L.6057.
 Lr34. 7D. Ген устойчивости взрослых растений. Линия 897(Thatcher*6/Terenzio); Линия 920(Thatcher*6/Lageadinho); Thatcher*6/P.L.58548, R.L.6058.
 Lr35. 2B. Ген устойчивости взрослых растений.
 Lr36 6BS. Линия 2-9-2=Неерова*5/T.speltoides 2-9.
 Lr37. 2AS. Ген устойчивости взрослых растений, возможно проявление в фазе проростков. Thatcher*8/VPM1, R.L.6081.
 Lr38. Транслокация в хромосомах 1DL, 2AL, 3DS, 5AS, 6DL.
 Thatcher*6/T7, R.L.6097.
 Lr39. Имеется в линии KS86WGRC02.
 Lr40. Имеется в линии KS89WGRC07.
 Lr41. 1D. Имеется в генотипе линии KS90WGRC10=P.L.549278=TAM107*3/T.tauschii TA2460.
 Lr42 1D. Имеется в генотипе линии KS1WGRC11=Century(Lr24)*3/T.tauschii TA2450.
 Lr43. Хромосомная локализация неизвестна. Имеется в линии KS91WGRC16=Triumph 64/3/KS8010-71/TA2470//TAM200.
 Lr44 1B. Thatcher*6/T.spelta.
 LrB не локализован, Thatcher*6/Carina, R.L.6051.
 LrEch не локализован, Thatcher*6/Exchange, R.L.3718.

В основном гены устойчивости идентифицированы в генотипах мягкой пшеницы; вместе с тем многие гены перенесены в мягкую пшеницу из других ее видов и дикорастущих злаков.

Гены, выделенные из видов, родственных *T.aestivum*:

Lr9	<i>Triticum umbellulata</i> (Sears,1956)	Lr36	<i>T.speltoides</i>
Lr19	<i>Thinopyrum ponticum</i> (10x), <i>Th.distihum</i>	Lr37	<i>T.ventricosum</i>
Lr21	<i>T.tauschii</i> var. <i>meyeri</i> R.L.5289	Lr38	<i>Th.intermedium</i>
Lr22a	<i>T.tauschii</i> var. <i>strangulata</i> R.L.5271	Lr39	<i>T.tauschii</i>
Lr24	<i>Th.ponticum</i>	Lr40	<i>T.tauschii</i>
Lr25	<i>Secale cereale</i>	Lr41	<i>T.tauschii</i>
Lr26	<i>Secale cereale</i>	Lr42	<i>T.tauschii</i>
Lr28	<i>T.speltoides</i>	Lr43	<i>T.tauschii</i>
Lr29	<i>Th.ponticum</i>	Lr44	<i>T.spelta</i> 7831,
Lr32	<i>T.tauschii</i>		

б) *Вариабельность экспрессии генов устойчивости к бурой ржавчине под действием условий среды*

Для дифференциации клонов по вирулентности наиболее пригодны сорта и линии с генами устойчивости, экспрессия которых мало зависит от условий внешней среды. Основным фактором среды, влияющим на проявление признака вирулентности (устойчивости растения), является температура. Оптимальная температура для экспрессии разных генов различна, что ограничивает их использование в дифференциации клонов по вирулентности.

Степень вариабельности экспрессии Lr-генов в зависимости от температуры (по McIntosh et al., 1995):

Lr1 низкая,

Lr2a средняя, несколько более эффективен при высоких температурах,

Lr2b средняя,

Lr2c средняя,

Lr3a низкая,

Lr3bg низкая,

Lr3ka низкая,

Lr9 низкая,

Lr10 средняя,

Lr11 высокая, при низких температурах более эффективен,

Lr12 низкая,

Lr13 высокая,

Lr14a высокая, наиболее эффективен при температуре ниже 20°C,

Lr14b менее эффективен при повышенных температурах,

Lr15 низкая,

Lr16 низкая, при высоких температурах более эффективен,

Lr17 низкая, более эффективен при высокой температуре,

Lr18 высокая, при повышенных температурах эффективность снижается,

Lr19 низкая,

Lr20 самый низкий тип реакции при низких температурах, при температуре 30.5°C полностью не эффективен,

Lr21 низкая,

Lr22a низкая,

Lr22b низкая,

Lr23 высокая, более эффективен при температуре выше 20°C,

Lr24 средняя,

Lr25 низкая,

Lr26 высокая,

Lr27+Lr31(LrT) средняя,

Lr28 низкая,

Lr29 низкая,

Lr30 при низких температурах более эффективен,

Lr32 низкая,

Lr34 более эффективен при низких температурах,

Lr37 более эффективен при низких температурах.

Эффективность некоторых из перечисленных генов устойчивости по отношению к различным популяциям бурой ржавчины в России в 1995 г. представлена в таблице 1.

Таблица 1. Частота встречаемости вирулентных к линиям Thatcher клонов *P.recondita* (%)

Линии Thatcher с генами Lr	Северный Кавказ	Поволжье	Западная Сибирь	Европейская часть СНГ
1	10	30	80	5
2a	10	30	80	5
2c	100	100	100	100
3	100	100	100	100
3ka	100	100	100	100
3bg	100	100	100	100
9	0	0	0	0
10	100	100	100	100
14a	100	100	100	100
14b	100	100	100	100
15	80	50	80	50
16	100	100	100	100
17	100	100	100	100
18	100	70	90	70
19	0	0	0	0
21	100	100	100	100
22a	100	100	100	100
23	1	0	1	10
24	0	0	0	0
26	10	5	60	5
29	100	100	100	100
30	100	100	100	100
33	100	100	100	100
34	100	100	100	100

Как видно из таблицы, самыми эффективными для защиты пшеницы от листовой ржавчины во всех регионах России являются гены Lr9, Lr19, Lr24. При ежегодном анализе состава популяций нами не выявлено ни одного клона, вирулентного к пшеницам - носителям этих генов. Линии пшеницы с генами Lr9, Lr19 и Lr24 не различают клоны и популяции гриба по вирулентности и, таким образом, в настоящее время не являются дифференциаторами. Эффективность гена Lr23 и пригодность его для использования в селекции в последние годы снижается из-за возникновения в популяциях патогена вирулентных к нему клонов. Это вызвано внедрением в производство во многих регионах сортов отечественной селекции с геном Lr23. Особенно высока частота встречаемости клонов, вирулентных к Lr23, на Украине, где при создании новых сортов широко используются доноры устойчивости с геном Lr23. Однако линия с геном Lr23 мало пригодна для дифференциации ввиду высокой зависимости экспрессии этого гена от температуры. Частота встречаемости клонов, вирулентных к Lr1, Lr2a, Lr26, различается по регионам.

В Европейской части России, СНГ, на Кавказе она низкая в отличие от Западной Сибири и Урала. Линии с этими генами наиболее пригодны для дифференциации популяций патогена. Эффективность генов Lr15 и Lr18 также неодинакова в различных районах. Однако эти гены не стабильны, тип реакции при заражении линий с данными генами колеблется под воздействием окружающей среды, в связи с чем они ограниченно пригодны для анализа. Частота встречаемости клонов, вирулентных к прочим линиям, приведенным в таблице 1, высока и практически одинакова во всех регионах СНГ, то есть их также можно считать в настоящее время непригодными для дифференциации популяций. Однако, как показывает многолетний опыт исследований состава популяций, частота встречаемости вирулентности в природных популяциях может меняться независимо от использования соответствующего гена устойчивости в коммерческих сортах. Поэтому исключение каких-либо линий Thatcher из набора может быть чревато потерей информации об изменениях состава природных популяций.

В 1985 г. для определения фенотипов патогена в ВИЗР был предложен набор из 9 сортов-дифференциаторов, в который вошли линии сорта Thatcher с генами Lr1 и Lr2a, сорта Кавказ (Lr26), SNW №5, Majestic (Австралия), 47700 (Родезия), Гуан-фу-най (Китай), Jubiley (Болгария), а также Mag - полученная нами линия сорта Magnus (Франция), у которой имеется один из двух генов устойчивости этого сорта (Тырышкин, Михайлова, 1989). Бновь вводимые сорта имеют разные гены устойчивости, неидентичные генам набора линий Thatcher. Дифференцирующая способность предложенного набора дифференциаторов достаточно высока. Использование данного набора позволяет проводить анализ сходства и различия в распределении частот фенотипов в образцах, собранных в различных географических точках или в одной точке, но в разные годы.

В таблице 2 показана частота встречаемости вирулентных к сортам-дифференциаторам клонов в 1996 г.

Таблица 2. Частота встречаемости вирулентных к сортам-дифференциаторам клонов в различных регионах (1996)

Сорта- и линии-дифференциаторы	Северный Кавказ	Поволжье	Западная Сибирь	Европейская часть СНГ
Lr1	5	30	80	0
Lr2a	5	30	80	0
Кавказ	0	10	60	0
SNW №5	100	25	90	100
47700	0	0	0	0
Гуан-фу-най	100	25	90	100
Jubiley	100	100	100	100
Magnus	5	10	60	0
Majestic	99	100	0	100
Mag	5	10	0	0

В 1985-1986 гг. значимые различия между популяциями наблюдались по частоте встречаемости клонов, вирулентных к 47700 и Jubileу; различия по вирулентности к сорту Jubileу отмечены в 1989 и 1990 гг. (Михайлова, Тырышкин, 1989).

Изозимные и молекулярные маркеры

Преимущество использования в популяционных исследованиях молекулярных маркеров (белковых и нуклеиновых) в том, что они селективно нейтральны и более информативны, то есть полиморфны. На использование молекулярных (ДНК) маркеров в популяционных исследованиях фитопатогенов возлагаются большие надежды в плане: изучения эволюции популяций патогена; дальнейшей разработки концепции патотипа; более точной оценки генетической изменчивости в популяциях; установления относительного вклада сексуальной и асексуальной репродукции в структуру популяции; мониторинга специфичных генотипов в полевых экспериментах.

Эти и другие связанные с ними проблемы рассмотрены в ряде обзоров (Egger, McDonald, 1992; McDermott, McDonald, 1993; Brown, 1996).

Генетическая дифференциация изолятов ржавчины может быть изучена посредством определения энзимного полиморфизма. Электрофоретический анализ делает возможным исследование генетической изменчивости по ряду энзимных локусов и важен в изучении генетической структуры многих видов. В исследованиях австралийских фитопатологов Burdon и Marshall (1983), Park et al. (1995) продемонстрирована значимость метода изозимного анализа для понимания природы изменчивости популяций патогена. Аллельные вариации были найдены для EST2 (эстераза), GOT (глутамат-оксалацетаттрансаминаза), PGM2 (фосфоглюкозо-мутаза). Другие энзимы были мономорфны: β GLU (β -глюкозидаза), LAP (лейцин аминопептидаза), MDH (малат дегидрогеназа), PGI (глюкозофосфат изомераза), TPI (триозофосфат изомераза), либо недостаточно четки для точной оценки: ACO (аконитаза), GPUT (глюкозо-1-фосфатуридилл трансфераза), MDR (менадион редуктаза), PEP (пептидаза), UMB (метилумбеллиферил эстераза).

Из-за недостаточной изменчивости ферментов у многих грибов, что приводит к недооценке генетического разнообразия популяции, в последнее десятилетие широкое распространение получили методы выявления изменчивости в нуклеотидной последовательности ДНК: RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) и RAPD (randomly amplified polymorphic DNA). В России с успехом используют метод УП-ПЦР, аналогичный RAPD, для анализа популяций мицелиальных грибов.

RFLPs - метод основан на рестрикции ДНК, фракционировании фрагментов ДНК в геле и последующей гибридизации блота с ДНК-пробами. Методом RFLP можно обнаружить изменчивость как в ко-

дирующей, так и в некодирующей области ДНК. Маркеры RFLPs намного вариабельнее, чем изозимы и кодоминанты. Метод RFLP пригоден для анализа популяций ржавчинных грибов, но связан с проблемой выделения достаточно большого количества ДНК, необходимого для рестрикции (Michelmore, Hulbert, 1987).

RAPD (Williams et al, 1990) - метод основан на амплификации ДНК организма в ПЦР со случайными короткими (10 н.п.) олигонуклеотидами (праймерами) с последующим фракционированием амплифицированных фрагментов ДНК в гелях. Для RAPD-анализа достаточно очень малого количества ДНК (измеряемого в нг), не требующего дополнительной очистки. Фактически используют грубые клеточные лизаты. Например, 200 нг ДНК, получаемых из 20 мг уредиспор *Puccinia striiformis* f.sp.*tritici* (Chen et al, 1993), очень мало для проведения стандартной рестрикции, но достаточно для нескольких сотен амплификаций. Для проведения RAPD-анализа не требуется знания нуклеотидной последовательности тестируемой ДНК для конструирования праймеров, поскольку используют праймеры со случайной нуклеотидной последовательностью. Число таких праймеров практически бесконечно. RAPD-маркеры доминантны и не могут обнаружить гетерозиготы. Для гаплоидных грибов этот факт не создает проблемы. Для диплоидов и дикарионов, к каковым относятся ржавчинные грибы, этот недостаток RAPD-маркеров преодолевается увеличением анализируемой выборки патогена и использованием большего числа праймеров, то есть увеличением количества полиморфных ДНК маркеров. RAPD-метод позволяет оценить большое количество изолятов за сравнительно короткое время.

УП-ПЦР метод, разработанный одновременно с RAPD (Российский патент, 1989; Булат, Мироненко, 1996), в общих чертах сходный с RAPD, был впервые использован для анализа популяций мицелиального фитопатогенного гриба *Cochliobolus sativus* (Булат, Мироненко, 1993); он пригоден также для анализа популяций любых других грибов.

Три методически близкие работы с использованием этих методов посвящены изучению связи между вирулентностью и ДНК полиморфизмом, выявляемым в RAPD-анализе, у возбудителей желтой ржавчины пшеницы *P.striiformis* f.sp.*tritici* (Chen et al, 1993), ячменя - *P.striiformis* f.sp.*hordei* (Chen et al, 1995) и листовой ржавчины пшеницы - *P.recondita* f.sp.*tritici* (Kolmer, Liu, 1995).

115 моноуредиальных изолятов *P.striiformis* f.sp.*tritici* по типу вирулентности были разделены на 26 групп (рас), которые в свою очередь кластеризовались в 6 групп вирулентности. По ДНК-полиморфизму (из 107 амплифицированных в RAPD фрагментов ДНК 50 оказались полиморфными) эти изоляты сгруппировались в 5 RAPD-групп (RG). Коэффициент корреляции между вирулентностью и выявленным ДНК-полиморфизмом был низкий - 0.20. Отме-

чена большая вариабельность RAPD-маркеров как внутри, так и между расами гриба. Только раса CDL-21 четко отличалась от других рас по ДНК-маркерам, то есть все 5 изолятов этой расы вошли в один RG-кластер. Авторы сделали вывод, что молекулярная изменчивость *P.striiformis* f.sp.*tritici* в основном не связана с влиянием хозяина на вирулентность гриба.

Во второй работе этих же авторов RAPD-маркеры с признаками вирулентности использовали для изучения филогенетических отношений между *formae speciales P.striiformis* - f.sp.*hordei*, f.sp.*tritici* и f.sp.*poae*. 22 изолята *P.striiformis* f.sp.*hordei* по вирулентности были разделены на 5 групп. Однако внутри каждой группы изоляты различались по генотипу, определяемому RAPD-маркерами. Коэффициент корреляции в данном случае составил 0.32. Безусловно, полученные RAPD маркеры, как отмечают сами авторы, могут быть использованы в будущем для популяционных исследований этих патогенов.

Несколько иные результаты с использованием метода RAPD и оценки вирулентности были получены при анализе изменчивости 64 изолятов *P.recondita* f.sp.*tritici* (Kolmer, Liu, 1995). Коэффициент корреляции между вирулентностью и ДНК полиморфизмом грибов был довольно высок (0.58), что указывает на существование определенной связи между этими типами генетической изменчивости. По данным RAPD-анализа среди 64 изолятов выявлено 15 "молекулярных фенотипов", по вирулентности - 37 фенотипов (вирулентность оценивали по отношению к генам устойчивости Lr2a и Lr2c). Комбинированный анализ вирулентности и изменчивости ДНК позволил выделить (кластеризовать) 2 группы изолятов.

Иную ситуацию наблюдали для этого же гриба, когда изучали изменчивость популяций по вирулентности к генам устойчивости Lr3a, Lr3bg, Lr3ka и Lr30 совместно с RAPD-анализом (Park et al., 1996). По вирулентности к этим генам устойчивости почти все изоляты (68) были помещены в 2 группы. Однако внутри каждой группы был выявлен значительный ДНК-полиморфизм (по данным RAPD-анализа), что указывает на отсутствие тесного родства изолятов внутри каждой группы, которое можно было бы предположить, исходя лишь из анализа вирулентности. Только для одного патотипа, который широко распространен во Франции, была показана четкая корреляция между патогенностью и RAPD-маркерами. Предположительно этот патотип завезен из Марокко, где он поражает *T.durum*. С использованием комплекса трех типов маркеров: патогенности, изозимов и RFLP-маркеров изучали генетическую структуру популяции ржавчинных грибов *Melampsora lini* (Burdon, Roberts, 1995) и выявили изменчивость внутри рас RFLPs-маркеры также пригодны для популяционных исследований других ржавчинных грибов.

Изменчивость по длине межгенных спейсерных областей рДНК-повторностей, изучаемая методами рестрикции, ДНК амплификации (ПЦР) и ДНК-ДНК гибридизации, также обеспечивает дополнительные генетические маркеры в специальных исследованиях, например для идентификации расы QСС *P.graminis* f.sp.*tritici* (Fox et al.,1995). Однако, на наш взгляд, эти маркеры слишком сложны и дорогостоящи, чтобы могли быть использованы для популяционных исследований.

МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА ПОПУЛЯЦИЙ
PUCCINIA RECONDITA F.SP.*TRITICI* И ИЗУЧЕНИЯ
ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ

Сбор образцов популяции и хранение спор

Образцы популяций могут быть представлены спорами, собранными в пробирку с пораженных листьев в поле, либо спорами на засушенных пораженных листьях. Сборы лучше проводить в сухую погоду для предотвращения их прорастания.

Для полного выявления состава популяций образцы должны быть репрезентативны, их собирают с разных мест поля, разных растений. В США и ряде европейских стран рекомендованы сбор образцов спор по автомобильным трассам, вдоль которых через определенные промежутки (к примеру, через 10, 32 км) на делянках высеяны сорта-ловушки, или осаждение спор из воздуха в специальные устройства на автомобилях или самолетах. Для охвата возможно больших территорий допустим и метод почтовых сборов, как это делалось в Канаде и в нашей стране (ВИЗР). Сборы следует проводить с самых восприимчивых сортов, не обладающих генами устойчивости. Это предотвратит искажение состава популяций вследствие селективного отбора на растениях пшеницы, имеющих гены с частичной эффективностью.

Во избежание селективного отбора в лабораторных условиях образцы популяций не следует подвергать пересевам. В случае, если такая необходимость возникает, для возобновления популяции следует использовать наиболее чувствительный универсально восприимчивый сорт пшеницы. Образцы популяций надо хранить в эксикаторе с перекристаллизованным CaCl_2 или силикагелем при температуре 2° - 4°С.

Для более длительного хранения споры можно держать в жидком азоте в контейнерах из алюминиевой фольги или в запаянных ампулах, заполненных газообразным азотом.

Культивирование в лабораторных условиях

Комплекс методов лабораторного культивирования предложен

Л.А.Михайловой и К.В.Квитко (1970). Они основаны на использовании раствора бензимидазола (40-60 ppm), который поддерживает метаболизм в отрезках листьев пшеницы на уровне, при котором тип реакции отрезков соответствует типу реакции интактных растений. В сравнении с оранжерейными эти методики позволяют с относительно малыми затратами инфекционного и растительного материала и соблюдением требований, предъявляемых к микробиологическим исследованиям, размножать инфекционный материал, тестировать вирулентность большого числа клонов гриба, специфическую и неспецифическую устойчивость большого числа образцов пшеницы, оценивать расщепление по устойчивости в гибридных популяциях растений. Тип реакции растений лучше учитывать на 7-10 день после инокуляции; в растворе бензимидазола отрезки листьев проростков и молодые листья взрослых растений сохраняются до 10-14 дней. Этого срока достаточно для оценки как вирулентности патогена, так и устойчивости растения.

а. Выращивание проростков пшеницы

Проростки пшеницы выращивают в кювете на слое ваты, смоченной обильно водой, или на стекле, обернутом фильтровальной бумагой, концы которой опущены в воду в кювете. Семена распределяют равномерно по фильтровальной бумаге; кювету следует прикрыть стеклом для поддержания оптимальной влажности.

б. Возобновление образцов популяций

На дно чашки Петри на два предметных стекла укладывают отрезки листьев проростков универсально восприимчивого сорта длиной 2-3 см и прижимают концы ватой, смоченной раствором бензимидазола (рис.1А).

Инокуляцию лучше проводить путем распыления пульверизатором суспензии спор в 0,0001% растворе твина-80, либо прикладыванием собранных в поле листьев, покрытых пустулами ржавчины, к поверхности листьев проростков. Прикладывать следует только один раз во избежание повторного размножения тех же клонов гриба. После инокуляции чашки Петри помещают на сугки на рассеянный свет и затем - в светостановку с освещенностью 2500-3000 лк при температуре не выше 22-24°C. На 7-8 день после инокуляции споры собирают путем стряхивания в короткие пробирки.

в. Клонирование популяций

После проявления пустул, осторожно придерживая отрезки листьев пинцетом, вырезают сегменты с одной и достаточно далеко отстоящей от других пустулой. Каждым из сегментов посредством смызывания инокулируют одну из групп отрезков листьев в чашке, приготовленной как это показано на рисунке 1Б. Отрезки листьев в

чашках разложены группами по 3-5 штук, по 3 группы с каждой стороны чашки. Перед инокуляцией отрезки в чашках опрыскивают водой. Образовавшиеся на 7-8 день споры с каждой группы листьев стряхивают стерильным пинцетом в отдельную сухую и свободную от спор ржавчины пробирку. Для работы удобны короткие пробирки длиной 4-5 см (например, пробирки Флоринского).

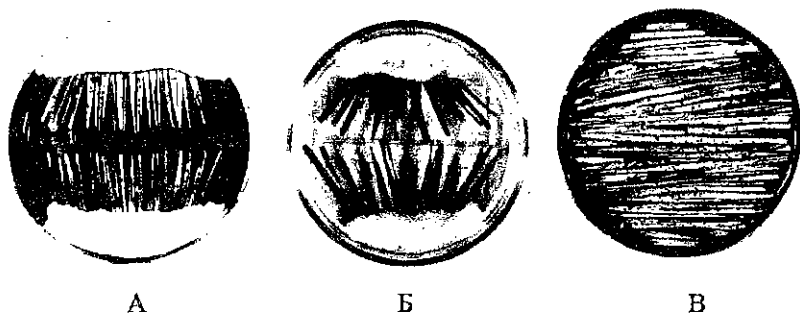


Рис.1. А. Возобновление образцов популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы. Б. Размножение клонов возбудителя бурой ржавчины пшеницы. В. Тестирование вирулентности клонов возбудителя бурой ржавчины пшеницы к сортам-дифференциаторам

г. Определение фенотипа клонов по признакам вирулентности (расовой принадлежности)

Отрезки листьев тестирующих вирулентность сортов или линий пшеницы 7-10-дневного возраста длиной около 5 см раскладывают на слой ваты, смоченный 0.004% раствором бензимидазола в кювете размером 32×25 см. Отрезки листьев можно раскладывать также на стекло, обернутое фильтровальной бумагой, смоченной раствором бензимидазола, концы фильтровальной бумаги опущены в раствор бензимидазола, налитый на дно кюветы (рис.1В). Стекло несколько большего размера, чем дно кюветы, краями опирается на борта кюветы. Листья разных сортов укладывают в непосредственной близости друг к другу блоками по 3 сорта. В одну кювету можно поместить 5 наборов из 10 сортов пшеницы. Концы отрезков укрывают ватными валиками, смоченными раствором бензимидазола. Инокуляцию проводят спорами одного клона, для увеличения объема смешанными с тальком, ликоподием или активированным углем. Споры на листья наносят микробиологической иглой, располагая ее под углом примерно 30° и стараясь не поранить ткань листа. Микробиологическую иглу можно изготовить из стеклянной палочки, в конец которой, расплавленный в пламени горелки, вставляется кусок про-

волоки длиной 3-4 см, к примеру, от спирали электроплитки. При нанесении спор очередного клона гриба иглу стерилизуют в пламени горелки. Перед инокуляцией листья опрыскивают водой из пульверизатора. После инокуляции кювету закрывают полиэтиленовой пленкой, которую закрепляют резинками. В течение 10-15 часов кювету выдерживают на рассеянном свете, способствующем лучшему прорастанию спор, и затем ставят под лампы дневного света в светостановку.

Определение типа инфекции клона *P.recondita* f.sp.*tritici*

Тип инфекции клона на образцах пшеницы учитывают на 7-10 день после инокуляции по шкале Stakman et al. (1962) (табл.3).

Таблица 3. Основные классы типов инфекции бурой ржавчины пшеницы

Тип инфекции	Реакция растения	Симптомы
0	Иммунность	Отсутствие видимых симптомов
;	Высокая устойчивость	Гиперчувствительные пятна
1	Устойчивость	Мелкие пустулы с некрозом
2	Средняя устойчивость	Мелкие, средние пустулы, окруженные некрозом или хлорозом
3	Средняя чувствительность	Среднего размера пустулы без хлороза
4	Чувствительность	Крупные пустулы без хлороза
X(1,2+)	Устойчивость	Пустулы разного типа
Y	Чувствительность	Пустулы разного размера, с увеличением размера к верхушке листа
Z	Чувствительность	Пустулы разного размера, с увеличением размера к основанию листа

Промежуточные типы реакции могут быть обозначены с помощью значков - и +. Буквами С или N можно обозначать большую, чем обычно, степень развития хлорозов или некрозов.

Как правило, тип инфекции, проявляющийся на интактных растениях, совпадает с типом реакции на отделенных листьях, сохраняемых в растворе бензимидазола. Однако необходимо отметить, что в последнем случае могут возникнуть некоторые затруднения с классификацией типов 2, 2⁻ и 2⁺, поскольку на отрезках в бензимидазоле он несколько выше, чем у интактных растений. Вместе с тем, тип инфекции 0, 1, 3 и 4 обычно совпадает с типом инфекции, проявляющимся на интактных растениях.

Пользование лабораторными методиками, основанными на бензимидазольной технике, дает возможность тестирования вирулентности большого количества клонов гриба или устойчивости большого количества растений пшеницы, что необходимо при проведении анализа структуры популяций патогена и гибридологического анализа устойчивости растений.

Обозначение фенотипов

Фенотипы гриба (расы) *P.recondita* f.sp.*tritici*, идентифицируемые на стандартном наборе из 8 сортов-дифференциаторов Мэйнса и Джексона, обозначали порядковым номером, последовательно по мере их обнаружения (Международный Регистр физиологических рас). Со временем сорта Carina, Brevit, Hussar, имеющие температурочувствительную реакцию на инокуляцию патогеном, исключили из набора (Johnston, Browder, 1966). Был предложен ключ для Унифицированной Нумерации (UN) рас, основанный на общности типов инфекции рас, на сортах Malakof, Webster, Loros, Mediterranean, Democrat.

В Северной Америке принят собственный способ обозначения фенотипов (Long, Kolmer, 1989) (таблица 4,5).

Таблица 4. Код фенотипов *P.recondita* f.sp.*tritici*, определяемых с помощью 12 Северо-Американских дифференциаторов

Тип инфекции		Тип инфекции на линии Thatcher					Тип инфекции		Тип инфекции на линии Thatcher				
Код Prt	Набор	1	2a	2c	3	Код Prt	Набор	1	2a	2c	3		
	Набор 1	1	2a	2c	3		Набор 1	1	2a	2c	3		
	Набор 2	9	16	24	26		Набор 2	9	16	24	26		
	Набор 3	3ка	11	17	30		Набор 3	3ка	11	17	30		
B		L	L	L	L	L		H	L	L	L		
C		L	L	L	L	M		H	L	L	H		
D		L	L	H	L	N		H	L	H	L		
F		L	L	H	H	P		H	L	H	H		
G		L	H	L	L	Q		H	H	L	L		
H		L	H	L	H	R		H	H	L	H		
J		L	H	H	L	S		H	H	H	L		
K		L	H	H	H	T		H	H	H	H		

Таблица 5. Тип инфекции (L, H), проявляемый некоторыми расами *P.recondita* f.sp.*tritici* на линиях Thatcher

Международный стандарт	UN	Код Prt	Lr гены											
			1	2a	2b	3	9	16	24	26	3ка	11	17	30
77	13	TBG	H	H	H	H	L	L	L	L	L	H	L	L
77	13	TLG	H	H	H	H	H	L	L	L	L	H	L	L
52	5	MBG	H	L	L	H	L	L	L	L	L	H	L	L
52	5	MBR	H	L	L	H	L	L	L	L	H	H	L	H
52	5	MDG	H	L	L	H	L	L	H	L	L	H	L	L

Prt-код состоит из буквенных обозначений последовательно для наборов 1, 2, 3. Например, раса MGB: набор 1 (M) - вирулентность к Lr1, 3; набор 2 (G) - вирулентность к Lr16; набор 3 (B) - авирулентность ко всем дифференциаторам. L - низкий тип инфекции (авирулентность), H - высокий тип инфекции (вирулентность).

Дополнительно рекомендуется включать дифференциаторы с генами устойчивости Lr19, 21, 25, 29, 32 и линию RL 6059 (Lr33+34), а также линии с генами устойчивости взрослых растений Lr12, 13, 22a, 22b, 34.

Обозначение фенотипов по системе Nabgood

Основной принцип системы Nabgood (1970) состоит в том, что реакция каждого изолята на сорте-дифференциаторе обозначается как 1 вирулентность или 0 - авирулентность (табл.6). Дифференциатор, проявивший вирулентность, обозначается числом 2^n , где n - порядковый номер дифференциатора. Обозначение расы (фенотипа) складывается из сумм чисел для всех дифференциаторов. Из 12 используемых дифференциаторов потенциальное число фенотипов в системе Nabgood равно 2^{12} или 4095. Номера фенотипов согласно данной системе могут быть от 0 до 4095. Но, как показала практика, эта система неудобна для использования. Было предложено ее модернизировать, разделив используемые сорта сначала в две группы по шесть дифференциаторов, затем в четыре группы по три сорта (система триплетов) (табл. 6).

Таблица 6. Номенклатура Nabgood и ее разновидности

	Дифференциаторы												Номер фенотипа
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
Реакция изолята	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Номенклатура Nabgood(H)	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4095
H из 2 групп	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	63.63
H из 4 групп	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	7.7.7.7

Л.А.Михайлова и Л.Г.Тыррьшккин (1989) использовали принципиально ту же номенклатуру с тем различием, что значимым числом обозначали авирулентность. Сорта-дифференциаторы разделены на группы по 3, в каждой группе первый сорт в случае проявления реакции устойчивости получает значение 2^0 , второй - 2^1 , третий - 2^2 , ..., (2^{n-1}) , где n - порядковый номер сорта в триплете. Полученные значения суммируют и суммы записывают в порядке очередности групп. Количество цифр в номере фенотипа зависит от количества триплетов из сортов-дифференциаторов.

Способы определения сходства между природными популяциями

Определение степени сходства по фенотипическому составу споровых образцов популяций *Puccinia recondita* f.sp.*tritici*, собранных в различных географических точках, позволяет судить о том,

принадлежат ли они к одной или разным генеральным популяциям, и в результате определить ареалы популяций. Появление в популяции фенотипов, характерных для другой популяции, может явиться результатом миграции спор; явления такого рода дают возможность предполагать направление миграции спор, особенно, если не имеется оснований предполагать, что изменения произошли вследствие естественного отбора по вирулентности на новом для популяции гриба сорте пшеницы. Безусловно, ареалы популяций, степень их изоляции, вероятность миграции спор могут быть выявлены лишь при условии проведения многолетних исследований состава популяций.

Для выявления ареалов популяций и параметров миграции спор методически правильно определять степень сходства по фенотипическому составу между образцами популяций, а не достоверность различия между ними. Наличие достоверных различий наблюдается даже между спорowymi образцами, собранными с разных растений-хозяев, например, разных видов пшеницы, растущих на соседних делянках одного поля (Михайлова, Метревели, 1986). Такого рода различия являются результатом естественного отбора, обусловленного свойствами растения-хозяина. Показатель же степени сходства отражает интенсивность миграции спор в пределах географического района и, следовательно, степень изоляции между совокупностями особей патогена. Для определения сходства образцов популяций можно пользоваться формулой Л.А.Животовского (1979):

$$r = \Sigma \min(p, q),$$

где p и q - минимальная частота фенотипа в одном из двух сравниваемых образцов популяций.

В работах зарубежных исследователей (Kolmer, 1992) для определения сходства между популяциями используется индекс Роджерса (Rogers index):

$$Hr = 0.5 \Sigma (p_{i1} - p_{i2}),$$

где p_{i1} - частота i -го фенотипа в первой популяции и p_{i2} - частота i -го фенотипа во второй популяции. Идентичные популяции имеют индекс, равный 0, а популяции, не имеющие одинаковых фенотипов, получают индекс 1,0.

Фенотипическое разнообразие оценивается индексами Глисона (Gleason index) (1) и Шеннона (Shannon index):

$$HG = (r - 1) / \ln N,$$

где r - число фенотипов, N - число исследованных изолятов гриба.

$$Hw = -\Sigma p_i \ln(p_i),$$

где p_i - частота i -го фенотипа.

Индекс Глисона указывает число фенотипов, определенных в данной выборке. Индекс Шэннона указывает на число определенных фенотипов и однородность распределения частот фенотипов. Для этого индекса может быть подсчитана вариация, чтобы определить, значимо ли различаются уровни разнообразия различных популяций.

Определение конкурентоспособности клонов *P.recondita* в природной и модельной популяциях

Конкурентоспособность клонов *P.recondita* зависит от степени их агрессивности. Агрессивность является количественным признаком в отличие от качественного признака вирулентности. Критериями агрессивности (конкурентоспособности) служат показатели: 1) продолжительность латентного периода, 2) количество пустул на единицу листовой поверхности или эффективность клонирования, 3) количество спор на пустулу, 4) размеры пустул. Получить представление о степени агрессивности клона (изолята) гриба по отношению к определенному растению-хозяину можно лишь в сравнении с этим показателем у других клонов или с показателями агрессивности этого же клона на других растениях.

Латентный период - промежуток времени от инокуляции растения до проявления на нем 50% уредопустул. Определяют его ежедневным подсчитыванием количества уредопустул на определенном участке листа вплоть до максимума.

Сравнить различные клоны по количеству пустул, проявившихся на единице листовой поверхности (эффективность клонирования), можно при условии нанесения на нее дозированного количества спор гриба. В качестве единицы листовой поверхности можно выбрать сегменты листьев произвольных размеров либо "газон", приготовленный в чашке Петри из отрезков листьев проростков или взрослых растений (рис.2).



Рис.2. Определение эффективности клонирования штаммов возбудителя бурой ржавчины пшеницы

Чем больше "газонов" в опыте, тем точнее будет определение эффективности клонирования. На каждый газон распыляется суспензия спор гриба в водном растворе детергента твин (можно использовать любую марку твина) в одном и том же объеме (оптимально - 0,5 мл) при концентрации 3000 спор/мл. Чашки оставляют на рассеянном свете или в темноте в течение 16-18 часов, затем на дно осторожно приливают примерно по 20 мл 0,004% водного раствора бензимидазола, после чего чашки выставляются в светоустановку или в климатическую камеру. У взрослых растений для приготовления газонов могут быть использованы молодые, только что появившиеся листья. Через 7-8 дней после инокуляции подсчитывают число пустул на сегментах листьев или на газонах, сравнивая по этому показателю либо разные клоны гриба, либо особенности одного клона на разных растениях. Эффективность клонирования (ЭК) рассчитывают по формуле:

$$ЭК = 100(KП/КС) \%,$$

где КП - количество проявившихся пустул, КС - количество спор, нанесенное на единицу листовой поверхности.

Количество спор в пустуле можно определить взвешиванием созревших, осыпавшихся спор или подсчетом числа спор в суспензии, полученной смывом спор водным раствором детергента (к примеру, твин-80) с помощью гемидетометра (камера Горяева и др.). Инокулированные листья интактных проростков или взрослых растений на время спороношения помещают в пробирки, фиксированные на подставках. В эти пробирки периодически, осторожно стряхивают уредоспоры с листа и взвешивают; рассчитывают продуктивность спор на лист и, соответственно, на одну пустулу.

Для смыва спор используют 0,0001% раствор твин-80. Осторожно отрезают сегменты листьев с подсчитанным количеством пустул, помещают отрезки в пробирку с определенным количеством раствора твина и энергично встряхивают. Зная объем суспензии, количество спор на мл суспензии и количество помещенных в пробирку пустул, легко определить урожай спор на пустулу.

Для определения размеров уредопустул используют микроскоп с микрометром (увеличение $\times 100$). Листья предварительно выдерживают в кипящем растворе лактофенол: этанол (2:1) в течение трех минут. Затем измеряют длину и ширину 15 произвольно выбранных на листе пустул. Размер пустулы (РП) определяют с помощью формулы:

$$РП = 1/4\pi \times Д \times Ш,$$

где - Д - длина пустулы, Ш - ширина пустулы.

Необходимо учесть, что в случае избыточной концентрации спор

при инокуляции растений развивается большое количество мелких уредопустул. Оптимальная концентрация спор в инокуляционной суспензии - 3 тыс. спор/мл.

Метод модельных популяций

Модельные популяции могут служить методом изучения взаимоотношений клонов патогена и растения-хозяина. Этим методом можно определить конкурентоспособность одного штамма относительно другого в зависимости от вирулентности, географического происхождения штамма, устойчивости растения-хозяина, условий внешней среды и т.д. Модельные популяции составляют из двух или более штаммов гриба с различными маркирующими признаками. Смесь спор в определенной пропорции рассеивают на отрезки листьев выбранного сорта пшеницы (рис.1А), затем производят пересевы смеси в количестве, необходимом по условию опыта. Исходную смесь и смесь после пересевов рассеивают на газоны (рис.2) универсально восприимчивого сорта. Анализ клонов, выделенных с газонов восприимчивого сорта, показывает состав исходной популяции и состав популяций после пересева.

Определение частоты встречаемости вирулентности в природной популяции

В целях селекции на длительную устойчивость необходимо знать частоту встречаемости клонов, вирулентных к предполагаемому донору устойчивости. Вирулентные к генотипам пшеницы с новым, ранее неиспользуемым геном устойчивости, клоны гриба появляются в популяции патогена в результате мутаций по аллелям авирулентности или из-за миграции спор в пространстве.

Определить частоту встречаемости клонов с редкой вирулентностью можно методом посева спор, представляющих природную популяцию патогена, на "газоны" устойчивого сорта (рис.2). В зависимости от цели опыта в чашки Петри раскладывают отрезки листьев 7-8 дневных проростков или молодых флаг-листьев. В контрольном варианте раскладывают отрезки листьев универсально восприимчивого сорта. Во всех вариантах расплывается одна и та же суспензия спор. Через 7-8 дней после инокуляции подсчитывают число пустул в опытном и контрольном вариантах, определяют частоту встречаемости редких клонов, принимая число пустул в контроле за 100%. Вирулентность клонов с газонов устойчивого сорта должна быть проверена пассированием их на том же растении-хозяине. Для этого споры из пустулы микробиологической тонкой иглой переносят на свежие отрезки листьев устойчивого сорта пшеницы. При тестировании небольшого числа клонов можно пользо-

ваться методом раскладки листьев по типу рисунка 1Б. Для тестирования вирулентности большого числа клонов удобнее пользоваться блоками из отрезков устойчивого и восприимчивого сорта длиной 1-3 см, разложенных в кювете на вате или фильтровальной бумаге, смоченных раствором бензимидазола.

Различие образцов пшеницы по неспецифической (количественной, горизонтальной) устойчивости может внести ошибку в определение частоты встречаемости редких клонов.

Литература

Булат С.А., Мироненко Н.В. Генетическая дифференциация фитопатогенного гриба *Cochliobolus sativus* (Ito and Kurib.) Drechs. ex Dastur (*Bipolaris sorokiniana*) Shoem.), выявляемая методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП-ПЦР): корреляция с хозяйно-специфичностью. /Генетика, 29, 8, 1993, с.1295-1301.

Булат С.А., Мироненко Н.В. Идентификация грибов и анализ их генетической изменчивости методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геноспецифичными и неспецифичными праймерами. /Генетика, 32, 2, 1996, с.165-183.

Булат С.А., Мироненко Н.В., Кабоев О.К. и др. Способ идентификации видов организмов. Российский патент №1833644, приоритет 20.11.1989.

Животовский Л.А. Показатель сходства популяций по полиморфным признакам. /Журн. общей биол., 11, 4, 1979, с.587-602.

Лебедев В.Б., Васильев А.Н., Якубова Е.В. Расчет возможных потерь яровой пшеницы от бурой ржавчины. /Докл. ВАСХНИЛ, 1, 1994, с.14-16.

Мещкова Л.В. Популяционно-генетическая характеристика возбудителя бурой ржавчины пшеницы и генофонд устойчивости к нему в Западной Сибири. Автореф. канд. дисс. Л. 1979.

Михайлова Л.А., Квитко К.В. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины *Puccinia recondita* Rob.ex Desm. f.sp.tritici. /Микология и фитопатология, 4, 3, 1970, с.269-273.

Михайлова Л.А., Метрели Т.Г. Структура популяций *Puccinia recondita* Rob.ex Desm.f.sp.tritici на разных видах пшеницы. /Микология и фитопатология, 20, 1986, с.138-142.

Михайлова Л.А., Тырышкин Л.Г. Структура популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы. 2. Оценка степени сходства популяций на территории СССР. /Микология и фитопатология, 23, 5, 1989, с.458-464.

Степанов К.М., Чумаков А.Е. Разработка долгосрочного прогноза ржавчины хлебных злаков и его проверка в производственных условиях. Л., 1956, 47 с.

Тырышкин Л.Г., Михайлова Л.А. Структура популяций возбудителя бурой ржавчины. 1. Подбор сортов-дифференциаторов. /Микология и фитопатология, 23, 4, 1989, с.396-403.

Чумаков А.Е. Защита пшеницы от ржавчины. Колос, 1964, 100 с.

Brown J.K.M. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. /New Phytologist, 133, 1, 1996, p.183-195.

Burdon J.J., Marshall D.R. Isozyme studies on the origin and evolution of *Puccinia graminis* f.sp.tritici in Australia. /Austral. J. of Biological Sciences, 35,

1983, p.231-238.

Chen X., Line R.F., Leung H. Virulence and polymorphic DNA relationships of *Puccinia striiformis* f.sp.*hordei* and other rusts. /Phytopathology, 85, 1995, p. 1335-1342.

Chen X.M., Line R.F., Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. /Phytopathology, 83, 1993, p.1489-1497.

Egger K.N. Analysis of fungal population structure using molecular techniques. /The fungal community. Ed. G.C. Carroll & D.T. Wicklow, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992, p. 193-208.

Fox S.L., Harder D.E., Kim W.K. Use of virulence and length variability within the rDNA repeat unit to distinguish isolates of *Puccinia graminis* f.sp.*tritici* race QCC. /Canad. J. of Plant Pathology, 17, 1995, p.197-204.

Johnston C.O., Browder L.E. Seventh revision of the international register of physiologic races of *Puccinia recondita* f.sp.*tritici* // Plant Dis. Report, 1966, 50, p.756-760.

Habgood R.M. Designation of physiological races of plant pathogenes. /Nature, 201, 5266, 1970, p.1258-1269.

Kolmer J.A. Diversity of virulence phenotypes and effect of host sampling between and within populations of *Puccinia recondita* f.sp.*tritici* in Canada. /Plant Disease, 76, 6, 1992, p.618-621.

Kolmer J.A., Liu J.Q. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f.sp.*tritici* in Canada. /Phytopathology, 85, 1995, p.276-285.

Long D.L., Kolmer J.A. A North American System of nomenclature for *Puccinia recondita* f.sp.*tritici*. /Phytopathology, 79, 1989, p. 525-529.

Mains E.B., Jackson H.S. Physiologic specialization in the leaf rust of wheat; *Puccinia triticina* Erikss. /Phytopathology, 16, 1926, p.89-120.

McDermott J.M., McDonald B.A. Gene flow in plant pathosystems. /Annual Review Phytopathology, 31, 1993, p.353-373.

Michelmore R.W., Hulbert S.H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. /Annual Review Phytopathology, 25, 1987, p. 383-404.

McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rust (An Atlas of Resistance Genes). CSIRO, Australia, 1995.

Park R.F., Jahoor A., Felsenstein F.G. Genetic variation in European populations of *Puccinia recondita* f.sp.*tritici* using pathogenicity and molecular markers. /Proc. of the 9th European and Mediterranean Cereal Rust & Powdery Mildew Conference, 2-6 September 1996, Lunteren, The Netherlands, p.92-94.

Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var.*tritici*. /Agricultural Research Service E617. (United States Department of Agriculture: Washington DC.), 1962.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. /NAR, 18, 1990, p.6231-35.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПЯТНИСТОСТЕЙ ЛИСТЬЕВ ЯЧМЕНЯ

О.С.Афанасенко

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербурге

Сведения об изменчивости популяций фитопатогенных грибов имеют как фундаментальное значение для развития теории микроэволюции, так и сугубо прикладное - для разработки стратегии территориального размещения генов устойчивости растений к болезням.

К настоящему времени сложились следующие аспекты исследования популяций фитопатогенных грибов:

- сравнительный анализ популяций с целью установления их ареалов и выявления роли миграции,
- исследование динамики популяций фитопатогенов во времени,
- изучение закономерностей естественного отбора под влиянием факторов окружающей среды и, прежде всего, генотипа растения-хозяина,
- выявление редких фенотипов вирулентности к эффективным источникам и донорам устойчивости с целью прогнозирования длительности устойчивости,
- выявление роли различных механизмов изменчивости популяций фитопатогенов.

Все перечисленные аспекты изучения популяций предполагают наличие двух непеременимых условий: дифференцирующих сортов растения-хозяина и методов тестирования больших выборок клонов по признаку вирулентности к набору сортов.

Оптимальным условием является использование стандартных наборов сортов-дифференциаторов, либо наборов моногенных по генам устойчивости линий. В отношении сапротрофных патогенов ячменя существуют стандартные наборы для анализа популяций возбудителей сегчатой пятнистости листьев (Афанасенко и др.,1995) и ринхоспориоза ячменя (Goodwin et al.,1990). Набор для возбудителя темно-бурой пятнистости (Левитин и др.,1985) имеет региональное значение для Северо-Западной зоны России.

При отсутствии наборов сортов-дифференциаторов и при наличии косвенных доказательств специфических взаимодействий в системе растение-хозяин - патоген (различия в реакциях на инокуляцию патогеном коллекционных сортов и образцов растений) возможно подобрать набор сортов, обладающих дифференцирующей способностью. Под понятием "дифференцирующая способность" мы подразумеваем наличие альтернативных реакций при заражении различными клонами, относительно низкую частоту промежуточных типов реакций и возможность статистической обработки данных при сравнительном анализе популяций. Перечисленные требования отно-

сются к идеальному набору сортов-дифференциаторов, и абсолютная их реализация невозможна. Как было показано при подборе сортов-дифференциаторов для возбудителя сетчатой пятнистости ячменя, низкая частота промежуточных типов реакций была характерна для более устойчивых образцов, в то же время образцы с высокой дифференцирующей способностью имели высокую частоту промежуточных типов реакций (Афанасенко, 1996). В любом случае первым этапом должно быть выявление сортов с альтернативными типами реакций на заражение отдельными клонами патогена.

Работа по анализу популяций фитопатогенов складывается из 4-х основных этапов: сбор и хранение популяций, получение изолятов и моноспоровых культур патогенов, тестирование моноспоровых изолятов (клонов) по признаку вирулентности к набору сортов-дифференциаторов и статистический анализ результатов исследований. Все перечисленные этапы будут рассмотрены ниже на примере анализа популяций возбудителя сетчатой пятнистости ячменя.

Сбор природных популяций возбудителей пятнистостей листьев ячменя. Принципы сбора популяций патогенов зависят от целей исследований. При сравнительном изучении популяций сборы проводят в различных географических зонах с производственных посевов районированных сортов. Наибольшей достоверностью будут отличаться данные сравнительного анализа выборки клонов, собранных с одного и того же сорта в исследуемых регионах. Часто бывает невозможно соблюсти этот принцип из-за различного сортимента, в таком случае приемлемо использовать для анализа представительную выборку клонов с сортов, возделываемых на наибольших площадях в изучаемом регионе и оказывающих определяющее влияние на формирование популяций патогенов.

Листья с симптомами поражения болезнью собирают в различных точках производственного массива и этикетировывают, обозначая место и время сбора, стадию развития растений и сорт растения. Собранные листья высушивают немедленно после сбора для предотвращения развития сапротрофной микрофлоры и хранят в бумажных пакетах при комнатной температуре. Листья с симптомами ринхоспориоза рекомендуют после высушивания хранить в холодильнике в эксикаторе.

При изучении сезонной динамики популяций, выявлении роли генотипа растения-хозяина на отбор в популяциях сборы пораженных листьев проводят в различные фазы вегетации растений одного сорта (например, кущение, начало колошения, цветение, молочно-восковая спелость) и с различных сортов ячменя.

При первичном выявлении гетерогенности популяций по признаку вирулентности и подбору сортов-дифференциаторов сборы популяций необходимо проводить на коллекционных посевах, так как амплитуда изменчивости на таких посевах выше, чем на однородных производственных.

Количество необходимого материала берут из расчета получения и анализа 50-100 клонов из каждого изучаемого региона или в каждый момент времени (при изучении динамики популяций во времени). С каждого листа целесообразно выделить только один изолят гриба во избежание получения коллекций близкородственных изолятов.

Получение изолятов и моноспоровых культур патогенов. Для получения чистых культур проводят изоляцию патогена на агаровые среды, наиболее подходящие для культивирования данного вида. Например, изоляцию грибов *P.teres* и *C.sativus* наиболее удобно проводить на синтетическую среду А.А.Бенкена и др. (1969). Важным моментом при изоляции грибов из растительной ткани являются способы стерилизации поверхности листьев. При изоляции из пораженной ткани вырезают кусочки размером $\approx 3 \times 5$ мм таким образом, чтобы захватить край пятна и небольшой участок здоровой ткани. Их помещают в стерильную чашку Петри, приливают стерилизующий раствор и оставляют на несколько минут (в зависимости от стерилизатора) под закрытой крышечкой. Наиболее распространенным стерилизатором является 2% раствор медного купороса (5-10 минут стерилизации), кроме него можно применять и более сильные стерилизаторы, такие как гипохлорид кальция (0.5-1%, 1 минута), 70% этиловый спирт (несколько секунд) и др. После стерилизации каждый отрезок листа стерильным пинцетом переносится в чашку со стерильной водой, а затем на стерильную фильтровальную бумагу, и, наконец, на поверхность агаровой среды. На 5-7 день на поверхности среды появляются колонии гриба со спороношением. Их отсеивают на ту же среду для размножения, либо, если в чашке отсутствует посторонняя инфекция, споры собирают лопаткой и приготавливают суспензию для клонирования. Для получения большого количества моноспоровых изолятов суспензию конидий, отфильтрованную через 2 слоя марли, засеивают на среду с добавлением ограничителя роста. Для грибов *P.teres* и *C.sativus* лучшим ограничителем является тритон $\times 100$ (0.16 мл на литр среды). Суспензию растирают по поверхности среды шпателем и инкубируют 7-14 дней в термостате при 20-24°C. Полученные не срастающиеся колонии отсеивают на размножение на агаровую среду без ограничителя роста. На 7-10 день спороносящие колонии могут быть использованы для инокуляции растений.

Клоновые коллекции для анализа популяций следует формировать не более, чем на 1 год, то есть на период изучения вирулентности популяции к набору сортов-дифференциаторов и устойчивости сортообразцов ячменя. На длительное хранение закладываются лишь штаммы, маркированные необходимыми признаками (морфолого-культуральными, вирулентностью) для оценки устойчивости, проведения генетического анализа, составления модельных популя-

дий гриба, исследования механизмов изменчивости и т.д. Сохранение всей коллекции в течение длительного времени не целесообразно, так как хранение возбудителей в чистой культуре приводит к изменению их вирулентных свойств, а селекция штаммов со стабильными признаками трудоемка и не может быть осуществлена с большим количеством клонов.

Тестирование клонов по вирулентности к набору сортов-дифференциаторов. Как уже отмечалось выше, для возбудителя сетчатой пятнистости и ринхоспориоза ячменя существуют стандартные наборы сортов-дифференциаторов, представленные в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Международный набор сортов-дифференциаторов для анализа популяций возбудителя сетчатой пятнистости ячменя (*Pycnophora teres*) по признаку вирулентности (Афанасенко и др., 1995)

№ группы	Название сорта	№ каталога ВИР и СИ	№ группы	Название сорта	№ каталога ВИР и СИ
1	Canadian Lake Shore	CI 2750, к 25282	3	Тифанг	CI 4407-1, к 25284
	Харбия	CI 4929, к 19282			
2	к 8755	к 8755	4	Diamond	к 29192
	к 20019	к 20019		CI 9825	CI 9825, к 25275
	CI 4207	CI 4207		CI 5791	CI 5791, к 25273
	Manchurian	CI 739		CI 9820	CI 9820
				CI 9819	CI 9819, к 25274

Таблица 2. Набор сортов-дифференциаторов для анализа популяций возбудителя ринхоспориоза ячменя (*Rhynchosporium secalis*) (Goodwin et al., 1990)

№ группы	Название сорта	№ каталога СИ	№ группы	Название сорта	№ каталога СИ
1	Универсально восприимчивый		5	Kitchin	1296
	La Mesita	7565			
	Atlas 46	7323			
2	WW x G b	8162	6	CI 4364	
	Brier	7157			
	Hudson	8067			
3	Modoc	7566	7	Nigrinudum	2222
	Trebi	936			
	Turk	5611-2			
4	Atlas	4118	8	Gospeck	9094
	Steudelii	2266			
	Osiris	1622			
				Sakigake	7388
				Sultan	5577

Растения каждого сорта, входящего в набор, выращивают в кюветках (на 2-х слоях фильтровальной бумаги), растильнях, горшках и т.д. (в почве или песке) 8-10 дней, и первый лист проростка исполь-

зуют для инокуляции грибом *P. teres*. Лабораторные методы искусственной инокуляции для возбудителя *Rh. secalis* пока не разработаны, за рубежом используют методы искусственной инокуляции путем опрыскивания вегетирующих растений в стадии 1-2 листьев в климатических камерах.

При подготовке растений для инокуляции возбудителем сетчатой пятнистости проростки каждого сорта разрезают на 3-4 отрезка размером 1.5-2 см и раскладывают вертикальной строчкой по 5 отрезков в кювету на фильтровальную бумагу, смоченную раствором бензимидазола (0.004%). Все 12 сортов-дифференциаторов помещают в 2 эмалированные кюветы (20×30 см) в виде 12 столбиков (+ 1 столбик из растений восприимчивого контроля сорта Пиркка) и 18 горизонтальных строчек. Каждую горизонтальную строчку инокулируют одним клоном гриба суспензией с титром спор 7-10 тыс. конидий в мл. Суспензию наносят микропипеткой по 0.02 мл на каждый отрезок листа. Следует точно выдерживать концентрацию конидий, так как при превышении нагрузки реакция устойчивости некоторых сортов может сместиться в сторону восприимчивости, и может возникнуть ошибочная интерпретация данных, при более низких нагрузках растения могут быть слабо поражены и реакцию устойчивости будет демонстрировать и восприимчивый контроль. Реакцию сортов-дифференциаторов ячменя на инокуляцию возбудителем сетчатой пятнистости определяют на 4-5 сутки после заражения по 5-балльной шкале (Афанасенко, 1977):

- точечные некрозы без хлороза (высокая устойчивость),
- некротические коричневые пятна без хлороза или с небольшим хлорозом, не распространяющиеся по отрезку листа и ограниченные диаметром инфекционной капли (устойчивость),
- некроз, распространяющийся по поверхности листа, окруженный хлорозом (восприимчивость),
- некроз распространяется по поверхности листа, но медленнее, чем при оценке по баллу "3", хлороз отсутствует или небольшой (промежуточный тип реакции),
- некроз занимает весь отрезок листа (высокая восприимчивость).

Балл "0" в предлагаемой шкале отсутствует, поскольку проникновение патогена происходит независимо от устойчивости сорта, и на высокоустойчивых сортах образуются точечные некрозы в местах проникновения.

В соответствии с полученными данными проводят обозначения фенотипов (рас) и подсчитывают процентное соотношение выявленных в данной популяции фенотипов вирулентности.

Для получения сравнимых данных при анализе структуры популяций фитопатогенов в различных районах страны и в разных странах необходимо не только использование полного стандартного набора сортов-дифференциаторов, но и единой системы нумерации

патотипов.

Системы обозначения патотипов фитопатогенов в исторической ретроспективе претерпели значительные изменения. Э.Лимперт и др. (1993) выделили три генерации систем: 1 - хронологический порядок определения патотипов (порядковые номера или буквенные символы) (Stakman, Piemeisel, 1917), 2 - нумерация R-генов или сортов-дифференциаторов по порядку (формулы вирулентности) (Black et al., 1953); 3 - математическое кодирование (бинарные номера переведены в разные цифровые системы): десятичная запись (Habgood, 1970), гексадецимальные номера (Roelfs, McVey, 1972), октальная запись (Gilmour, 1973; Limpert, Muller, 1993). Безусловно, наиболее логичным, кратким и информативным является математическое кодирование.

При анализе популяций *P.terres* и *C.sativus* на небольших наборах сортов-дифференциаторов в первые годы исследований для обозначения рас возбудителей нами была применена система Хабгуда (Habgood, 1970). Суть ее состояла в том, что при обозначении номера расы сорта-дифференциаторы располагают в строго определенном порядке и каждому присваивают (справа-налево) бинарный номер от 2^0 до 2^{n-1} , где n - количество сортов-дифференциаторов. Для того чтобы определить номер расы, нужно сложить числа бинарных номеров тех сортов-дифференциаторов, к которым данный патотип вирулентен. Например:

Сорта-дифференциаторы						
к 25270	к 25282	к 25275	к 8755	к 19282	к 18474	к 19467
Бинарные номера сортов-дифференциаторов и их числовые значения						
2^6	2^5	2^4	2^3	2^2	2^1	2^0
64	32	16	8	4	2	1
Типы реакции сортов на заражение одним клоном патогена						
У	В	У	У	В	В	У
Номер расы = $32 + 4 + 2 = 38$						

Для того чтобы узнать, какие сорта-дифференциаторы поражаются данной расой, необходимо разложить число, обозначающее номер расы, на составляющие, которые укладывались бы в данное число. Например, если раса $38 = 32 + 4 + 2$, то она вирулентна ко 2-му, 5-му и 6 сортам-дифференциаторам.

При работе с набором из 12 сортов-дифференциаторов мы использовали октальную систему, суть которой состоит в том, что сорта-дифференциаторы также располагаются в определенном порядке, но группируются по 3. Принципы формирования групп могут быть различными, например, использование в одной группе сортов с возрастающим количеством генов устойчивости, но при этом с одним общим, или объединение в одну группу сортов с неидентифицированными генами устойчивости и т. д. (Goodwin et al., 1990). Для каждой группы определяют номер патотипа по методу Хабгуда и назва-

ние расы будет состоять из серии таких номеров, в нашем случае из 4-х цифр. Например, раса 0000 не поражает ни одного сорта-дифференциатора, формула расы 6102 будет ВВУ УУВ УУУ УВУ и т.д.

Такая система записи более гибкая, так как при использовании неполного набора эти сведения можно зафиксировать в названии патотипа. Например, _321 означает, что все сорта первой группы отсутствовали в анализе; при отсутствии одного или двух сортов внутри группы цифра, соответствующая этой группе, подчеркивается. Таким образом, возможно как присоединение новых групп сортов, так и уменьшение их, и при этом номер расы остается информативным.

При сравнительном анализе популяций патогенов по признаку вирулентности можно использовать несколько показателей:

- число клонов, вирулентных к отдельным сортам-дифференциаторам или устойчивым сортам с использованием показателя достоверности разницы по критерию Стьюдента и Фишера,

- частота встречаемости доминирующих рас в сравниваемых популяциях,

- % общих фенотипов (r), вычисляемый по формуле Л.А.Животовского (1979): $r = \sum \min(p_i, q_i)$, где p_i и q_i - частота встречаемости (%) общих фенотипов в 1-ой и 2-ой популяциях, соответственно,

- средняя вирулентность популяции \approx показатель, характеризующий число сортов-дифференциаторов, поражаемых в среднем одним клоном патогена, рассчитывается по формуле $\Sigma P/n$, где P - количество совместимых типов реакций на всех сортах-дифференциаторах в исследуемой популяции, n - количество клонов (Martens, 1968),

- ранговый коэффициент корреляции рассчитывается по формуле Спирмена (по Плохинскому, 1961): $r_s = 1 - [\Sigma d^2 / (n-1) n (n+1)]$, где d^2 - разность рангов двух признаков в каждой паре, n - число пар рангов сортов-дифференциаторов.

Литература

Афанасенко О.С. Лабораторный метод оценки устойчивости сортообразцов ячменя к возбудителю сетчатого гельминтоспориоза. /С.-х. биология, 12, 2, 1977, с.297-299.

Афанасенко О.С. Изменчивость популяций возбудителей гельминтоспориозных пятнистостей ячменя и генетический контроль устойчивости к *Fyrenophora teres* Drechs. Автореф. докт. дисс. С.-Петербург, 1996, 40 с.

Афанасенко О.С., Харлеб Х., Гусева Н.Н., Минаржикова В., Яношева М. Международный набор сортов-дифференциаторов популяций возбудителя сетчатой пятнистости ячменя. /Микол. и фитопатол., 28, 4, 1995, с.34-42.

Бенкен А.А., Гайке М.В., Хацкевич Л.К. Сетчатый гельминтоспориоз ячменя. /Тр. 5 Всесоюзного совещания по иммунитету растений, 5 (2). Киев, 1969, с.38-42.

Животовский Л.А. Значение сходства популяций по полиморфным при-

знакам. /Общая биология, 4, 1979, с.587-602.

Левитин М.М., Петрова А.Н., Афанасенко О.С. Сравнительное изучение популяций *Vibolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. по вирулентности. /Микол. и фитопатол., 19, 2, 1985, с.154-158.

Лимперт Э., Клиффорд Б., Драйзайтл А., Джонсон Р., Мюллер К., Роуэлфс А., Уэллингс К. Системы обозначения патотипов растительных патогенов. /Микол. и фитопатол., 27, 5, 1993, с.63-66.

Плохинский Н.А. Биометрия. Новосибирск, 1961, 250 с.

Black W., Mastenbroek C., Mills W.R., Peterson L.C. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. /Euphytica, 2, 1953, p.173-179.

Gilmour J. Octal notation for designating physiological races of plant pathogens. /Nature, 256, 1973, p.620.

Goodwin S.B., Allard R.W., Webster R.K. A nomenclature for *Rhynchosporium secalis* pathotypes. /Phytopathology, 80, 1990, p.1330-1336.

Habgood R.M. Designation of physiological races of plant pathogens. /Nature, 227, 5264, 1970, p.1268-1269.

Limpert E., Muller K. Designation of pathotypes of plant pathogens. /J. Phytopath., 140, 1994, p.346-358.

Martens J.W. Stem rust of oats in Canada in 1967. /Canad. Plant. Dis. Sur., 48, 1968, p.17-19.

Roelfs A.P., McVey D.V. Wheat stem rust races in the Yaqui valley of Mexico during 1972. /Plant Dis. Rep., 56, 1972, p.1038-1039.

Stakman E.C., Piemiesel E.J. Biological forms of *Puccinia graminis* on cereales and grasses. /J. Agr. Sci., 10, 1917, p.29.

ИЗУЧЕНИЕ РАС ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТЕМНОПЯТНИСТОГО И БЛЕДНОПЯТНИСТОГО АСКОХИТОЗА ГОРОХА

Н.Н.Гусева*, Т.П.Градобоева**

*Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург
**Фаленская селекционная станция

Ареал поражения гороха темнопятнистым и бледнопятнистым аскохитозом охватывает все зоны возделывания культуры. В эпифитотийные годы аскохитозом поражается до 75% листовой поверхности, зараженность семян достигает 40%. Пораженные семена теряют всхожесть на 5-70% (Владимирова и др., 1981; Овчиникова и др., 1993). Для создания устойчивых к аскохитозу сортов необходимо изучение структуры популяций патогенов.

Часто проводят оценку устойчивости к "аскохитозам", хотя имеются 2 вида возбудителя: *Ascochyta pinodes* и *A.pisi*. При поражении темнопятнистым аскохитозом (*A.pinodes*) на листьях развиваются приподнятые, точечные или крупные пятна неправильной формы, диаметром 7 мм, темно-коричневые с темным центром и светлым краем. При сильном поражении наблюдается сплошное побурение и отмирание стеблей и черешков листьев. Пикниды погружены в ткань. При бледнопятнистом аскохитозе (*A.pisi*) образуются пятна диаметром 8 мм с желтым центром и темно-коричневым ободком. В центре пятен - поверхностные пикниды, на стебле и на черешках - крупные вдавленные пикниды. На семенах трудно различить поражение различными видами возбудителей. Установить их видовую принадлежность можно, выделив возбудителей аскохитоза из семян в чистую культуру.

Изучение устойчивости гороха к темнопятнистому и бледнопятнистому аскохитозу проводится с учетом внутривидовой дифференциации патогенов. В Канаде на 7 сортах-дифференциаторах выявлено 4 расы *A.pisi* по всем зонам страны. В Чехии при анализе 6 географических популяций на тест-сортименте из 15 сортов выявлено 5 биотипов *A.pinodes*. В нашей стране внутривидовую дифференциацию *A.pinodes* и *A.pisi* начали В.Н.Бондарцева и Н.И.Василевский в 1937 г. После перерыва лишь в 70-х годах описано 8 рас *A.pinodes* и 7 рас *A.pisi* на 18 образцах гороха.

Проводится наработка инфекционного материала и получение моноклонов возбудителей по регионам России. В Сибири посевы гороха поражаются бледнопятнистым аскохитозом, в Европейской части преобладает темнопятнистый аскохитоз. Обследование посевов гороха в Кировской области показало, что в этой зоне наиболее широко распространен бледнопятнистый аскохитоз. Несколько меньше горох поражается темнопятнистым аскохитозом. В последние годы отмечен третий вид возбудителей аскохитоза - *A.pinodella*. Работа по

дифференциации этого патогена должна проводиться по схеме оценок двух предыдущих видов (табл.1).

Таблица 1. Отличительные особенности видов *p.Ascochyta*

Признаки	<i>A.pinodes</i>	<i>A.pisi</i>
Цвет на овсяном агаре	Серый - темно-оливковый	Белый, бело-розовый
Пикниды	На поверхности, многочисленные, размером 232-271 мкм, обильный экссудат желтого цвета	Размером 190-448 мкм, экссудат морковного цвета
Споры	Двуклеточные: 10.6-23.4 × 3.6-6/12 мкм	Двуклеточные: 10.6-23.2 × 2.9-6.77 мкм
Хламидоспоры	Желто-кремовые 7.65-12.24 мкм	Не образует

Популяции собирают с нескольких районированных сортов, ориентируясь на слабовосприимчивые и практически устойчивые сорта. Для выделения патогена лучше использовать свежесобранный материал. Интенсивное спороношение патогена можно получить во влажной камере или на овсяном агаре. Наиболее приемлемым способом пересева патогена является перенос кусочков пораженной ткани в пробирку с 3-5 мл стерильной воды и тщательное перемешивание их. Из каждой пробирки стерильной пипеткой берут 0.1-0.2 мл суспензии, ее переносят в чашки Петри на агар и распределяют по поверхности шпателем. Чашки Петри помещают в термостат при температуре 22-24°C. Спороношение используют для получения моноклоновых изолятов.

Для выделения клонов проводится посев конидиальной суспензии на овсяный агар. В качестве ограничителя роста используется бычья желчь (25 мл/л среды). В одной чашке Петри получают до 60 отдельных моноклоновых колоний патогена. Моноспоровые изоляты используют для инфицирования сортов-дифференциаторов, на которых определяют расовый состав возбудителей аскохитоза.

Совместными усилиями ВИЗР и НПО ЗБК были подобраны сорта-дифференциаторы, показавшие хорошую способность дифференцировать расы различных географических популяций *A.pinodes* и *A.pisi*. Все подобранные сорта характеризуются продуктивностью, среднеспелостью, устойчивы к корневым гнилям и мучнистой росе.

Для изучения рас *A.pinodes* и *A.pisi* следует использовать листья сортов гороха различного географического происхождения (табл.2).

Учет реакции сортов-дифференциаторов на заражение различными клонами проводят по максимальному поражению.

Обобщение многолетних данных позволило составить ключи для определения рас видов *A.pinodes* и *A.pisi* (табл.3). Номера расам присваивали по системе К.М.Habgood (1970).

Таблица 2. Дифференциаторы для определения рас *A. pinodes* и *A. pisi*

№ каталога ВИР	Сорта-дифференциаторы	Происхождение	
<i>A. pinodes</i>	5144	Пелюшка Стунницкого	Чехия
	4833	Геро	Латвия
	4832	Пионер 1	Латвия
	4333	Виктория Диосецкая	Чехия
	6748	Ульяновский 68	Ульяновская область
	Орловский 29	Орловская область	
<i>A. pisi</i>	8195	Белковая гроздь	Луганская область
	2020	Pois Comete	Франция
	6999	Inter	Чехия
	7351	Союз 10	Молдова
		Восточный 80	Алтайский край

Таблица 3. Номенклатура рас возбудителей
бледнопятнистого (*A. pisi*) и темнопятнистого аскохитозов (*A. pinodes*)

Номер расы	Тест-сорта и их бинарные номера					
	Белковая гроздь	Pois Comete	Inter	Союз 10	Восточ- ный 80	
	24	23	22	21	20	
<i>A. pisi</i> : 0	У	У	У	У	У	
4	У	У	В	У	У	
7	У	У	В	В	В	
19	В	У	У	В	В	
31	В	В	В	В	В	
	Пелюшка Стунницкого	Геро	Пионер	Виктория Диосецкая	Ульянов- ский 68	Орлов- ский 29
<i>A. pinodes</i> : 0	У	У	У	У	У	У
6	У	У	У	В	В	У
15	У	У	В	В	В	В
47	В	У	В	В	В	В
63	В	В	В	В	В	В

Выделение вирулентных рас дает возможность организации жестких инфекционных фонов, позволяющих выявлять устойчивые к аскохитозу сорта гороха.

Литература

Владимирова Л.В., Гусева Н.Н., Овчиникова А.М. Выделение и определение рас возбудителя бледнопятнистого аскохитоза в Алтайском крае. //Микология и фитопатология, 23, 6, 1989.

Овчиникова А.М., Гусева Н.Н., Андриюхина Р.М., Владимирцева А.В. Методические указания по изучению рас возбудителей темнопятнистого и бледнопятнистого аскохитоза гороха. СПб, 1993.

Habgood K.M. Designation of physiological races of plant pathogens. //Nature, 227, 5268, 1970.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ИЗМЕНЧИВОСТИ НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ - ПАТОГЕНОВ РАСТЕНИЙ

Г.С.Коновалова

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Основными факторами изменчивости грибов, приводящими к возникновению новых вирулентных рас, являются мутационный, половой и парасексуальный процессы.

Широкий спектр мутантных форм, появляющихся под действием мутагенных факторов, представляет несомненный интерес в исследовательской работе с фитопатогенами. Знание спектра мутаций может оказаться полезным при разработке видовой и внутривидовой систематики изучаемых объектов. Индуцированные мутанты с успехом могут использоваться для создания коллекции мутантных рас с измененной вирулентностью. И, наконец, следует подчеркнуть незаменимость мутантов как маркированных линий при картировании отдельных генов, определения групп сцепления, обнаружения гетерокарионов, парасексуального процесса и в других вопросах частной генетики фитопатогенов (Левитин, Федорова, 1972). Важным является использование генетически маркированных линий при изучении механизмов патогенности возбудителей болезней, характера наследования различных признаков, в том числе и признака вирулентности, в модельных популяциях для изучения внутривидовых взаимоотношений фитопатогенов, а также при решении других вопросов (Левитин, 1986).

По методам обнаружения мутации у грибов можно условно разделить на морфологические, ауксотрофные и физиологические. Среди морфологических наиболее легко учитывать мутации, изменяющие окраску колоний или характер их поверхности. Мутации ауксотрофности являются основными маркерами в генетических исследованиях с микроорганизмами. Ауксотрофные мутанты находят применение и в биохимических исследованиях для выяснения путей биосинтеза в клетке тех или иных соединений, а также в селекции микроорганизмов - продуцентов таких биологических веществ, как аминокислоты, витамины и т.д. Особый интерес представляют мутанты с измененной вирулентностью у фитопатогенных грибов. Однако этот признак является весьма сложно тестируемым, поэтому он неудобен для генетической маркировки штаммов. При учете мутаций, изменяющих морфологию колоний, суспензия клеток рассеивается на питательную среду, и все выросшие колонии просматриваются. Для учета мутаций ауксотрофности успешно применяется метод отпечатков, предложенный Ледеберами (Lederberg, Lederberg,

1952), особенно для грибов, имеющих колонии, клетки которых легко прилипают к бархату. Чашка Петри с выросшими на ней колониями переворачивается, открывается и прикладывается поверхностью среды к куску стерильного бархата, натянутого на деревянный цилиндр. Существует несколько модификаций этого метода. При этом распечатка тестируемых колоний производится с помощью металлической щетки-репликатора различной конструкции (Roberts, 1959; Wood, Mahajan, 1970). Все полученные мутанты ауксотрофности в дальнейшем идентифицируются, то есть определяются их специфические потребности. Разработаны многочисленные методы идентификации ауксотрофных мутантов. Суть их заключается в выращивании ауксотрофов на минимальной среде, в которую добавлены определенные ростовые вещества (аминокислоты, витамины, азотистые вещества). Аминокислоты и азотистые вещества добавляются в минимальную среду в концентрации 10 мкг/мл, витамины - 1 мкг/мл (Захаров и др., 1976). Для более быстрой идентификации большого количества биохимических мутантов весьма эффективен метод Холлидея (Holliday, 1956). Применение этого метода позволяет определить потребности мутантов в 36 ростовых факторах, используя при этом только 12 чашек с минимальной средой, обогащенной ростовыми факторами определенным образом.

Создание коллекции генетически маркированных штаммов

Методы изучения изменчивости несовершенных грибов будут продемонстрированы на модельных объектах: мультикариотичном грибе *Drehslera teres* (возбудитель сетчатой пятнистости ячменя) и монокариотичном грибе *Verticillium dahliae* (возбудитель нилта хлопчатника). Для создания коллекции генетически маркированных линий грибов используют УФ-лучи и химический мутаген 6-гидроксиламинопуридин (ГАП). Действию мутагенов подвергают природные моноконидиальные изоляты гриба, выделенные из зараженных листьев растений. Все культуры грибов *D.teres* и *V.dahliae* культивируют на стандартных питательных средах (Захаров и др., 1976).

Наибольший прогресс в изучении механизмов мутагенеза достигнут при изучении мутационного процесса, индуцированного излучениями и, особенно, УФ-лучами. УФ-излучение является одним из видов электромагнитных излучений, по длине волны располагаясь между видимым светом и рентгеновскими лучами. Максимум поглощения для нуклеиновых кислот приходится примерно на 260 нм, что коррелирует с наибольшим летальным эффектом. Доза УФ-лучей измеряется в джоулях на 1 м² или в эргах на 1 мм². Возбуждение атомов в макромолекулах при УФ-облучении вызывает у них

различные фотохимические реакции. Важнейшей из них является димеризация пиримидинов, которая сопровождается разрывом водородных цепей между цепями ДНК, приводя к изменению ее конформации (Самойлова, 1967). Зависимость частоты от дозы мутагена выражается графически: по оси абсцисс откладывается доза, по оси ординат - частота индуцированных мутаций. Для снятия кривых доза-эффект можно использовать три экспозиции, дающие выживаемость 50, 10 и 1%. При этом за 100% принимают выживаемость клеток в необлученной суспензии. При этих же дозах учитывается и частота индуцированных мутаций (Захаров и др., 1980).

Все изученные химические мутагены по способу их воздействия на ДНК можно разделить на три основных класса:

- аналоги азотистых оснований, замещающие нормальные основания ДНК во время репликации; 2) вещества, химически изменяющие основания в покоящейся ДНК; 3) вещества, под действием которых происходят выпадения или вставки отдельных нуклеотидов. К аналогам оснований относятся 5-бромурацил (БУ), 2-аминопурин (АП) и 6-гидроксиламинопурин (ГАП). Аналоги азотистых оснований включаются в молекулу ДНК, не нарушая ее способности к репликации, и вызывают преимущественно транзиции ГЦ-АТ и АТ-ГЦ. В основном все аналоги азотистых оснований, за исключением ГАП, проявляют свои мутагенные свойства только на вирусах и бактериях. ГАП - единственное из этой группы вещество, обладающее сильным мутагенным действием на клетки грибов (Захаров и др., 1980).

По своей мутагенной активности ГАП превосходит такие мутагены, как рентгеновские и УФ-лучи, акридин-иприт, этиленсульфонат. Сравнение спектров ауксотрофов, индуцированных ГАПом и другими мутагенами, показало, что ГАП больше всего вызывает у дрожжей аденинзависимые мутанты, накапливающие красный пигмент (Симаров и др., 1975). В качестве мутагена ГАП на фитопатогенных грибах ранее не использовался. Между тем специфичность мутагена, его высокая мутагенная активность представляют интерес при создании генетически маркированных линий фитопатогенных грибов.

Получение маркированных штаммов грибов V.dahliae и D.teres под действием УФ-лучей. Источником УФ-излучения в лабораторных условиях являются бактерицидные лампы типа БУВ-30П с мощностью дозы на уровне облучения 40 эрг/мм сек. Обработке УФ-лучами подвергают суспензию гриба концентрации $50 \cdot 10^3$ спор/мл (для *D.teres*) и $1 \cdot 10^6$ спор/мл (для *V.dahliae*). Облученные и необлученные суспензии гриба после соответствующих разведений высевают на полную с пептоном (ПП) среду. После 5-7 дней инкубации чашек с посевами проводят подсчет выросших колоний и определяют выживаемость конидий в зависимости от дозы облучения. Вы-

росшие после облучения колонии гриба распечатывают с помощью бархата (*V.dahliae*) и спичек (*D.teres*) на минимальную (М) и ПП среды. Имеющиеся ауксотрофы изолируют и идентифицируют. Идентификацию проводят на чашках с М средой, содержащей различные добавки аминокислот, витаминов и азотистых оснований по схеме Холлидея (Holliday, 1956).

Под действием УФ-лучей у штаммов дикого типа *D.teres* были получены разнообразные морфологические мутанты. Была определена зависимость выживаемости конидий гриба и частоты индуцированных морфологических мутантов от дозы УФ-лучей. Как показали результаты исследований, процент мутантов увеличивается с повышением дозы облучения до определенного уровня, а затем снижается. Максимальную частоту морфологических мутантов 0.48%, из которых мутанты, накапливающие красный пигмент, составляли 0.31%, наблюдали при выживаемости гриба 3.8%. Среди индуцированных мутантов были обнаружены следующие морфологические типы: пигментные - красные, оранжевые, коричневые, цвета слоновой кости (*ivo*) и с измененной топографией - морщинистые и дрожжеподобные. Некоторые из них не встречались среди спонтанных мутантов, например, *ivo*, белый морщинистый и черный дрожжеподобный. Это можно объяснить низкой частотой этих мутаций и, возможно, элиминацией их из популяций в процессе естественного отбора. Из всех мутантов наибольший интерес представляют пигментные хорошо спорносящие мутанты как удобные маркеры для генетических исследований. К таким мутантам относятся красные и цвета слоновой кости (*ivo*).

Ауксотрофные мутанты у *D.teres* под действием УФ-лучей получены не были, хотя у близкородственных грибов *Cochliobolus carbonum* (Pара, 1969) и *C.sativus* (Tinline, 1960, 1961) частота их возникновения составляла 0.94% и 0.48% соответственно. Надо отметить, что первоначально было выделено около 20 различных ауксотрофов. Однако все они оказались нестабильными и при пересевах были потеряны вследствие того, что споры гриба *D.teres* являются многоядерными и многоклеточными и мутация ауксотрофности маскируется аллелями дикого типа, присутствующими в немутантных ядрах. Вероятно, стабильные ауксотрофные мутанты можно получить только в результате длительного отбора на селективных средах, или используя специально разработанные методы отбора ауксотрофных мутантов у многоядерных и многоклеточных грибов, которые позволяют значительно повысить выход ауксотрофов (Tinline, 1960, 1961; Pара, 1969).

Ауксотрофные мутанты у *V.dahliae* были индуцированы при дозах УФ-лучей 7740 и 10320 эрг/мм. Выживаемость спор после облучения составляла 2% и 1%, соответственно. Полученные ауксо-

трофы были изолированы и идентифицированы. Для получения дополнительных мутаций ауксотрофности уже имеющиеся ауксотрофы были вновь подвергнуты УФ-облучению, в результате чего были получены множественно маркированные линии, несущие двойные мутации ауксотрофности и отличающиеся от штаммов дикого типа по цвету и структуре колоний (красные, розовые, серые). Частота появления ауксотрофных мутантов у *V.dahliae* под действием УФ-лучей равнялась 0.8-1.4% (Левитин, Коновалова, 1977). Спектр ауксотрофных мутантов, полученных при УФ-облучении, был довольно широким (аденин-, аргинин-, холин-, метионинзависимые). Статистическая обработка полученных результатов показала, что частота возникновения ауксотрофных мутантов у разных гаплоидных штаммов различается. Кроме ауксотрофных мутантов под действием УФ-лучей были получены морфологические мутанты с измененной структурой (морщинистые и дрожжеподобные) и окраской колоний (черные, оранжевые, розовые).

Получение маркированных штаммов грибов V.dahliae и D.teres с использованием химического мутагена ГАП.

Обработку мутагеном в концентрации 50 мг/л проводят на жидких питательных средах. Густота суспензии составляет при этом $5 \cdot 10^4$ спор/мл. Контролем служат посеvy на среду, не содержащую мутаген. Через 5-7 дней инкубации пробирок с посевами на поверхности жидкой среды вырастают пленки гриба, из которых готовят суспензии и засевают на чашки с ПП средой. На 7 день инкубации гриба производят подсчет выросших колоний и определяют выживаемость конидий под действием ГАП. Выросшие после обработки мутагеном колонии распечатывают спичками или бархатом на М и ПП средах. Имеющиеся ауксотрофы изолируют и идентифицируют.

Результаты исследований показали, что частота возникновения ауксотрофов у *V.dahliae* составляла 1.2 %. Всего было выделено 24 ауксотрофа. При идентификации мутантов был обнаружен широкий спектр пищевых потребностей (тиамин-, аденин-, аргинин-, валин-, холин, лейцин, метионинзависимые). Больше всего под действием ГАПа получено мутантов, зависимых от тиамина (16%). Частота аденинзависимых мутантов не превышала 10%, причем среди них не было ни одного, накапливающего красный пигмент. Морфологические пигментные мутанты выявлены не были. Ранее нами было показано, что частота появления ауксотрофных мутантов у *V.dahliae* под действием другого мутагена - УФ-лучей, равнялась 0.8-1.4% (Левитин, Коновалова, 1977). Однако сравнивать по частоте мутаций эффективность ГАПа и УФ-лучей нельзя, поскольку мутагенез проходил при разной выживаемости гриба. Спектр мутантов при обработке ГАПом был значительно шире спектра ауксотрофных мутан-

тов, индуцированных УФ-лучами. Связано это, вероятно, с высокой выживаемостью гриба при культивировании в растворе ГАПа.

У *D.terres* частота ауксотрофных мутантов была очень низкой (0.21%). Тем не менее были получены стабильные ауксотрофные мутанты с потребностью в метионине, лейцине и аргинине. Надо отметить, что первоначально было выделено около 65 различных ауксотрофов, что составляло 0.68%. Однако все они оказались нестабильными, что можно объяснить многоядерностью и многоклеточностью гриба. Вероятно, стабильные ауксотрофные мутанты можно получить в результате длительного отбора на селективных средах. В то же время с высокой частотой (до 50%) индуцировались морфологические мутанты, особенно, накапливающие красный пигмент. Такую высокую частоту образования красных морфологических мутантов можно объяснить либо их цитоплазматической природой, поскольку фенотипическое проявление ядерной мутации у многоядерных грибов крайне затруднено, либо повышенной мутабельностью гена, ответственного за синтез красного пигмента. Под действием ГАПа наряду с красными мутантами были обнаружены мутанты, различающиеся по скорости роста, спороношению, по форме, структуре и окраске колоний (белые, черные, коричневые, зеленые, желтые).

У пигментных мутантов при цитологическом изучении были обнаружены достоверные различия в размере конидий и количестве перегородок по сравнению с исходными дикими штаммами. Конидии мутантов оказались более крупными и септированными. Наблюдались также большие различия в строении мицелия. Например, у мутанта *red* мицелий имел многочисленные вздутия (бусообразная форма) и красный пигмент, тогда как у исходного штамма мицелий был без перетяжек и бесцветный. Изменение пигментации у мутанта *red* сопровождается изменением морфологии конидий, что позволяет предположить плейотропный эффект мутантного гена.

ГАП проявил себя малотоксичным по отношению к *D.terres* и *V.dahliae* (выживаемость грибов составляла 80% по отношению к контролю). При этом спектр ауксотрофных мутантов у *V.dahliae*, полученных с использованием ГАПа, был значительно шире, чем при использовании УФ-лучей, в связи с чем представляется перспективным использование ГАПа при индукции мутаций у фитопатогенных грибов.

Методы соматической гибридизации грибов

Наиболее общим методом гибридизации является метод генетической маркировки. Он применим и к гомо-, и к гетероталличным грибам, а также к тем, у которых слияние клеток происходит край-

не редко (Захаров, 1978). Суть метода генетической маркировки заключается в следующем. Одна родительская форма помечается какой-либо мутацией, например, потребностью в аденине, а другой родитель - потребностью в лизине. От первого родителя гибрид получит способность расти на среде без аденина, от другого родителя - способность к росту без лизина. При посеве его на минимальной среде вырастут только гибридные колонии. Образование гибридов у грибов осуществляется в результате слияния клеток, причем ядра их сливаются редко. В случае, когда ядра не сливаются, возникает клетка со смешанной цитоплазмой и с несколькими ядрами различного происхождения (гетерокарион). В генетическом отношении гетерокарионы имеют нечто общее с гетерозиготными диплоидами, возникшими от слияния генетически различных клеток. Благодаря сходству гетерокарионов и гетерозиготных диплоидов, доминирование признаков может изучаться и у тех грибов, у которых не известны диплоиды. У микроорганизмов, наряду с мейотическим, нередко отмечается расщепление при митотических делениях. При изучении мутаций с помощью скрещиваний удается также решить вопрос об аллельности мутаций, то есть являются ли они изменениями одного и того же гена. Появление в результате рекомбинации немутантной формы рассматривается как свидетельство неаллельности взятых в скрещивание мутаций.

В исследовательской работе гибридизацию применяют, когда хотят выяснить характер наследования того или иного признака - определяется ли он ядром или цитоплазмой, зависит от одного или нескольких генов. Расщепление в потомстве гибридов по четко наследуемым признакам (маркерам) анализируют, чтобы по его картине расшифровать структуру генетического аппарата клетки (Захаров, 1978).

Традиционные методы получения гетерокарионов. Гетерокарионы *V.dahliae* и *D.terres* получают двумя способами: методом "блоков", предложенным Пухалой и Мэйфилдом (Puhalla, Mayfield, 1973), и посевом перекрещивающимися штрихами.

Метод "блоков" состоит в том, что из активно растущих колоний каждого мутанта отсекают маленькие кусочки с мицелием гриба (2 мм²) и располагают их парами на М среде. Возникновение колонии в месте контакта 2-х ауксотрофных мутантов свидетельствует об образовании гетерокарионов.

Посев перекрещивающимися штрихами проводят следующим образом. На чашку с М средой высевают штрихом первый ауксотрофный штамм и перпендикулярно ему - штрих 2-го ауксотрофного штамма.

Для доказательства образования гетерокарионов можно использовать следующие способы:

1) Проверка штаммов на синтрофизм. а) На М среду рассеивают пгтрихами на близком расстоянии друг от друга исследуемые ауксотрофные штаммы. б) На III среду высевают один из ауксотрофных штаммов сплошным газонем, а спустя двое суток, когда газон подрастет, его поверхность заливают теплой минимальной средой, на которую высевают остальные ауксотрофные штаммы.

2) Рассев конидиальной суспензии гетерокариона на М среду. В этом случае будут расти только гетерокариотические споры, ибо ауксотрофные конидии без требуемых для их роста факторов на MM среде расти не могут.

3) Рассев конидиальной суспензии гетерокариона на III среду и учет расщепления. При рассеве конидиальной суспензии синтезированных гетерокарионов на полную среду наблюдают их расщепление на исходные родительские типы. Колонии, выросшие на полной среде, распечатывают бархатом или спичками на селективные среды. Подсчитывая количество колоний, выросших на М среде с добавками компонентов, в которых нуждаются исходные родительские штаммы, определяют соотношение ядер в гетерокариотическом мицелии. При анализе гетерокарионов, образованных пигментными мутантами, подсчитывают на полной среде количество различающихся по цвету колоний.

С использованием множественно маркированных линий получены гетерокарионы *V. dahliae*. Гетерокарионы были обнаружены только в двух комбинациях скрещиваний мутантов из 78 изученных, что дало основание предположить существование генетической системы несовместимости, контролирующей образование гетерокарионов. Было проведено расщепление гетерокарионов, одни из которых расщеплялись на исходные родительские формы в соотношении 1:1, а другие преимущественно выщепляли только один родительский тип. У гетерокариотичных форм *V. dahliae* были получены диплоиды. Установлена относительно высокая частота их возникновения ($5.9-8.6 \cdot 10^{-3}$). Они отличались от гаплоидов размерами спор и чувствительностью к УФ-лучам. Генетический анализ трех диплоидов показал их нестабильность и выщепление в потомстве гибридов исходных родительских форм и рекомбинантов. Была показана возможность индукции рекомбинации при использовании малых доз УФ-лучей (Коновалова и др., 1979).

Скрещивание штаммов гриба *D. teres* путем половой или соматической гибридизации хотя и возможно, но весьма затруднительно. Половой процесс осуществляется только при наличии штаммов разного типа спаривания, культивируемых в строго определенных условиях (Левитин, Шестопалов, 1976). При этом получение фертильных асков затягивается обычно на несколько месяцев.

С использованием морфологических и ауксотрофных мутантов

D.terres получены гетерокарионы методом слияния гиф. Показано существование у гриба вегетативной несовместимости (Коновалова и др., 1981). Соотношение компонентов при расщеплении гетерокарионов в большинстве случаев сдвигается в сторону одного родителя. Для преодоления вегетативной несовместимости применяют методы гибридизации, основанные на слиянии протопластов. Использование протопластов во многом может облегчить проведение гибридологических экспериментов с грибом *D.terres*. В результате разработки этого метода открывается возможность осуществить:

- гибридизацию гриба для анализа наследования признаков,
- гибридизацию гриба для конструирования штаммов с заданными свойствами,
- трансформацию генетического материала из одних штаммов в другие штаммы,
- межвидовую гибридизацию для уточнения таксономии видов.

В основе метода слияния протопластов *D.terres* лежит их способность агглютинироваться в растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ). В работе используют 30% ПЭГ с М.в. 3000 ед. Среду для слияния готовят на основе 0.4 М раствора KCl в 0.1% фосфатном буфере в присутствии ионов Ca^{++} . Смесь протопластов двух штаммов (по $1 \cdot 10^6$ прот./мл) отмывают от литического фермента в буфере последующим центрифугированием при $3 \cdot 10^3$ оборотах в течение 5 минут. Осадок ресуспензируют в 1 мл смеси для слияния протопластов и инкубируют 30 минут при комнатной температуре. Затем смесь протопластов переносят в среду для получения регенерантов, содержащую в качестве осмотического стабилизатора 0.8 М сахарозу. Для слияния протопластов используют штаммы, различающиеся по цвету колоний и ауксотрофности (Левитин и др., 1984).

Методом слияния протопластов получены гибриды между ауксотрофами гриба, включая комбинации штаммов, которые не скрещивались при слиянии гиф, что позволяет предположить значительно большие возможности метода слияния протопластов в преодолении барьеров вегетативной несовместимости *D.terres*. Частота образования гибридных клонов была достаточно низкой (0.002-0.25%), при этом частота появления внутриштаммовых гибридов была значительно выше, чем при скрещивании ауксотрофов, полученных из разных штаммов.

Гетерокариотичность природных изолятов многоядерных грибов, к которым относится *D.terres*, возникающая в результате мутаций в одном из ядер клетки и при слиянии гифов гриба, обуславливает нестабильность их свойств и является основным источником многообразия расового состава популяций фитопатогенных грибов.

Литература

- Захаров И.А. Курс генетики микроорганизмов. Мн. Вышэйная школа, 1978, 190 с.
- Захаров И.А, Ковальцова С.В., Кожина Т.Н., Федорова И.В., Яровой Б.Ф. Мутационный процесс у грибов. Л., 1980, 287 с.
- Захаров И.А, Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., 1984, 112 с.
- Коновалова Г.С., Левитин М.М., Ситаров Б.В. Гетерокариоз и парасексуальный процесс у возбудителя вилта хлопчатника - гриба *Verticillium dahliae* Kleb. /Генетика, 15, 1, 1979, с.89-95.
- Коновалова Г.С., Левитин М.М., Мироненко Н.В. Естественная и индуцированная изменчивость возбудителя сетчатой пятнистости ячменя. /Устойчивые к болезням сорта с.-х. растений в условиях концентрации и специализации производства. Л., 1981, с.56-63.
- Левитин М.М. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов. Л., 1986, 208 с.
- Левитин М.М., Федорова И.В. Генетика фитопатогенных грибов. Л., 1972, 215 с.
- Левитин М.М., Шестопалов С.В. Типы спаривания и гибридизация штаммов *Drehslera teres* (Helmintosporium). /Иммунитет с.-х. растений к болезням. Тр. ВИЗР, 49, Л., 1976, с.27-29.
- Левитин М.М., Коновалова Г.С. Мутационная и комбинативная изменчивость возбудителя вилта хлопчатника. /Тез. докл. 111 съезда ВОГиС им. Н.И.Вавилова, 1. Генетика и селекция растений. Л., 1977, с.262.
- Левитин М.М., Коновалова Г.С., Лебский В.К. Получение, регенерация и слияние протопластов *Drehslera teres* Ito. /Микология и фитопатология, 18, 4, 1984, с.276-280.
- Самойлова К.А. Действие ультрафиолетовой радиации на клетку. Л., Наука, 1967, 144 с.
- Ситаров Б.В., Шаджи Али Х., Хромов-Борисов Н.Н. Молекулярная природа мутаций, индуцированных у дрожжей аналогом оснований 6-гидроксиламинопурином (ГАП). /Тез. докл. 111 Всесоюзной конференции по генетической основе селекции промышленных микроорганизмов. Москва, 20-25 декабря, 1975, с.104.
- Holliday R. A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms. /Nature, 178, 4550, 1956, p.987.
- Lederberg J., Lederberg E. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. /J. Bacteriol., 63, 3, 1952, p.399-406.
- Papa K.E. Auxotrophic mutants of *Cochliobolus carbonum*. /Mycologia, 61, 4, 1969, p.799-807.
- Puhalla J.E., Mayfield J.E. The mechanism of heterokaryotic growth in *Verticillium dahliae*. /Genetics, 76, 1974, p.411-422.
- Roberts C.F. A replica plating technique for the isolation of nutritionally exacting mutants of a filamentous fungus (*Aspergillus nidulans*). /J. Gen. Microbiol., v.20, 3, 1959, p.540-548.
- Tinline R.D. *Cochliobolus sativus* 1Y. Drug-resistant color nutritionally exacting mutants. /Can. J. Bot., 39, 7, 1961, p.1695-1704.
- Tinline R.D., Stauffer J.F., Dickson J.G. *Cochliobolus sativus* 111. Effect of ultraviolet radiation. /Can. J. Bot., 38, 1960, p.275-282.
- Wood T.H., Mahajan S.K. A rapid and efficient replica plating technique. /Genet. Res., 15, 1970, p.335-338.

ЛАБОРАТОРНЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ЧАСТИЧНОЙ (РАСОНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ) УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ

А.А.Макаров, Д.А.Соломатин, Ю.А.Стрижекозин

Всероссийский НИИ фитопатологии, Москва

Селекция на иммунитет к вредоносным патогенам базируется на использовании различных типов устойчивости. Многолетняя практика показывает, что сорта пшеницы с вертикальной устойчивостью, которая проявляется в форме полного иммунитета, быстро теряют защитные свойства в связи с появлением и адаптацией на них новых, более вирулентных форм ржавчины. Поэтому в настоящее время все больше внимания уделяется сортам, обладающим так называемой частичной устойчивостью, которая выражается в замедленном развитии заболевания при восприимчивом типе реакции на внедрение паразита. Поскольку во многих случаях частичная устойчивость имеет расонеспецифический характер, она может сохраняться в течение значительно более длительного периода времени, чем расонеспецифическая устойчивость.

Выявление сортообразцов, обладающих частичной устойчивостью, представляет собой довольно сложную задачу. В полевых условиях необходимо получить сведения, подтверждающие замедленное развитие ржавчины. Затем нужно выявить сорта с вертикальным, то есть расонеспецифическим типом устойчивости, которые исключают из дальнейших исследований, и в лабораторных условиях выяснить причины замедленного развития болезни или факторы частичной устойчивости.

В отечественной и зарубежной литературе дана характеристика отдельных критериев, определяющих замедленное развитие бурой и стеблевой ржавчины пшеницы. К ним относятся: доля проявившихся пустул от количества нанесенных спор, продолжительность латентного периода, количество продуцируемых спор. Некоторые авторы предложили экспресс-методы определения уровня устойчивости по отдельным из этих критериев. Однако не была доказана количественная связь уровня выраженности этого типа устойчивости, определяемого в лабораторных опытах, с данными полевых испытаний, вследствие чего методы не нашли широкого применения в фитопатологической практике.

ЛАБОРАТОРНЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ЧАСТИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

В лабораторных условиях изучают факторы частичной устойчивости, характеризующиеся признаками замедленного поражения растений ржавчиной. Нами установлено, что наиболее высокий уро-

вень корреляции между степенью пораженности растений в поле и лабораторными данными отмечается при использовании показателя доли проявившихся пустул от количества нанесенных спор (ДПП), определяемого в фазу выхода в трубку ($r=0.83$) или колошения ($r=0.79$). Поэтому в лабораторных условиях рекомендуется использовать следующие показатели: доля проявившихся пустул в сочетании с типом реакции и продолжительность латентного периода.

Определение доли проявившихся пустул от количества нанесенных спор (ДПП)

В опыт обязательно включают восприимчивый сорт, который служит эталоном; в наших исследованиях эталоном был сорт Саратовская 29. Растения выращивают в сосудах в теплице или в камерах искусственного климата, по 10-15 шт. каждого сорта. Инокуляцию проводят в фазу выхода в трубку. За 2-3 дня до инокуляции удаляют все лишние побеги и нижние листья, оставляя только подлежащие заражению, то есть верхний лист при выходе в трубку и флаг-лист в фазу колошения.

Непосредственно перед инокуляцией определяют площадь листа по каждому сорту для расчета инфекционной нагрузки. Измеряют длину листа (L), ширину в нижней его трети (H) и рассчитывают площадь листа (S) по формуле $S = L \times H \times 0.65$, где 0.65 - коэффициент Шульгина, определяют общую площадь листьев ($S_{\text{общ}}$) и среднюю площадь одного листа ($S_{\text{ср}}$).

Инокулом готовят из смеси спор с ликоподием в отношении 1:500. Нагрузка спор определяется из расчета 50 шт. на 1 см^2 поверхности листа. В 1 мг содержится в среднем 300 тыс. спор. Следовательно, необходимое количество спор можно определить из соотношения:

$$A \times S_{\text{общ}} / C,$$

где A - нагрузка спор на 1 см^2 поверхности листа (50 спор), $S_{\text{общ}}$ - площадь всех листьев, подлежащих инокуляции, C - количество спор в 1 мг (300 тыс.)

Так как равномерно распределить и нанести на листья всю расчетную нагрузку сложно, рекомендуется в 1.5-2 раза увеличить нагрузку спор и, соответственно, ликоподия.

Перед инокуляцией споры тщательно смешивают с ликоподием и затем осторожно и равномерно вручную наносят на всю поверхность листа, после чего растения помещают на 18-20 часов во влажную камеру при $t = 22^\circ \text{C}$. Из влажной камеры сосуды с растениями переносят в теплицу или камеру искусственного климата с режимом: освещенность - 15-20 тыс. люкс, влажность - 70%, свето-

вой период - 16 часов, дневная температура - 22°C, ночная - 18°C.

Учет проводят в момент полного раскрытия пустул, что на восприимчивом сорте обычно происходит на 8-12 день после инокуляции.

Подсчитывают количество пустул на каждом листе, затем определяют сумму пустул со всех листьев данного сорта, проводят подсчет на 1 лист и по средней площади листа рассчитывают количество пустул на 1 см² поверхности листа. Расчеты проводят по формуле:

$$D = \Sigma A / B \times S_{\text{ср}},$$

где D - количество пустул на 1 см² поверхности листа, A - количество пустул на 1 лист, ΣA - количество пустул на всех листьях сорта, B - количество листьев испытываемого сорта, $S_{\text{ср}}$ - средняя площадь одного листа (см²).

В итоге определяют долю (процент) проявившихся пустул от количества нанесенных спор.

Определение продолжительности латентного периода и типа реакции растений

Продолжительность латентного периода целесообразно фиксировать в момент полного раскрытия большинства пустул гриба. Так как этот метод применяется ко всем испытываемым сортам, погрешность наблюдений сводится к минимуму. Следует учитывать, что продолжительность латентного периода у частично устойчивых сортов может быть на 2-14 дней больше, чем у восприимчивого сорта.

Одновременно подсчитывают количество пустул на листе и определяют тип реакции растений на внедрение патогена по шкале Майнса и Джексона. Таким образом по каждому сорту проводят только один учет.

Сорта с частичной устойчивостью должны иметь восприимчивый тип реакции (3-4 балла), и именно у образцов с этим типом реакции рассчитывают количество спор на единицу площади листа. Если у растений определяют устойчивый тип реакции (0, 1, 2 балла), это является признаком возрастной устойчивости, которая распецифична.

Классификация уровня частичной устойчивости

Для классификации уровня частичной устойчивости, определенной в камерных условиях, все показатели испытываемого сорта соотносятся с соответствующими показателями восприимчивого эталона. В связи с этим вводят комплексный показатель "индекс устойчи-

вости в камерных условиях" (ϕ), который рассчитывают по формуле:

$$\phi = \text{ДПП} \times \text{ТР} / \text{ЛП},$$

где ДПП - доля проявившихся пустул (%), ТР - тип реакции (балл), ЛП - латентный период (сутки).

Так как в опыте рассматриваются сорта только с восприимчивым типом реакции, этим показателем можно пренебречь, тогда:

$$\phi = \text{ДПП} / \text{ЛП},$$

Для определения уровня частичной устойчивости необходимо знать относительное значение индекса устойчивости (ϕ^*) к эталонному сорту:

$$\phi^* = \phi_{\text{сорта}} / \phi_{\text{эталон}}.$$

Классификация сортов по степени частичной устойчивости к ржавчине представлена в таблице.

Таблица. Классификация сортов по степени частичной устойчивости к ржавчине

Степень устойчивости сорта	Относительный показатель, ϕ^*
Устойчивость расоспецифическая	0 - 0.1
Высокая частичная устойчивость	0.11 - 0.4
Умеренная частичная устойчивость	0.41 - 0.7
Слабая частичная устойчивость	0.71 - 0.9
Восприимчивый	> 0.9

Пример расчета данных лабораторного опыта

Приведем пример расчета показателей лабораторного опыта для двух сортов: восприимчивого эталона и неизвестного по устойчивости сорта (к). В опыте находились по 10 растений каждого сорта. В процессе работы определили:

- общая площадь листьев эталона $S_{\text{общ}}$ - 142.9 см²,
- средняя площадь одного листа эталона $S_{\text{ср}}$ - 14.3 см²,
- общая площадь листьев k-сорта $S_{\text{общ}}$ - 175 см²,
- средняя площадь одного листа k-сорта $S_{\text{ср}}$ - 17.5 см²,
- общая площадь листьев, подлежащих инокуляции 142.9+175 ≈ 318 см²,

- расчетная нагрузка спор составляет: $50 \times 318 / 300000 = 0.05$ мг,
- увеличиваем расчетное количество спор и наполнителя и при составлении инокулюма используем 0.08 мг спор и 40 мг ликоподия. По остатку инокулюма после заражения установлено, что реальная нагрузка составила 60 спор на 1 см^2 поверхности листа;
- полное раскрытие пустул у сорта-эталона зафиксировано на 12-й день (ЛП = 12), тип реакции 4 балла;
- общее количество пустул на листьях эталона - 15376, среднее количество пустул на 1 лист 153.8; количество пустул на 1 см^2 поверхности листа $153.8 / 14.3 = 10.8$ пустул. Доля проявившихся пустул от количества нанесенных спор (60 спор) составляет 17.9% (ДПП = 17.9);
- продолжительность латентного периода у к-сорта составила 16 дней, тип реакции 4 балла, среднее количество пустул на 1 лист - 94.7, на 1 см^2 - 5.4, доля проявившихся пустул от количества нанесенных спор составляет 9.0 % (ДПП = 9.0).

Индекс устойчивости в камерных условиях для сорта-эталона равен:

$$\Phi_{\text{эталон}} = \text{ДПП} \times \text{ТР} / \text{ЛП} = 17.9 \times 4 / 12 = 6.0,$$

для к-сорта:

$$\Phi_{\text{к}} = \text{ДПП}_{\text{к}} \times \text{ТР}_{\text{к}} / \text{ЛП}_{\text{к}} = 9 \times 4 / 16 = 2.25,$$

Относительное значение Φ^* для к-сорта равно:

$$\Phi^* = \Phi_{\text{к}} / \Phi_{\text{эталон}} = 2.25 / 6.0 = 0.38.$$

Согласно данным таблицы, к-сорт обладает высокой степенью частичной устойчивости к патогену.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНВЕРГЕНТНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ ПРИ СОЗДАНИИ ДОНОРОВ ГОРИЗОНТАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ К ФИТОФТОРОЗУ

В.А. Колобаев

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Появление А-2 типа совместимости гриба *Phytophthora infestans* и связанное с ним превалирование сложновирulentных рас сводит на нет защитный эффект R-генов расоспецифического иммунитета и делает необходимым ориентировать селекцию картофеля на создание сортов с высокой горизонтальной устойчивостью, эффективной против всех рас патогена. Решению такой задачи способствует использование доноров горизонтальной устойчивости, полученных в результате интрагрессии в культурный картофель генов устойчивости от дикорастущих сородичей. Высокая горизонтальная устойчивость к фитофторозу свойственна ряду видов *Solanum*, ее проявляют и некоторые южноамериканские виды, эволюционировавшие в первичном генцентре картофеля при отсутствии патогена (Жуковский, 1971; Будин, 1982; Зотева, 1986).

Создание доноров горизонтальной устойчивости к фитофторозу включает 2 этапа работы:

- получение высокоустойчивых гибридов от скрещиваний культурных сортов с несколькими видами *Solanum* по отдельности,
- конвергентные скрещивания между гибридами, унаследовавшими горизонтальную устойчивость от различных видов *Solanum*.

В ВИРе Н.А. Житловой были проведены скрещивания 9-ти видов *Solanum* с культурными сортами картофеля. Подвергая искусственному заражению потомства от самоопыления этих гибридов, мы выделили растения, практически не поражаемые фитофторозом.

Хорошими источниками горизонтальной устойчивости показали себя *S. simplicifolium*, *S. polytrichon* и *S. verrucosum*. Устойчивые к фитофторозу гибриды получили и от скрещиваний с *S. pinnatisectum*, *S. megistacrolobum*, *S. gourlayi*. Менее успешным оказалось использование в скрещиваниях *S. berthaultii*, *S. vernei* и *S. stoloniferum*. На втором этапе работы устойчивые гибриды, полученные от скрещиваний с *S. polytrichon*, скрестили с гибридами, унаследовавшими горизонтальную устойчивость от *S. simplicifolium* и от *S. verrucosum*.

Гибриды с горизонтальным типом устойчивости выявляли инокуляцией семян в фазе рассады (Колобаев, Патрикеева, 1985), используя синтетическую популяцию патогена, содержащую сложновирulentные расы (1.2.3.4, 5.6.7.8, хуз). Сеянцы в фазе 2-3 листьев опрыскивали суспензией конидий гриба *Ph. infestans*, выращенного на ломтиках клубней восприимчивого сорта картофеля. Инокулиро-

ванные таким способом сеянцы помещали во влажную камеру на сутки. Признаки сильного поражения сеянцев фитофторозом начинают проявляться на 5-6 день. Их число может увеличиваться в течение 2-х недель. Сильно пораженным следует считать не только погибшие растения, но и с отмиранием верхней почки. Такие растения по мере их выявления удаляют и подсчитывают, чтобы иметь представление об общем уровне устойчивости гибридной популяции. Сеянцы, сохранившиеся здоровыми, высаживали в поле, где еженедельно проводили учет поражения их фитофторозом.

При использовании для инокуляции сложновирулентных рас гриба устранялся защитный эффект всех известных R-генов, и непоражаемость сеянцев обеспечивалась лишь их горизонтальной устойчивостью. Дифференцировка сеянцев по уровню устойчивости проявлялась при инфекционной нагрузке, создаваемой опрыскиванием их суспензией, содержащей 20 конидий в поле зрения микроскопа: восприимчивые растения сильно поражались фитофторозом, здоровыми сохранялись сеянцы с высокой горизонтальной устойчивостью. Большинство из них выдерживало повторную инокуляцию суспензией, содержащей 50 конидий в поле зрения микроскопа. Сеянцы, выдержавшие испытание при искусственном заражении, после высадки в поле проявляли высокую устойчивость к природному поражению фитофторозом, имея лишь единичные некротические пятна на нижних листьях. Во многих гибридных популяциях, полученных от скрещиваний с устойчивыми образцами *S. simplicifolium*, *S. verrucosum* и *S. polytrichon*, почти все сеянцы, сохранившиеся здоровыми после инокуляции, имели высокую полевую устойчивость к фитофторозу.

Унаследованная в гибридах от дикорастущих видов сильно выраженная горизонтальная устойчивость передавалась и при последующих беккроссах с культурными сортами, проявляясь у многих растений в поколениях $B_2 F_2$. Тем самым продемонстрирована возможность поддержания в гибридных поколениях высокой горизонтальной устойчивости, равноценной по эффективности с использованными источниками устойчивости, в ходе 3-х туров скрещиваний с культурными сортами и отборов по этому показателю на всех этапах работы.

Используя подвергнутые жесткому отбору по устойчивости сеянцы, мы получили клоны, которые на протяжении 3-х лет практически не страдали от фитофтороза. На фоне эпифитотийного развития болезни, когда у районированных и перспективных сортов картофеля ботва была полностью убита фитофторозом, ни один из 48 выделенных клонов не имел сильного поражения, сохранив зеленую листву до конца сентября. Для последующих конвергентных скрещиваний отобрали наиболее устойчивые клоны, имевшие также хорошую продуктивность и товарные качества клубней. При оценке их потомств от самоопыления было отмечено преобладание сеянцев, не

поражаемых при искусственном заражении, что можно расценивать как показатель их хороших донорских способностей по признаку устойчивости к фитофторозу. Все это указывает на то, что выделенные образцы являются носителями богатого набора генов устойчивости, показавших хорошую наследуемость в скрещиваниях с культурными сортами и сочетаемость с показателями продуктивности. Скрещиваниями между ними были получены сложные межвидовые гибриды с еще более высоким уровнем устойчивости и лучшими донорскими способностями.

В гибридных популяциях от таких конвергентных скрещиваний отмечалось расщепление по ряду признаков, но доминирующим показателем у большинства гибридов была высокая устойчивость к фитофторозу. Некоторые гибриды превосходили по этому показателю своих родителей. В этом проявился эффект трансгрессии, характерный для признаков полигенной природы, чему способствовала рекомбинация генов устойчивости различного видового происхождения, то есть унаследованных в ходе предшествовавших скрещиваний от различных видов *Solanum*. Наиболее эффективным было скрещивание, при котором достигалось комбинирование генов устойчивости от 2-х видов, сформировавшихся в различных генцентрах картофеля. Так, скрестив [(*S.polytrichon* × Гатчинский) × *Umbra*] × *Fausta* с [(*S.simplicifolium* × MPI 50-140/5) × *Gitte*] × *Gera*, получили гибриды, проявившие еще более высокую устойчивость, чем их родители. При оценке методом дозированной инфекции половина испытанных растений вообще не заразилась при инфекционной дозе (40 конидий в поле зрения микроскопа), способной заразить каждого из их родителей. Количество устойчивых сеянцев в популяции F_1 от такого скрещивания было выше, чем в потомствах от самоопыления (B_2 F_3) их родителей, составив 85.3 % в сравнении с 40.5% и 64.3% в потомствах от самоопыления их родительских форм (табл.).

С практической точки зрения особенно ценно, что многие из этих гибридов проявили хорошие донорские способности по признаку устойчивости. В потомствах от их самоопыления выход устойчивых сеянцев варьировал по отдельным семьям от 40% до 90%, составив в среднем по поколению F_2 71.8%. Хорошие результаты дало также конвергентное скрещивание между гибридом *S.polytrichon* и гибридом *S.verrucosum*.

Полученные от конвергентных скрещиваний высокоустойчивые к фитофторозу гибриды по своим донорским способностям значительно превосходили традиционно используемые в селекции родительские формы, даже сорта, сравнительно устойчивые к фитофторозу. Для сравнения: в потомстве от самоопыления сорта Петербургский при той же технике инокуляции сохранилось лишь 5% здоровых растений, в потомстве известного по устойчивости сорта Атчим ба выявилось не более 28% устойчивых сеянцев.

Таблица. Результаты оценки гибридных семян
на горизонтальную устойчивость к фитофторозу
при искусственном заражении сложновирulentной расой патогена

Происхождение семян	По- коле- ние	Число испы- танных сеян- цев	Устой- чивые, %
Гибриды от конвергентных скрещиваний :			
[(<i>S.polytrichon</i> × Гатчинский) × Umbra] × Fausta B ₂ F ₂			
×	F ₁	61	85.3
[(<i>S.simplicifolium</i> × MPI50-140/5) × Gitta] × Gera B ₂ F ₂			
То же	F ₂	312	71.8
(<i>S.polytrichon</i> × MPI 50-140/5) × MPI 50-140/5 B ₁ F ₂			
×	F ₁	87	71.3
(<i>S.verrucosum</i> × MPI 50-140/5) × Licarna B ₁ F ₂			
То же	F ₂	150	60.0
----- Самоопыление родительских форм, полученных с использованием:			
<i>S.polytrichon</i>	B ₂ F ₃	84	64.3
То же	B ₁ F ₃	121	65.2
<i>S.simplicifolium</i>	B ₂ F ₃	158	40.5
<i>S.verrucosum</i>	B ₁ F ₃	174	79.3

Созданные конвергентными скрещиваниями доноры горизонтальной устойчивости переданы в СЗНИИСХ. Применение их в селекционной работе позволит включить в создаваемые сорта картофеля неиспользованный ранее резерв устойчивости к фитофторозу, имеющий новую генетическую основу.

Полученные результаты показали, что с помощью конвергентных скрещиваний можно получать сложные межвидовые гибриды картофеля с обогащенной наследственностью в отношении такого полигенного признака, как горизонтальная устойчивость к фитофторозу, сочетающие в себе гены устойчивости различного видового происхождения. Среди таких гибридов можно выявить образцы с исключительно высокими донорскими способностями по признаку устойчивости к фитофторозу, проводя испытание при искусственном заражении их потомств от самоопыления.

Литература

Будин К.З. Эволюция и филогения видов секции *Tuberatium* (Dun) Buk. рода *Solanum* L. /Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции, 73, 2, 1982, с.3-14.

Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. Л., 1971, 751 с.

Зогеева Н.М. Выделение источников устойчивости к *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary среди дикорастущих и культурных видов картофеля. Автореф. канд. дис. Л., 1986, 16 с.

Колобаев В.А., Патрикеева М.В. Методические указания по отбору семян картофеля, устойчивых к вирусу Y и фитофторозу. Л., 1985, 12 с.

МЕТОДИКА ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКИ ЛЮПИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТРАКНОЗУ

А.С.Якушева, А.И.Самошкина

Всероссийский НИИ люпина, Брянск

Люпин относится к числу ценных высокобелковых культур, используемых на зеленый корм и силос, в качестве зернофуражной культуры и как сидерат. По содержанию протеина в зерне с люпином может конкурировать только соя. В отличие от сои люпин дает хорошие урожаи при возделывании его на малоплодородных кислых почвах и при этом обогащает их органическим веществом и биологическим азотом, повышая плодородие для последующих культур (Такунов, 1997).

Несмотря на высокую значимость люпина, расширение посевных площадей его сдерживается распространением ряда болезней, среди которых наиболее опасное - антракноз, нередко приводящий к полной гибели урожая (Peredo, Valenzuela, 1988; Агаев, 1991, 1993; Корнейчук, 1991; Пугачев, 1994).

До 1988 г. это заболевание не отмечалось на территории бывшего СССР и не было проблемой для дальнего зарубежья. Стремительное распространение антракноза в России является следствием, прежде всего, отсутствия мер борьбы с ним и устойчивых сортов.

Общие сведения о болезни

Возбудитель антракноза определен как несовершенный гриб *r. Colletotrichum*, но единого мнения о его таксономической принадлежности среди ведущих микологов не существует. Заболевание в Нечерноземной зоне развивается ежегодно, но наиболее сильному его развитию способствуют осадки и теплая погода (относительная влажность воздуха выше 75%, среднесуточная температура 18-22°C).

Антракнозом поражаются все культивируемые виды люпина, но наиболее сильно желтый и белый. При этом у данных видов наблюдается идентичное развитие симптомов на всех стадиях онтогенеза. Болезнь развивается на всех частях растения - проростках, листьях, черешках, стеблях, бобах и семенах.

Заболевание передается семенами, при этом зараженность их зависит от сортовых особенностей и на какой стадии развития растений произошло заражение. Наиболее высокая степень заражения семян наблюдается у желтого люпина - до 48% (сорта Брянский 6, Брянский-27). Передача возбудителя через семена - важный фактор, так как уже на ранних этапах развития растений (фаза всходов) среди поля появляются беспорядочно разбросанные очаги инфекции, от которых идет дальнейшее заражение здоровых растений.

Первые признаки антракноза наблюдаются на семядолях или

корневой шейке. На семядолях развиваются четко ограниченные округлые некротические пятна различного размера (от 1 мм в диаметре и выше). В центре пятен образуются ярко-оранжевые подушечки спороношения гриба, впоследствии они сливаются, распространяясь по всей семядольной пластинке, что приводит к ее отмиранию. При этом наблюдается увядание разворачивающихся настоящих листьев с последующим отмиранием точки роста, это вызывает развитие многочисленных боковых побегов, отчего растение приобретает форму куста.

В случае поражения корневой шейки образуется продольная некротическая язва оранжевого цвета размером от 0,5 до 1,5 см в длину, что приводит к гибели всходов.

На черешках листьев и стеблях болезнь проявляется в фазе стеблевания. Вначале появляются серо-водянистые пятна или продолговатые некротические полосы, на месте которых позже образуются язвы буро-оранжевого цвета, с обильным спороношением. Проявление язв, как правило, сопровождается искривлением черешка или стебля с последующим их изломом.

На некоторых сортах желтого и белого люпина антракноз проявляется на листьях в виде краевых некротических пятен с оранжевым центром без спороношения и бурым окаймлением. Центральная жилка пластинки сложнопальчатого листа некротизирована и серповидно изогнута. Впоследствии лист полностью увядает и отмирает.

Проявление симптомов заболевания на бобах связано с поражением центрального стебля. Если у растений наблюдается поражение центрального стебля в фазе стеблевания, то происходит, как правило, полное опадение цветочной завязи или завязывание нескольких недоразвитых бобов, которые впоследствии засыхают. В случае, когда зараженный центральный стебель остается без видимых признаков поражения (некротических полос или язв) или с незначительной до 1,5 см в длину язвой, то на бобах образуются округлые различного размера (от 0,1 мм в диаметре и более) пятна темно-бурого цвета, которые позже превращаются в язвы, покрытые обильным оранжевым спороношением гриба. При сильном поражении бобов семена люпина становятся щуплыми, с бурыми пятнами, часто в виде язв с оранжевым спороношением. При слабом развитии антракноза на растении большие семена визуально не отличаются от здоровых.

Поражение антракнозом узколистного люпина как в естественных условиях, так и при искусственном заражении наблюдалось в основном в фазе становления проростка и образования бобов, тогда как в фазе стеблевания отмечены лишь единичные случаи поражения черешков или стебля. На стадии бутонизации и цветения узколистного люпина не наблюдалось признаков поражения растений антракнозом. Следует отметить, что симптомы антракноза на бобах узколистного люпина не отличаются от проявления на желтом и белом, тогда как в фазе становления проростка на стебле образуется серо-водянистая кольцевая перетяжка, которая приводит к гибели

растения.

Одним из важнейших этапов в целенаправленной селекции на устойчивость к болезням является оценка исходного материала по этому признаку, успех которой зависит от правильного выбора метода. Методика изучения устойчивости люпина к антракнозу, предложенная Р.Н. Агаевым (1991), не нашла своего применения из-за низкой эффективности результатов заражения растений с помощью пульверизатора.

До настоящего времени оценка устойчивости люпина к антракнозу сводилась к эпизодическим наблюдениям за проявлением болезни в полевых условиях (Кирик, Безнощенко, 1993).

Наиболее объективно оценить сортообразцы можно в полевых условиях в годы эпифитотийного развития болезни. Однако при недостаточном ее развитии (отсутствии благоприятных условий) следует использовать методы, основанные на искусственном заражении растений.

Нами предлагается методика оценки селекционного материала люпина на устойчивость к антракнозу, апробированная и применяемая в настоящее время в селекционном центре Всероссийского НИИ люпина, в основу которой положена реакция проростков на искусственное заражение семян люпина суспензией возбудителя антракноза. Данная методика позволяет независимо от погодных условий выявить сильно-, средне- и слабовосприимчивые к антракнозу образцы, сократить объемы и площади полевых испытаний и ускорить селекционный процесс на болезнеустойчивость.

Результаты лабораторной оценки положительно коррелируют с устойчивостью растений в фазе поспевающего боба в полевых условиях.

При оценке устойчивости исходного и гибридного материала используется природная популяция возбудителя антракноза, собранная из различных областей возделывания люпина (Брянской, Смоленской, Владимирской, Псковской, Черниговской).

Оценка на устойчивость к антракнозу состоит из трех этапов.

а) Выделение возбудителя в чистую культуру, размножение его на питательной среде и приготовление рабочего инокулюма.

Возбудитель выделяется из пораженных стеблей, створок бобов или семян. Кусочки (около 1 см) пораженных тканей поверхностно стерилизуют в пламени спиртовки, переносят во влажные камеры, которыми служат чашки Петри, выстланные стерильной фильтровальной бумагой и увлажненные стерильной водой. Последние ставят в термостат с температурой +22°C. Пораженные семена дезинфицируют в чистом спирте в течение 2 минут, промывают стерилизованной водой, закладывают во влажные камеры и помещают в термостат. Спустя трое суток около субстрата образуется обильное светло-розовое спороношение возбудителя. Конидии одноклеточные, бесцветные, цилиндрические, прямые, иногда слегка изогнутые, с закругленными концами. Размер конидий 3,8-7,5 × 6,1-22,5 мкм.

С помощью платиновой иглы налет конидий переносят на ага-

ризованную картофеле-глюкозную среду и выращивают при температуре +22-23°C. При этих условиях в течение двух недель гриб полностью покрывает поверхность чашки Петри, на мицелии образуется множество конидий, которые используются для приготовления инфекционного инокулюма. Для инокуляции семян белого и желтого люпина используется 2-недельная культура, а для узколистного - не менее, чем 3-недельная культура.

При составлении смешанной инфекции вначале готовят суспензии (в стерильной дистиллированной воде) отдельных изолятов природной популяции возбудителя, каждый из которых фильтруют через 2 слоя марли и доводят до концентрации $2 \cdot 10^5$ спор/мл (60-70 штук в поле зрения микроскопа при 125-кратном увеличении). После этого изоляты тщательно смешивают в равных количествах. Готовый инокулюм сразу же используют.

б) *Подготовка и заражение семян.* Семена испытуемых селекционных образцов (не менее 30 штук) стерилизуют в 96% спирте в течение 3 минут, после чего тщательно 3-кратно промывают в дистиллированной воде, а затем помещают в инокулюм так, чтобы полностью были им покрыты. Расход инокулюма 5 мл на 30 штук семян. Время выдерживания семян в инокулюме - 1,5 минуты, после чего инокулюм сливают, а семена закладывают в бумажно-полиэтиленовые рулоны.

Рулоны готовятся следующим образом. На полосу полиэтиленовой пленки (простерилизованной 96% спиртом) размером 110×16 см накладываете такого же размера полоска фильтровальной бумаги, предварительно простерилизованной в сушильном шкафу в течение 2-х часов при температуре 100°C. Фильтровальная бумага увлажняется (из распылителя) стерильной водой и на ней, отступая от верхнего края 3 см, раскладывают пинцетом инокулированные семена с интервалом в ряду 3 см. Сверху семена прикрывают двойной полоской увлажненной фильтровальной бумаги (предварительно простерилизованной) шириной 6 см, совмещая верхний край с пленкой. Затем полиэтиленовая и бумажная полосы с семенами свободно (без нажима) сворачивается в рулон, который устанавливается (край ближе к семенам должен быть вверху) в стерильный сосуд (растительный) с дистиллированной водой слоем в 2-3 см. Сосуды с рулонами помещаются в термостат с постоянной температурой 23°C.

Спустя 4 дня сосуды с рулонами вынимают из термостата и помещают на стеллажи под люминесцентные лампы, где выдерживают при температуре 18-20°C: семена желтого люпина - 6 дней, узколистного - 4 дня.

В течение всего периода выдерживания рулонов в термостате и на стеллажах нужно следить за слоем воды в 2-3 см в сосудах.

в) *Учет и оценка поражения.* По истечении указанных выше сроков проводится учет развития болезни на проростках, для чего разворачиваются рулоны с проростками, каждый из них осматривается и определяется степень поражения его антракнозом по 5-балльной шкале:

- 0 - поражение отсутствует,
 1 - на проростке светло-коричневые в виде штрихов некрозы,
 2 - на проростке а) язва без разрыва, охватывающая до $1/2$ окружности проростка, б) на семязоле маслянистое пятно, впоследствии оно приобретает коричневую окраску или в) увядание развивающихся настоящих листьев;
 3 - на проростке язва с разрывом, охватывающая $2/3$ окружности проростка,
 4 - на проростке а) язва охватывает всю окружность проростка, б) мацерация проростка или в) гибель проростка.

Интенсивность развитие болезни в % (R) определяется по формуле:

$$R = \Sigma 100(a \times b) / N \times K,$$

где $\Sigma(a \times b)$ - сумма произведений числа растений на соответствующий им балл поражения; N - общее количество учетных растений; K - наивысший балл шкалы учета.

В зависимости от балла поражения и вычисленной на его основе интенсивности развития болезни согласно унифицированному классификатору СЭВ сортообразцы подразделяются по устойчивости люпина к антракнозу на следующие группы:

Развитие болезни, %	Степень устойчивости	Группа
до 10	очень высокая	I
10 - 30	высокая	II
31 - 50	средняя	III
51 - 75	низкая	IV
76 - 100	очень низкая	V

Литература

Агаев Р.Н. Методика изучения устойчивости люпина к антракнозу. IX Всесоюз. совещ. по иммунитету растений к болезням и вредителям. Тез. докл., 2. Минск, 1991, с.224.

Агаев Р.Н. Опасное заболевание люпина. /Защита растений, 8, 1993, с.40-41.

Кирик Н.Н., Безноценко В.П. Об оценке устойчивости сортов люпина к антракнозу. /Селекция и семеноводство, 3, 1993, с.21.

Корнейчук Н.С. Методические аспекты оценки однолетних люпинов на устойчивость к фузариозу и антракнозу. /Тез. докл. IX Всесоюз. совещ. по иммунитету растений к болезням и вредителям, 2. Минск, 1991, с.222.

Путачев П.М. Разработка методов инокуляции желтого люпина при оценке на устойчивость к антракнозу. /Сб. научн. тр. "Биология продуктивности с.-х. культур". Горки, 1994, с.20-24.

Такунов И.П. Агробиологический потенциал люпина. /Тез. докл. меж-регион. научно-практ. конференции "Биологический и экономический потенциал люпина и пути его реализации". Брянск, 1997, с.3-6.

Peredo H., Valenzuela F. New records of pathogenis fungi in forest plants in Chile. /Boletín Micologiso, 3, 4, 1988. (Цит. по: Review Plant Pathology, 69, II, 1990).

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЛЮПИНА К АНТРАКНОЗУ

О.В.Кунгурцева

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

В последние годы на посевах люпина получило широкое распространение новое для районов России и стран СНГ грибное заболевание - антракноз. Оно нередко является причиной полной гибели люпинов в ряде районов нашей страны. Наиболее сильно подвержены заболеванию желтый и белый люпины.

Признаки антракноза сначала наблюдаются на всходах в виде буроватых мелких пятен на семядолях и подсемядольной части стебля, а затем на взрослых растениях: на стеблях, соцветиях, бобах и семенах. Поражение листьев в естественных условиях наблюдается редко и зачастую мало заметно. Заболевание приурочено к развитию в фазы бутонизации, цветения и плодообразования. В этот период растение обладает наибольшей восприимчивостью к болезни. Поражение стеблей, черешков листьев, цветоносов, бобов обусловлено образованием на них мелких буроватых округлых пятнышек или штрихов, позднее сливающихся между собой и образующих язвы. Пораженные стебли, цветоносы, черешки листьев изгибаются, отстают в росте и развитии, нередко приобретают уродливую форму. При сильном поражении бобов язвы пронизывают всю толщину створок бобов, происходит интенсивное разрушение тканей и заражение семян. Поверхность язв покрывается многочисленными розовато-оранжевыми подушечками гриба.

В связи с высокой вредностью болезни и массовой поражаемостью всех районированных и перспективных сортов возникает необходимость в выявлении иммунологического потенциала образцов люпина мировой коллекции ВИРа в целях ускорения селекции на устойчивость к антракнозу.

Недостатком полевой оценки на устойчивость люпина к заболеванию является то, что для этого требуется создание инфекционного фона, проведение наблюдений в течение целого вегетационного периода и большие затраты посевного материала. Нами предложен метод ускоренной оценки для выявления источников устойчивости к антракнозу, позволяющий проводить оценку в осенне-зимний период в лабораторных условиях.

В основу метода положена высокая чувствительность проростков люпина к заражению антракнозом. Суть метода заключается в проращивании семян люпина различных сортов в суспензии конидий патогена. С этой целью патогенные изоляты возбудителя культивируются на картофельно-глюкозном агаре в чашках Петри. Через 15-20 суток с поверхности агаризованной среды образовавшиеся

многочисленные оранжево-розовые подушечки - конидиальное спороношение гриба - осторожно снимают шпателем и переносят в колбы со стерильной водой. Концентрацию конидий контролируют с помощью камеры Горяева. Оптимальная концентрация суспензии конидий, используемой для инокуляции, должна составлять минимум 10^5 спор в 1 мл.

Для получения большого количества инфекционного материала можно использовать инокулом гриба, выращенный в чистой культуре на стерилизованном жидком отваре из семян люпина. Возбудитель болезни обладает огромным потенциалом размножения и на жидких средах образует большое количество спор. Гриб культивируют в колбах Эрленмейера на отваре из семян люпина (10 шт./100 мл воды) в течение 15-20 суток, затем производят промывку мицелия, при которой освобождается большое количество спор.

Приготовленную суспензию конидий гриба необходимой концентрации в объеме 20 мл заливают в стерильные чашки Петри со стерильной фильтровальной бумагой и затем помещают в каждую чашку по 10 штук семян люпина различных образцов и сортов. Предварительно семена стерилизуют в 0.5% растворе гипохлорита натрия с экспозицией 5 минут. После этого их промывают 2-3 раза стерильной водой и просушивают стерильной фильтровальной бумагой. Чашки с замоченными семенами помещают в термостат при температуре 20-24°C. Контролем служат семена, проращиваемые в стерильной воде. Оценку сортов на устойчивость к болезни проводят через 5-7 суток после инокуляции.

Для ускоренной оценки сортов люпина на устойчивость к антракнозу нами модифицирован метод проращивания семян в рулонах фильтровальной бумаги, предложенный А.С.Якушевой. В отличие от метода А.С.Якушевой, где в рулоны помещаются инфицированные семена, в нашем случае искусственно заражаются 5-7-дневные проростки люпина, выращенные в бумажно-полиэтиленовых рулонах. Инокуляция производится опрыскиванием растений суспензией плотностью 10^9 спор/мл. Учет развития болезни на проростках проводят на 8-12 сутки по 5-балльной шкале Р.Н.Агаева (1993), усовершенствованной А.С.Якушевой (1997).

Литература

Агаев Р.Н. Опасное заболевание люпина. //Защита растений, 8, 1993, с.40.

Якушева А.С. Разработка лабораторного экспресс-метода оценки люпина на устойчивость к антракнозу. Биологический и экономический потенциал люпина и пути его реализации. //Тезисы докл. Межрегион. научно-практич. конференции. ВНИИ люпина, Брянск, 1997, с.60-63.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ОЦЕНКЕ РАСОНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
РИСА К ВОЗБУДИТЕЛЮ ПИРИКУЛЯРИОЗА
(*PYRICULARIA GRISEA*)

А.А.Макаров, Е.Д.Коваленко, Ж.Г.Наскидашвили, Ю.В.Горбунова,
Д.Э.Ногайдели, Т.М.Коломиец, Н.А.Чернова

Всероссийский НИИ фитопатологии, Москва

В современной селекции риса на иммунитет к пирикуляриозу, опасному заболеванию этой культуры, наиболее перспективным направлением является создание сортов с длительной устойчивостью. Быстрая потеря расоспецифической устойчивости риса к возбудителю привела исследователей к изучению других типов устойчивости. Мировой опыт селекции на иммунитет показал, что более надежную, продолжительную защиту от болезни может обеспечить расоспецифическая, горизонтальная устойчивость. В последние годы исследователи применяют термины "частичная" и "неполная" устойчивость. Нередко ученые вкладывают неодинаковый смысл в эти понятия, противоречивость мнений касается в основном специфики взаимодействия хозяина-патоген. Общим и основным моментом для сортов с указанным типом устойчивости является замедленное развитие болезни в полевых условиях, обусловленное разными механизмами резистентности, действующими на разных этапах патогенеза. По мнению большинства исследователей, основными компонентами расоспецифической устойчивости риса к пирикуляриозу являются: небольшое количество инфекционных пятен, их низкая спорулирующая способность и удлиненный инкубационный период (Villarial, Nelson, 1981). Существует много методов оценки расоспецифической устойчивости в условиях теплицы и инфекционных питомников.

Основная трудность идентификации сортов с расоспецифической устойчивостью заключается в том, что её трудно отличить от расоспецифической. Большинство сортов сочетают разные типы устойчивости. Для определения расоспецифической устойчивости, исключаяющей маскирующее действие расоспецифической, необходимо использовать расу с генами вирулентности, комплементарными генам устойчивости испытываемых сортов (Ezuka, 1979). Таким образом, нельзя объективно оценить расоспецифическую устойчивость сорта без знания его генотипа. Кроме того, оценка сортов к даже самой вирулентной расе не позволяет выявить природу устойчивости, являющейся результатом разнообразных и сложных взаимоотношений хозяина и патогена.

Учитывая это обстоятельство, в основу предлагаемой методики было положено предварительное генотипирование испытываемых

сортов с последующей их оценкой к большому разнообразию рас патогена с комплементарными генами вирулентности. Методика предназначена для отбора исходного материала в селекции на иммунитет к пирикулярриозу.

СОЗДАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ФОНОВ

Подбор рас для изучения расонеспецифической устойчивости

При создании инфекционных фондов для оценки и отбора сортообразцов риса с расонеспецифической устойчивостью необходимо учитывать следующие факторы:

- генофонд вирулентности популяций каждой эколого-географической зоны страны,
- гены устойчивости испытываемых сортов,
- место расположения питомника.

Основным условием при подборе рас является их генотип вирулентности. Они должны содержать гены вирулентности, комплементарные соответствующим генам устойчивости в испытываемых сортах. Для оценки расонеспецифической устойчивости районированных и перспективных сортов, характеризующихся, как правило, неэффективными генами устойчивости (Pi-k^s, Pi-a, Pi-i, Pi-k), можно использовать наиболее распространенную расу 137.5 с генами вирулентности Av-k^{s+}, Av-a⁺, Av-i⁺, Av-k⁺, Av-m⁺, Av-ta⁺, Av-t⁺, Av-k^{p+}. Эту расу можно применять для иммунологической оценки в инфекционных питомниках Украины, Краснодарского края, Каракалпакии. В инфекционных питомниках Приморского края рекомендуем использовать наиболее распространенные расы 004, 005, 007 с генами вирулентности Av-i⁺, Av-k^{s+}, Av-i⁺, Av-k^{s+}, Av-a⁺, Av-i⁺, соответственно.

Для оценки сортов мировой коллекции, содержащих эффективные гены устойчивости Pi-z, Pi-z^t, Pi-ta², Pi-b против большинства рас патогена, отбирают высоковирулентные расы с генами вирулентности, комплементарными генам устойчивости испытываемых сортов, а именно Av-z⁺, Av-z^{t+}, Av-ta²⁺, Av-b⁺. Лучше всего использовать расу, содержащую все 12 генов вирулентности, а именно 777.7. Однако такая раса в отечественной популяции отсутствует, поэтому для оценки коллекционных сортов риса можно использовать расы 137.7, 047, 417, 303. Эти расы не следует применять в региональных питомниках во избежание их распространения на окружающие посевы. Оценку сортов к ним можно проводить только в теплице или в межрегиональном питомнике, находящемся на значительном удалении от основных рисосеющих зон.

При подборе рас для оценки и отбора селекционного материала на расонеспецифическую устойчивость необходимо учитывать генотип устойчивости родительских форм.

Получение инокулюма

Культуры гриба рассеивают в чашки Петри на морковный, картофельно-декстрозный или овсяный агар, приготовленный по обычным прописям (приложение 1). Культуры выращивают в термостате в течение двух недель при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Суспензию конидий для инокуляции приготавливают путем смыва с поверхности колоний спорово-мицелиальной массы. В чашку Петри с колонией гриба наливают 20-30 мл воды (в каждую) и осторожно стеклянной палочкой или скальпелем легко соскабливают споры с поверхности колоний. Полученную суспензию из нескольких чашек сливают в колбу. Для отделения конидий от мицелия колбы встряхивают (вручную или помещают на магнитную качалку) в течение 10 минут. Затем суспензию фильтруют через двойной слой марли и подсчитывают под микроскопом (увеличение 8×10) титр конидий в ней.

Для инокуляции растений в фазу начала кушения (4-5 листьев) в условиях теплицы титр должен быть равен 10^5 конидий/мл, что соответствует 10-14 спорам в поле зрения микроскопа (среднее из 10 просмотренных полей). Для инокуляции метелок используют большее количество конидий (20^5 шт/мл). Концентрация суспензии для инокуляции растений в фазу 5-7 листьев в условиях поля должна составлять 20-30 спор в поле зрения микроскопа.

Приготовленную суспензию можно хранить в холодильнике не более суток при температуре $4-5^\circ\text{C}$.

Для инокуляции растений в полевых условиях можно использовать сухой споровый материал. Нагрузка инокулюма в условиях поля должна составлять 5 мг/м^2 при 100% концентрации и всхожести биоматериала. Фактический расход биоматериала, имеющего более низкие показатели, рассчитывают по формуле:

$$x = 100 P \cdot N \cdot k / n \cdot V,$$

где P - площадь делянки, м^2 , N - количество спор на 1 м^2 , n - концентрация конидий, шт/ м^2 , V - прорастаемость спор, %; k - коэффициент выседания - 10-15%.

Приготовленный биоматериал смешивают с тальком в соотношении 1:100 для получения однородной массы.

Инокуляция растений в условиях теплицы и поля

Выращивание растений. Растения выращивают в вазонах или пластиковых коробочках по следующей методике. Семена риса проращивают на промытом песке или фильтровальной бумаге в чашках Петри в термостате с температурой $26-28^\circ\text{C}$. Проросшие

семена высевают в вазоны с дерново-подзолистой почвой, смешанной с перегноем (2:1). В почву вносят удобрения из расчета на 1 кг почвы: N - 0.5 г, K - 0.1 г, P - 0.1 г (по действующему веществу). Вазоны помещают в поддоны, наполненные водой.

При выращивании растений до начала кущения подкормку проводят дважды: первую - через 5 дней после посева полным минеральным удобрением - на 10 л воды 1.5 г мочевины, 5.5 г суперфосфата и 1.2 г хлористого калия, вторую азотную - через 10 дней после посева - 1.5 г мочевины на 10 литров воды.

В период выращивания растений температура должна быть не ниже 20°C и не выше 30°C. Относительная влажность воздуха - не ниже 80%, освещенность 20-40 тыс. люкс. Продолжительность светового дня - 12-14 часов. Выборка растений 10-кратная. Инокуляцию и учет заражения проводят в соответствии с вышеописанными методами.

Для оценки устойчивости растений в фазу выметывания проросшие семена по 10-15 штук высевают в большие вазоны (диаметром не менее 18 см). По мере роста ослабленные всходы удаляют, в каждом вазоне оставляют по 7-8 растений. До фазы 4-5 листьев подкормку проводят дважды вышеописанным способом, затем через каждые две недели - полным удобрением.

Инокуляция растений. Для инокуляции в условиях теплицы и поля следует использовать только здоровые растения с темно-зеленой окраской листьев. Заражение растений риса в условиях теплицы проводят в фазу 4-5 листьев. Вазоны с растениями помещают во влажные камеры, поддоны которых перед нанесением инокулюма заполняют горячей водой. Камеры закрывают на 10-15 минут. За этот промежуток времени на листья оседают мельчайшие капли воды, которые препятствуют скатыванию инокуляционных частиц.

Растения опрыскивают из пульверизатора, расход суспензии на одно растение - 0.5 мл в фазу кущения, 50 мл - в фазу выметывания-цветения.

После инокуляции растения оставляют во влажной камере на 24-26 часов, в зависимости от температуры. Оптимальная температура 26°C.

В полевых условиях в районах с высокой влажностью воздуха заражение проводят без искусственной влажной камеры. Инокуляцию проводят в вечерние часы в теплую безветренную погоду перед выпадением росы или после дождя. В районах с сухим климатом после инокуляции растения накрывают полиэтиленовой пленкой. В пасмурную погоду и при температуре воздуха не выше 20°C пленку снимают через 24 часа, при более высокой температуре (во избежание запаривания и ожогов растений) покрытие снимают через 12-14 часов.

УЧЕТ ПОРАЖЕННОСТИ СОРТООБРАЗЦОВ РИСА

Устойчивость сортов риса определяют по пораженности листовой пластинки, узлов и метелки. Первый учет поражения растений в фазу кущения в условиях теплицы и поля проводят через каждые 10 дней после инокуляции. При этом учитывают два показателя: тип реакции (в баллах) и интенсивность поражения (в %).

Для оценки этих показателей используют десятибалльную шкалу Международного института риса (табл.1).

В зависимости от балла поражения все сорта условно разделяют на 4 группы:

- устойчивый тип, балл 1-2,
- промежуточный тип, балл 3-4,
- восприимчивый тип, балл 5-6,
- сильно восприимчивый тип, балл 7-9.

Существует другая шкала (Асага,1976), определяющая интенсивность поражения сортов риса с восприимчивым типом реакции. Согласно этой шкале сорта разделяют по степени поражения на группы: слабо поражаемые, умеренно поражаемые, поражаемые и сильно поражаемые (табл.2).

Таблица 1. Шкала оценки поражения пирикулярриозом листьев растений риса

Балл поражения	Описание поражений
0	Поражение отсутствует
1	Единичные коричневые точки
2	Многочисленные мелкие точки
3	Маленькие округлые пятна около 2 мм в диаметре с серым центром и коричневой каймой
4	Типичные пятна пирикулярриоза, эллиптические, 1-2 см, поражено 2% площади листа
5	Типичные пятна, поражено до 10% площади листа
6	Типичные пятна, поражено до 25% площади листа
7	Типичные пятна, поражено до 50% площади листа
8	Типичные пятна, поражено до 75% площади листа
9	Типичные пятна, поражено до 100% площади листа

Таблица 2. Шкала Асага для определения степени поражения растений риса листовой формой пирикулярриоза

Балл поражения	Группа сортов по степени поражения	Характеристика интенсивности поражения
1-4	Слабо поражаемая	Единичные пятна, занимающие до 5% листовой поверхности
5-6	Умеренно поражаемая	Поражено от 6 до 25% площади листа
7	Поражаемая	Поражено от 26 до 50% площади листа
8-9	Сильно поражаемая	Поражение свыше 50% площади листа, приводящее к полному высыханию.

Учет поражения пирикулярриозом узлов и метелок растений риса проводят в фазу молочно-восковой спелости.

Для оценки узловой формы пирикулярриоза используют 4-балльную шкалу (табл.3). Для оценки метельчатой формы применяют 10-балльную шкалу (табл.4).

Таблица 3. Шкала оценки поражения растений риса узловой формой пирикулярриоза

Балл поражения	Описание поражений
0	Признаки заболевания отсутствуют
1	Небольшие, вдавленные бурые пятна диаметром 2-3 мм, поражение не затрагивает проводящую систему
2	Пятна круглые, черные, охватывают 2/3 узла; наблюдается щуплость зерна
3	Чернеющие пятна охватывают весь стебель, узел загнивает, стебли надламываются, нередко влагалище листа удерживает стебель с пустой метелкой

Таблица 4. Шкала оценки поражения растений риса метельчатой формой пирикулярриоза

Балл поражения	Описание поражения
0	Поражение отсутствует
1	Единичные коричневые точки
2	Многочисленные коричневые точки
3	Маленькие округлые пятна с серым центром на зерновках, около 2 мм в диаметре, с коричневой каймой
4	Единичные типичные пятна пирикулярриоза на зерновках или веточках, всего поражено 2% зерновок
5	Типичные пятна пирикулярриоза, поражены зерновки, веточки, оси; щуплость зерна 10%
6	Поражена часть "шейки", веточки, зерновки; щуплые зерна составляют 25%
7	Поражена часть "шейки", веточки, зерновки; щуплость зерна составляют 50%
8	Поражена часть "шейки", веточки, зерновки; щуплые зерна составляют 75%
9	Поражена часть "шейки", веточки, зерновки; щуплость зерна составляют 100%

Как правило, у большинства сортов риса существует корреляция между устойчивостью растений в фазу кущения и выметывания.

ИСПЫТАНИЕ СОРТООБРАЗЦОВ РИСА НА РАСОНЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ПИРИКУЛЯРИОЗА РИСА

Оценку и отбор сортобразцов риса с расонеспецифической устойчивостью к пирикулярриозу проводят по следующим этапам:

- классификация сортов риса на генетические группы с помощью тест-культур гриба и отбор слабо поражаемых образцов,
- оценка отобранных образцов к широкому спектру рас из разных популяций патогена.

Главным условием при отборе сортобразцов с расонеспецифической устойчивостью является применение рас с генами вирулентности, комплементарными генам устойчивости испытываемых сортов. Для подбора таких рас необходимо знать генотип устойчивости сортов. В связи с этим первоначальным этапом в исследованиях является идентификация генов устойчивости в сортах риса с использованием рас-тестеров с известными генами вирулентности. Сорта с одинаковыми реакциями к расам классифицируют на генетические группы. Из каждой группы отбирают слабо поражаемые образцы, которые оценивают на втором этапе к широкому спектру рас, характеризующихся комплементарными генами вирулентности и высоким уровнем агрессивности. Отбирают образцы с широким спектром расонеспецифической устойчивости к большинству испытываемых культур гриба. Исследования проводят в условиях теплицы и инфекционного питомника.

Генотип устойчивости с помощью тест-культур патогена определяют только в условиях теплицы.

Метод оценки расонеспецифической устойчивости сортобразцов риса к пирикулярриозу в условиях теплицы

Классификация сортов риса на генетические группы с помощью тест-культур гриба и отбор слабо поражаемых образцов. Гены устойчивости у сортобразцов риса определяют в фазу кущения (4-5 листьев) с помощью тест-культур гриба по методу японских исследователей (Togiyama et al., 1983). Метод основан на комплементарном взаимодействии генов устойчивости растения-хозяина и генов вирулентности рас патогена.

Для идентификации генов устойчивости используют расы-дифференциаторы с различным количеством и сочетанием генов вирулентности (табл.5).

Основным критерием наличия генов является восприимчивый тип реакции растений к соответствующей расе патогена.

Растения риса в фазу кущения инокулируют расой 001 с одним геном вирулентности $Av-k^{s+}$. При восприимчивом типе реакции они, согласно гипотезе Флора, имеют ген устойчивости $Pi-k^s$. При устойчивом типе реакции к этой расе растения инокулируют расой 003,

которая кроме гена вирулентности $Av-k^{s+}$ содержит ген $Av-a^+$. Восприимчивый тип реакции сортообразца к расе 003 указывает на наличие в нем гена устойчивости $Pi-a$. При отсутствии симптомов заболевания растения инокулируют расой 007, имеющей кроме двух генов вирулентности $Av-k^{s+}$ и $Av-a^+$ ген $Av-i^+$. Если растения восприимчивы к этой расе, то образец очевидно имеет ген устойчивости $Pi-i$. В противном случае растения инокулируют расой 017, которая кроме трех генов вирулентности $Av-k^{s+}$, $Av-a^+$, $Av-i^+$ содержит новый ген $Av-k^+$. В случае устойчивости реакции оценку проводят к расе 037 с геном вирулентности $Av-m^+$. При устойчивой реакции к этой расе растения заражают расой 047, содержащей кроме трех генов вирулентности $Av-k^{s+}$, $Av-a^+$, $Av-i^+$ ген $Av-z^+$. Восприимчивый тип реакции к ней свидетельствует о наличии в сортообразце гена устойчивости $Pi-z$. Таким образом, используя последовательно расы с разным количеством и сочетанием генов вирулентности, идентифицируют по такому же принципу и другие гены устойчивости.

Таблица 5. Определение генов устойчивости в сортах риса по методу Toriyama et al. (1983)

Раса											Предполагаемые гены устойчивости
001	003	007	017	037	047	137	437	1371	1372	1374	
Гены вирулентности											
$Av-k^{s+}$	$Av-a^+$	$Av-i^+$	$Av-k^+$	$Av-m^+$	$Av-z^+$	$Av-ta^+$	$Av-z^{tr}$	$Av-k^{p+}$	$Av-b^+$	$Av-t^+$	
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$Pi-k^3$
R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$Pi-a$
R	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	$Pi-i$
R	R	R	S	-	-	-	-	-	-	-	$Pi-k$
R	R	R	R	S	-	-	-	-	-	-	$Pi-m$
R	R	R	R	R	S	-	-	-	-	-	$Pi-z$
R	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-	$Pi-ta$
R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	-	$Pi-z^1$
R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	$Pi-k^2$
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	$Pi-b$
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	$Pi-t$
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	$Pi-ta^2$ др.

Этот метод позволяет разделить сорта риса на разные генетические группы. Сортообразцы риса с одинаковыми реакциями к используемым расам объединяются в одну генетическую группу.

Из каждой генетической группы отбирают образцы со слабым и умеренным поражением. Основным критерием при отборе является интенсивность поражения, определяемая по 10-балльной шкале Международного института риса (табл.1). Для дальнейшего изучения отбирают сортообразцы со слабым поражением (до 25%) - балл 3-6.

Оценка отобранных образцов к широкому спектру рас из разных популяций патогена. Отобранные образцы оценивают к широкому спектру рас (5-6) с комплементарными генами вирулентности из различных географических регионов страны. Основным критерием отбора на этом этапе является средний балл поражения ко всем испытанным расам. Отбирают образцы, характеризующиеся слабой и средней интенсивностью поражения болезнью не менее чем к 80% испытанных рас.

Для более детальной и всесторонней оценки отобранных образцов изучают: количество инфекционных пятен на единицу площади листа, их размер и спорулирующую способность. Эти критерии показали тесную корреляционную связь с динамикой развития патогена в условиях поля.

Количество инфекционных пятен подсчитывают на 4-м полностью развернувшемся к моменту инокуляции листе на 10-й день после заражения. Учитывают все пятна восприимчивого и промежуточного типа. Выборка составляет не менее 50 пятен с каждого сорта. Площадь инфекционного пятна определяют как произведение длины на ширину.

Спорулирующая способность. Для определения споруляции гриба "in vivo" с растений каждого сорта на 10-е сутки после инокуляции отбирают листья с редко расположенными пятнами (не более 5 на лист). Из листа ножницами вырезают участки тканей с одним инфекционным пятном и помещают в пробирку, содержащую 1 мл стерильной воды (на поверхность воды). Пробирку плотно закрывают пробкой и ставят в термостат при температуре $27 \pm 1^\circ\text{C}$ на трое суток. После появления спор на инфекционных пятнах пробирку встряхивают для удаления с пятна налета конидий. В каждую пробирку добавляют по 1 мл этилового спирта для консервации. Выборка не менее 50 пятен с каждого сорта.

Подсчет количества конидий проводят в камере Горяева. Суспензию спор встряхивают в течение 2-х минут и с помощью пипетки заполняют каналцы камеры до полного объема. Споры подсчитывают под микроскопом при увеличении 10x8 на всей площади сетки в двух повторениях. Расчет выхода спор проводят с единицы площади листа по формуле:

$$B = 1000 \cdot N \cdot V / 0.9S,$$

где B - количество спор с единицы поверхности, N - среднее число спор в одной сетке камеры Горяева, V - объем суспензии, мл; S - площадь пятна, cm^2 ; 0.9 - объем камеры Горяева, mm^3 ; 1000 - коэффициент пересчета от мл к mm^3 .

На основании перечисленных критериев расонеспецифической устойчивости подсчитывают комплексный показатель инфекционной

эффективности (IE) болезни по формуле:

$$IE = n S K/P,$$

где n - среднее количество инфекционных пятен, S - средний размер инфекционного пятна, мм²; K - средняя споруляция пятна, шт/мм²; P - площадь листа.

При оценке районированных и перспективных сортов с расонеспецифической устойчивостью к пирикулярриозу решающим является показатель инфекционной эффективности у сорта-стандарта (районированный сорт). Отбирают образцы, имеющие показатель инфекционной эффективности (IE) не выше, чем у сорта-стандарта:

$$IE = (IE \text{ испытываемого сорта}) / (IE \text{ сорта-стандарта}) < 1.$$

При оценке и отборе источников устойчивости стандартом может служить сорт со средним уровнем расонеспецифической устойчивости (поражаемость < 25%).

Другим критерием отбора сортов риса с расонеспецифической устойчивостью к пирикулярриозу может служить площадь под кривой развития болезни, определяемая по динамике заражения растений. Первичное заражение проводят в фазу 4-5 листьев по вышеописанной методике. Для последующего перезаражения растений создают благоприятные условия, искусственно увлажняя их с помощью пульверизатора или специальной форсунки. После нанесения на растения капельно-жидкой влаги из пульверизатора растения накрывают на ночь каркасами из полиэтиленовой пленки. Утром каркасы снимают. Распыл мелких дисперсионных капель проводится ежедневно в ночное время. Выборка растений одного сорта составляет не менее 100, повторность 3-кратная. Учет заражения проводят через каждые 5 дней до фазы выметывания. Интенсивность поражения определяют по 10-балльной шкале или по количеству инфекционных пятен на одно растение. На основании проведенных учетов определяют площадь под кривой развития болезни по нижеприведенной формуле (3.2). Отбирают сорта, у которых этот показатель равен или ниже, чем у сорта-стандарта.

Метод оценки расонеспецифической устойчивости в условиях поля. Быструю и эффективную оценку уровня устойчивости можно получить в инфекционных питомниках на искусственном фоне заражения, обеспечивающем наиболее благоприятные условия для развития болезни.

Подготовку почвы, посев и уход за растениями проводят в соответствии с методическими указаниями по оценке устойчивости образцов риса к пирикулярриозу в инфекционном питомнике (Фролова

и др., 1983). Семена риса высевают на делянках в трех повторностях, которые располагаются в виде блоков. Пространство между блоками засевают устойчивыми сортами.

Площадь под каждым образцом может быть различной в зависимости от наличия семян и варьировать от 1 м² до 60 м². В качестве стандарта служит один из районированных в данном регионе сортов с определенным уровнем расонеспецифической устойчивости. Один блок сортообразцов оставляют в качестве контроля; его не инокулируют и при необходимости обрабатывают фунгицидом. Защитный контроль используют для определения потерь урожая.

Инокуляцию растений проводят в фазу 5-6 листьев сухим биоматериалом или водной суспензией спор гриба в соответствии с описанной выше методикой.

Учет пораженности растений проводят каждые 10 дней после инокуляции по 10-балльной международной шкале. Основным критерием оценки расонеспецифической устойчивости служит динамика развития болезни, определяемая площадью под кривой.

Площадь под кривой развития болезни (S^*) определяют по формуле:

$$S^* = (x_1 + x_2) \times (t_2 - t_1) + \dots + (x_{n-1} + x_n) \times (t_n - t_{n-1}),$$

где S^* - в условных единицах, x_1 - интенсивность развития болезни на момент первого учета, %; x_2 - интенсивность развития болезни на момент второго учета, %; $t_2 - t_1$ - количество дней между вторым и первым учетом.

Сортообразцы риса отбирают при сравнении испытываемых сортов с сортом-стандартом. Для районированных и перспективных сортов стандартом является широко районированный сорт с определенным уровнем расонеспецифической устойчивости. Для источников устойчивости таким сортом служит образец из коллекции ВИР со средним уровнем расонеспецифической устойчивости.

Для удобства введен индекс расонеспецифической устойчивости (IR):

$$IR = (S^* \text{ испытываемого сорта}) / (S^* \text{ стандарта}) < 1.$$

Потери урожая (Y) рассчитывают по формуле:

$$Y = 100(U_k - U_v) / U_k,$$

где U_k - средний урожай в контроле, U_v - средний урожай в инокулированных вариантах.

Затем эту величину сравнивают с потерями урожая у сорта-стандарта. Отбирают образцы, имеющие изученные показатели меньше, чем у районированных сортов.

Литература

Фролова В.С., Коваленко Е.Д. и др. Методические указания по оценке устойчивости сортов риса к пирикулярриозу в инфекционном питомнике. М., 1983, 14 с.

Ezuka A. Breeding for and genetics of blast resistance in Japan. /Proc. Rice Blast Workshop. 1979, p.27-48.

Toriyama K., Ezuka A., Asaga K., Yokoo M. A method of estimating true resistance genes to blast in rice varieties by testing their backcrossed progenies for race - specific reactions. /Japan. J. Breed, 33, 4, 1983, p.448-456.

Villaral R., Nelson R. Some components of slow blasting resistance in rice. /Phytopathol, 1, 6, 1981, p.608-611.

Приложение

Прописи питательных сред для выращивания возбудителя пирикулярриоза риса

Состав и приготовление агаризованной морковной среды: сушеная морковь - 50 г, агар-агар - 20 г, вода - 1000 мл. Варить среду после закипания в течение 45 минут, стерилизовать при 1 атм. 1 час.

Состав и приготовление агаризованной овсяной среды: овсяные хлопья - 100 г, агар-агар - 10 г, вода - 1000 мл. Варить отдельно овсяные хлопья и агар-агар в 500 мл воды в течение 20 минут, профильтровать и слить вместе. Стерилизовать при 1 атм. 40 минут, при 1.4 атм. - 30 минут.

Состав и приготовление агаризованной картофельно-декстрозной среды: картофель (очищенный) - 200 г, агар-агар - 20 г, сахараза - 20 г. Варить среду после закипания в течение 15 минут, профильтровать и добавить сахарозу. Стерилизовать при 0.5 атм. 30 минут.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОСИМПТОМНОЙ ОЦЕНКЕ ЧАСТИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РИСА К ПИРИКУЛЯРИОЗУ

А.А.Аверьянов, Т.М.Коломиец, В.П.Лапикова, Т.Д.Пасечник

Всероссийский НИИ фитопатологии, Москва

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Один из способов борьбы с потерями урожая от инфекционных болезней - использование устойчивых сортов, которые подразделяются на вертикально и горизонтально устойчивые (Вандерпланк, 1981). Горизонтальную устойчивость называют также полевой или частичной, последний термин более распространен и будет использоваться нами в дальнейшем. Сорта первого типа полностью устойчивы к одним расам, но сильно поражаются другими. Напротив, частично устойчивые сорта поражаются многими расами, но слабо, потери урожая при этом невелики (Parlevliet, 1988; Dainello, 1990). Существенно, что на таких сортах не происходит отбора высоковирулентных рас паразита (Agrisios, 1988). Поэтому, частичная устойчивость сохраняется многие годы, что позволяет снизить расходы на селекцию и сортоиспытания (Villareal et al., 1981; Simmonds, 1985; Yeh, Bonman, 1986; Parlevliet, 1988).

Естественно, что в селекционной работе необходимо отличать частично устойчивые сорта от прочих (восприимчивых и вертикально устойчивых). Методы оценки основываются на различных проявлениях болезни на ее разных стадиях. Это - наблюдение за визуальными симптомами, определение особенностей развития паразита в растительных тканях или анализ биохимических факторов, являющихся маркерами устойчивости или восприимчивости.

Методы, основанные на наблюдениях за визуальными симптомами

Частично устойчивым сортам свойственны симптомы совместимого типа, то есть характерные инфекционные пятна, которые внешне выглядят почти как на восприимчивых сортах. Тем не менее, на частично устойчивых - эти пятна мельче, появляются в меньшем числе, развиваются медленнее и спорулируют хуже. Эти количественные параметры используются при оценке перспективных сортов с высоким уровнем частичной устойчивости (Osman-Ghani, Manners, 1985; Yeh, Bonman, 1986; Коваленко и др., 1990; Hyde, Elahinia, 1990; Rashid, 1991; Brake, Irwin, 1992). Важным показателем является площадь под кривой развития болезни (Коваленко и др., 1990). У частично устойчивых сортов она меньше, чем у восприимчивых, так как у первых болезнь развивается медленнее. Применяется, кроме того, обработка растений фунгицидами в малых дозах, предотвращающих

развитие болезни на частично устойчивых, но не на восприимчивых сортах (Brondy et al.,1988). Такие методы можно использовать в закрытом и открытом грунте, но они требуют длительных экспериментов, большого количества растений и визуальной оценки результатов, которая субъективна. Кроме того, частичная устойчивость у риса редко встречается в чистом виде. Ее определению мешают гены вертикальной устойчивости (Roumen,Boef,1993), и приходится исследовать гибриды второго и третьего поколений (Roumen,Boef, 1993a,1993b; Kaur et al.,1984)

Методы, основанные на определении развития гриба в растении

Известно, что развитие паразита на устойчивом хозяине заторможено не только при появлении визуальных симптомов, но и раньше. Поэтому торможение развития, определенное на досимптомной стадии, тоже может быть положено в основу оценки. Четкие результаты дает микроскопия (Niks, Kuipper,1983; Niks,1983, 1986; Luke et al.,1984; Newton,1989), но она трудоемка и часто требует токсичных реактивов. Используется оценка развития гриба по накоплению грибного антигена или иных характерных компонентов мицелия. Это, например, эргостерол возбудителя мучнистой росы (Newton,1989), арабит и маннит - возбудителя пирикулярриоза (Чкаников и др.,1993; Якубов,Чкаников,1993). Процедура эксперимента при этом упрощается, но для очень ранних стадий болезни (1-е или 2-е сутки после заражения) подобные методы пока не разработаны.

Методы, основанные на физиолого-биохимических проявлениях устойчивости

Маркерами устойчивости могут быть вещества или процессы, протекающие в хозяине, которые прямо или косвенно связаны с задержкой развития патогена. Таких примеров много в отношении вертикальной устойчивости, но не частичной. Причины последней не ясны, её не удалось связать ни с содержанием в клетках некоторых фенолов (Dall et al.,1993), ни с синтезом фитоалексинов (Matsuyama, 1983). Описаны различия в реакции протопластов растений с разным уровнем частичной устойчивости на грибной элиситор, проявляющиеся в агрегации цитоплазмы. Использовать эту реакцию как маркер частичной устойчивости для массовых анализов сложно (Iwakuma et al.,1991).

Определение активации кислорода - один из возможных подходов для оценки устойчивости

Одним из слагаемых болезнеустойчивости является генерация растением активных форм кислорода (АФК). Они токсичны для воз-

будителя сами по себе, а также могут «запускать» другие защитные реакции (Мерзляк, 1989; Аверьянов, 1991; Mehdy, 1994). Нами была выявлена связь вертикальной сортовой или индуцированной фунгицидами и высокой температурой устойчивости риса к пирикулярриозу с активацией кислорода на поверхности листьев. Это выражалось в усиленной генерации АФК в диффузатах листьев устойчивых растений в первые два дня после заражения, что подавляло развитие возбудителя (Аверьянов, Лапикова, 1991; Николаев, Аверьянов, 1991; Aver'yanov et al., 1993). Аналогичный подход использован нами в отношении сортов риса, у которых ранее была выявлена частичная устойчивость к пирикулярриозу (Коваленко и др., 1990; Коломиец, Коваленко, 1995).

АФК анализировали в капельных диффузатах листьев. Для этого необходимо длительно (не менее 24 часов) удерживать в заданных точках листа довольно крупные (10-20 мкл) капли инокулюма (Аверьянов, Лапикова, 1988; Лапикова и др., 1994). Первоначально мы проверили, дает ли такой способ заражения характерные симптомы на листьях частично устойчивых сортов. Кроме того, сравнивали симптомы, полученные на интактных растениях и на отрезках листьев, помещенных на среду с бензимидазолом (широко используемая модель (Aver'yanov et al., 1993)).

Установлено, что на восприимчивом и вертикально устойчивом сортах симптомы не зависели от фрагментации листьев, то есть модель из отрезков листьев адекватна целому растению. При этом на отрезках листьев частично устойчивого сорта во множестве появлялись мелкие некрозы. Поэтому все опыты проведены с целыми растениями, для заражения которых фиксированными каплями разработаны специальные устройства.

Мы сравнивали симптомы, полученные при заражении опрыскиванием и фиксированными каплями. После заражения опрыскиванием определяли относительную часть площади поверхности листа, занятую инфекционными пятнами (Гешеле, 1978), а при заражении отдельными каплями - долю (%) инфекционных пятен совместимого (тип реакции 4 или 5), промежуточного (тип 3) и несовместимого типов (тип 1 или 2), а также бессимптомных исходов от общего числа инфекционных капель. Тип реакции определяли по Laterell et al. (1965).

Для восприимчивого сорта было характерно развитие совместимого типа реакции при заражении любым штаммом. Для устойчивых сортов - полное отсутствие симптомов преимущественно у вертикально устойчивого, либо развитие мелких и редких пятен преимущественно у частично устойчивых сортов (табл.1). В любой комбинации хозяин - паразит инфекционные пятна при обоих способах заражения были сходны по размерам, форме и цвету.

Таблица 1. Визуальные симптомы пирикулярноза
при заражении опрыскиванием или фиксированными каплями

Штамм инокулюма, раса, гены вирулентности	Сорта	Способ заражения			
		Фиксированными каплями: доля (%) инфекционных капель, давших симптомы указанного типа			Опрыскиванием: степень пораже- ния поверхности, %
		0	1-3	4-5	
Н-5-3, Раса 007, Av-k ^{s+} , Av- a ⁺ , Av-z ⁺	Восприимчивый <i>Sha-tiao-tsao</i>	15 ± 1	9 ± 8	76 ± 6	58 ± 15
	Вертикально устойчивые:				
	<i>Zenith</i>	100 ± 0	0	0	0
	<i>Tadukan</i>	100 ± 0	0	0	0
	Частично устойчивые:				
	<i>Shimokita</i>	69 ± 6	14 ± 4	17 ± 7	25 ± 5
<i>SNAB kweichow</i>	62 ± 10	29 ± 12	9 ± 8	10 ± 5	
<i>Norin 18</i>	73 ± 5	12 ± 3	14 ± 5	10 ± 9	
<i>China 1039</i>	100 ± 0	0	0	0	
КП-69, Раса 037.03, Av-k ^{s+} , Av-a ⁺ , Av-i ⁺ , Av-k ⁺ , Av-m ⁺ , Av-kr ⁺ , Av-b ⁺	Восприимчивый <i>Sha-tiao-tsao</i>	17 ± 5	15 ± 6	77 ± 6	67 ± 1
	Вертикально устойчивый:				
	<i>Tadukan</i>	100 ± 0	0	0	0
	Частично устойчивый:				
	<i>SNAB kweichow</i>	78 ± 16	18 ± 3	13 ± 9	8 ± 6
	<i>China 1039</i>	100 ± 0	0	0	0
F 67-57, Раса 047, Av-k ^{s+} , Av- a ⁺ , Av-i ⁺ , Av-z ⁺	Восприимчивый <i>Sha-tiao-tsao</i>	22 ± 7	2 ± 6	77 ± 6	77 ± 10
	Вертикально устойчивый:				
	<i>Tadukan</i>	100 ± 0	0	0	0
	Частично устойчивый:				
	<i>SNAB kweichow</i>	98 ± 3	2 ± 3	0	0
	<i>China 1039</i>	100 ± 0	0	0	0
КК-37, Раса 137.5, Av-k ^{s+} , Av- a ⁺ , Av-i ⁺ , Av-k ⁺ , Av-m ⁺ , Av- kr ⁺ , Av- ta ⁺ , Av- t ⁺	Восприимчивый <i>Sha-tiao-tsao</i>	27 ± 13	3 ± 3	70 ± 10	67 ± 1
	Вертикально устойчивые:				
	<i>Tadukan</i>	77 ± 5	25 ± 17	0	0
	<i>Zenith</i>	100 ± 0	0	0	0
	Частично устойчивые:				
	<i>SNAB kweichow</i>	63 ± 11	20 ± 11	17 ± 4	8 ± 6
<i>Shimokita</i>	89 ± 4	6 ± 6	7 ± 8	6 ± 7	
КП-57, раса 137.7, Av-k ^{s+} , Av- a ⁺ , Av-i ⁺ , Av-k ⁺ , Av-m ⁺ , Av-kr ⁺ , Av-ta ⁺ , Av- t ⁺	Восприимчивый <i>Sha-tiao-tsao</i>	3 ± 6	11 ± 16	86 ± 20	70 ± 13
	Вертикально устойчивый:				
	<i>Tadukan</i>	58 ± 13	41 ± 18	3 ± 4	0
	Частично устойчивый:				
	<i>SNAB kweichow</i>	25 ± 3	57 ± 7	18 ± 8	9 ± 6
	<i>China 1039</i>	100 ± 0	0	0	0

Площадь поверхности листа, занятая инфекционными пятнами, при заражении опрыскиванием была примерно равна частоте развития инфекционных пятен совместимого типа при заражении фиксированными каплями. Таким образом, способ заражения, который требуется для получения диффузатов, не искажает симптомы болезни и, очевидно, не вносит артефактов.

Было исследовано, может ли фунгитоксичность выделений листьев, зависящая от АФК, служить признаком частичной устойчивости на ранних досимптомных стадиях болезни. Одной из задач было выявить гены частичной устойчивости в присутствии генов вертикальной устойчивости.

Токсичность диффузатов

Мы изучили ингибирование прорастания спор в листовых диффузатах восприимчивого, вертикально устойчивых и частично устойчивых сортов в комбинациях с различными штаммами. Диффузаты здоровых листьев восприимчивого сорта были малотоксичны для всех исследованных штаммов. У устойчивых сортов в одних комбинациях токсичность была высокой, в других - низкой.

У восприимчивого сорта диффузаты зараженных листьев были малотоксичны, ингибирование прорастания в них составляло лишь 10-20%. У устойчивых сортов токсичность таких диффузатов была высокой (ингибирование 60-80%), но в некоторых случаях не на 1-е, а на 2-е сутки после инокуляции (табл.2). Следовательно, высокая токсичность диффузатов зараженных листьев может быть критерием сортовой устойчивости, как вертикальной, так и частичной.

Влияние некоторых факторов на токсичность диффузатов

На токсичность диффузатов здоровых листьев (если она была) супероксиддисмутаза, каталаза, формиат, тиомочевина и кипячение действовали примерно так же, как и на токсичность диффузатов зараженных. У вертикально устойчивого сорта те же факторы значительно (полностью или не менее чем на 2/3) ослабляли токсичность (табл.3).

У частично устойчивых сортов каталаза и формиат устраняли токсичность полностью, за исключением комбинации *CNAB kweichow* - *KП-69*, где эти агенты снижали токсичность не более чем вдвое. СОД и тиомочевина на нее совершенно не влияли или же слабо снижали (примерно на треть).

В комбинации сорта *CNAB kweichow* со штаммом *KП-57*, как и у вертикально устойчивых сортов *Tadukan* и *Zenith*, во всех исследованных комбинациях (табл.3) сильное антигрибное действие значительно (примерно на 70%) снижалось под действием всех четырех антиокислительных агентов.

Таблица 2. Фунгитоксичность диффузатов зараженных листьев
 (ингибирование прорастания спор тест-объекта)

Сорта, гены устойчиво- сти	Штаммы, расы, гены вирулентности						
	Н-5-3, Раса 007,	КП-69, Раса 037.03, <i>Av-k^{s+}</i> , <i>Av-a⁺</i> , <i>Av-i⁺</i> , <i>Av-k⁺</i> , <i>Av-m⁺</i> , <i>Av-k^{p+}</i> , <i>Av-b⁺</i>	Ф 67-57, Раса 047, <i>Av-k^{s+}</i> , <i>Av-a⁺</i> , <i>Av-i⁺</i> , <i>Av-z⁺</i>	КК-37, Раса 137.5, 137.7, <i>Av-k^{s+}</i> , <i>Av-a⁺</i> , <i>Av-i⁺</i> , <i>Av-k⁺</i> , <i>Av-m⁺</i> , <i>Av-k^{p+}</i> , <i>Av-ta⁺</i> , <i>Av-t⁺</i>	КП-57, Раса 137.7, <i>Av-k^{s+}</i> , <i>Av-a⁺</i> , <i>Av-i⁺</i> , <i>Av-k⁺</i> , <i>Av-m⁺</i> , <i>Av-k^{p+}</i> , <i>Av-ta⁺</i> , <i>Av-t⁺</i> , <i>Av-b⁺</i>		
		24 ч	48 ч*	24 ч	48 ч*		
Sha-tiao- tsao	низкая	низкая	низкая	низкая	-	низкая	низкая
<i>Pi-k^s</i>							
Tadukan							
<i>Pi-k^s</i> , <i>Pi-ta</i> ,	высокая	средняя	высокая	средняя	высокая	высокая	высокая
<i>Pi-ta²</i>							
Zenith							
<i>Pi-a</i> , <i>Pi-i</i> ,	высокая	-	-	-	-	высокая	-
<i>Pi-z</i>							
CNAB							
kweichow	высокая	высокая	высокая	высокая	-	высокая	высокая
<i>Pi-b</i> и другие							
Shimokita							
<i>Pi-a</i> , <i>Pi-ta</i>	высокая	-	-	-	-	высокая	высокая
Norin 18							
<i>Pi-a</i> и <i>Pi-k^s</i>	высокая	-	-	-	-	-	-
China 1039							
<i>Pi-a</i> , <i>Pi-b</i> , <i>Pi-i</i> , <i>Pi-k^s</i> , <i>Pi-k^p</i> , <i>Pi-k</i> ,	высокая	-	-	-	-	-	высокая
<i>Pi-m</i> , <i>Pi-t</i> , <i>Pi-ta</i> , <i>Pi-z</i> и <i>Pi-z^t</i>							

Диффузаты собраны через 24 часа после заражения, за исключением вариантов, помеченных звездочкой (*), где это время составляло 48 часов.

В случае вертикально устойчивого сорте кипячение устраняло более 70% от исходного уровня ингибирования прорастания, а на токсичность диффузатов частично устойчивого сорта действовало слабо или совсем не действовало (табл. 3).

Таблица 3. Раздельное влияние СОД, тиомочевины и кипячения*
 на фунгитоксичность диффузатов зараженных листьев

Сорта	Штаммы, расы, гены вирулентности						
	Н-5-3, Раса 007	КП-69, Раса 037.03		F 67-57, Раса 047		КК-37, Раса	КП-57, Раса
		24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	137.5	137.7
Sha-tiao-tsao	не влияет	не влияет	не влияет	не влияет	-	не влияет	не влияет
Tadukan	полно- стью устра- няет	полно- стью устра- няет	полно- стью устра- няет	не влияет *	полно- стью устра- няет	полно- стью устра- няет	снижает не ме- нее чем на 70%
Zenith	полно- стью устра- няет	-	-	-	-	полно- стью устра- няет	-
CNAB kweichow	снижает не более чем на 30%	не влияет	снижает не более чем на 30%	снижает не более чем на 30%**	-	не влияет	снижает не ме- нее чем на 70%
Shimokita	не влияет	-	-	-	-	не влияет	не влияет
Norin 18	не влияет	-	-	-	-	-	-
China 1039	снижает не более чем на 30%	-	-	-	-	снижает не более чем на 30%	-

*Кипячение в отмеченном варианте имеет иное действие - "полностью устраняет";

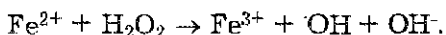
** То же - "не влияет".

Свет усиливал токсичность диффузатов восприимчивого и вертикально устойчивого сортов, а СОД полностью устраняла ее. В случае частично устойчивых сортов влияния света не обнаружено (табл.4).

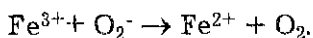
 Таблица 4. Влияние света на фунгитоксичность диффузатов
 зараженных листьев (инокулом и тест-объект: штамм Н-5-3)

Сорта	Эффект	Сорта	Эффект
Sha-tiao-tsao	Усиление по O_2^- - зависимому механизму	Shimokita	не влияет
Tadukan	Усиление по O_2^- - зависимому механизму	Norin 18	не влияет
Zenith	Усиление по O_2^- - зависимому механизму	China 103	Снижает не более чем на 30%
CNAB kweichow	Не влияет		

Действие антиокислительных агентов указывает на участие активных форм кислорода в механизме как вертикальной, так и частичной устойчивости. В обоих случаях токсичность листовых диффузатов была связана с перекисью водорода и гидроксильным радикалом. Последний, возможно, образуется при взаимодействии перекиси водорода и ионов металлов переменной валентности, например, железа (реакция Фентона) (Halliwell, Gutteridge, 1984):



Участие ионов железа в токсических эффектах диффузатов во всех случаях подтверждается сильным защитным действием десферриоксамина, специфического хелатора Fe^{3+} (Пасечник и др., 1995). Ионы железа, чтобы выполнять каталитическую функцию, нуждаются в ревосстановлении. В диффузатах вертикально устойчивого сорта донором электронов, вероятно, является супероксид (поскольку СОД почти полностью устраняла токсичность):



В диффузатах частично устойчивых сортов, по-видимому, действуют иные восстановители.

Гидроксильный радикал у вертикально и частично устойчивых сортов образуется по-разному. Возможно, у последних это происходит сайт-специфично (Czapark et al, 1984), в структурах, недоступных для другого перехватчика $\text{OH}\cdot$, тиомочевины.

АФК в растениях образуются в ходе различных ферментативных и неферментативных реакций. Неучастие ферментов в механизме токсичности диффузата листьев сорта Shimokita согласуется и с отсутствием влияния протеиназы К на эти свойства. С другой стороны, токсичность того же диффузата полностью исчезала после диализа и, следовательно, зависела от низкомолекулярных соединений (Пасечник и др., 1995).

Активация кислорода может происходить за счет фотосенсибилизаторов (Foote, 1987). Подобные вещества, по-видимому, выделяются листьями вертикально устойчивого и в значительно меньшей степени - восприимчивого сортов, и действуют по O_2 -зависимому механизму. В то же время подобной светозависимой активации кислорода не наблюдается у частично устойчивых сортов.

Таким образом, показателем устойчивости риса к пирикулярриозу (и вертикальной, и частичной) является сильное ингибирование прорастания спор гриба в диффузатах зараженных листьев. При этом у сортов, содержащих гены частичной устойчивости, фунгитоксичность диффузатов не устраняется (или ослабляется незначительно) кипячением, супероксиддисульфатом или тиомочевинной и усиливается действием света.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОРТОВОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РИСА
К ШРИКУЛЯРИОЗУ ПО СТЕПЕНИ ФУНГИТОКСИЧНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЙ ЛИСТЬЕВ
И ВЛИЯНИЮ НА НЕЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ

Реактивы и оборудование

Реактивы: агар, вода дистиллированная или деионизованная, тиомочевина, толуидиновый синий, медь-цинковая, супероксиддисмутаза, перманганат калия.

Оборудование: - капледержатели (Аверьянов, Лапкива, 1989),
- концентратор суспензий с плавающим фильтродержателем (Лапкива, Аверьянов, 1992) или центрифуга,
- дозирующие пипетки,
- микроскоп (предпочтительно инвертированный),
- перистальтический насос или шприц на 10 мл,
- ячеистые пластины для культур тканей или покровные стекла,
- счетчик форменных элементов крови,
- термостаты на 23 и 28°C,
- инокуляционные камеры (рис.1а),
- фильтрующие каплесборники (рис.1б),
- чашки Петри (пластмассовые и стеклянные).

Растворы: - водный раствор тиомочевины, 0.5 мМ,
- спиртовой раствор толуидинового синего (0.1 мг/мл) или чистый спирт,
- водный раствор супероксиддисмутазы (100 мкг/мл).

Принцип метода

Предлагаемая методическая разработка основана на том, что выделения листьев устойчивых сортов подавляют развитие спор возбудителя и в этом участвуют активные формы кислорода. Определяя токсичность и влияние на нее некоторых факторов (кипячение, СОД, тиомочевины и света), можно предварительно оценить тип устойчивости. Методика включает несколько этапов.

Культивирование гриба

Гриб выращивают при 28°C в темноте в чашках Петри на агаризованном морковном отваре. Для получения последнего в 1 л водопроводной воды кипятят 50 г сухой моркови, к отвару добавляют 20 г агара. Среду автоклавируют 40 мин при 1 атм.

Получение спор

Споры получают, смывая грибок с поверхности агара. Остатки ми-

целия удаляют фильтрованием через 2 слоя металлической сетки (для этого лучше использовать специальную многоступенчатую воронку (Аверьянов, Лапикова, 1991)). Споры однократно промывают при помощи концентратора суспензий с плавающим фильтродержателем (Лапикова, Аверьянов, 1992). После промывки суспензию концентрируют до заданной концентрации. Можно также центрифугировать суспензию (15 мин, 7000 г, при 4°C (Аверьянов и др., 1987)), но первый способ удобнее.

Выращивание растений

Семена риса стерилизуют в растворе перманганата калия и промывают водопроводной водой. Их проращивают 3 суток при 28°C в чашках Петри с увлажненными бумажными фильтрами на дне и крышке. Проростки пересаживают в вазоны диаметром около 10 см с почвой, которые помещают в поддоны с водой. Подкормку мочевиной (0.2 г/л) проводят через 12-14 дней после посева. Растения можно выращивать в теплице, но лучше - в климатической камере, поскольку частично устойчивые сорта чувствительны к внешним условиям (Roumen, Boef, 1993). Условия выращивания: день - 12 часов, освещенность 15-30 клк, 28-30°C; ночь - 12 часов, 20-23°C. Относительная влажность воздуха - выше 80%.

Инокуляция листьев

Инокуляцию проводят на четвертом полностью развернувшемся листе целых растений. Листья укладывают горизонтально в инокуляционных камерах, изготовленных из пластмассовых чашек Петри (рис. 1а). В дне чашек (1) сделаны два параллельных ряда наклонных прямоугольных прорезей (2) и три отверстия (3). Чашку (1) без крышки удерживают наклонно над растениями с помощью изготовленного из жести держателя. Он имеет вид разорванного на одну треть кольца (5). В верхней части кольца напротив разрыва имеется выступ (6), а в нижней - несколько упоров (7). Выступ служит для соединения держателя со штативом (на рисунке не показан). Наиболее удобен штатив типа чертежной лампы с гибким или пантографическим кронштейном.

Держатель действует следующим образом. Чашку (1) без крышки вкладывают сверху в кольцо (5) и ставят на упоры (7) так, чтобы два ряда прорезей в дне чашки были перпендикулярны оси симметрии держателя. Чашка должна располагаться над вегетационным сосудом с растениями немного выше ножек (4). Выступ (6) изгибают таким образом, чтобы чашка была удобно направлена к экспериментатору.

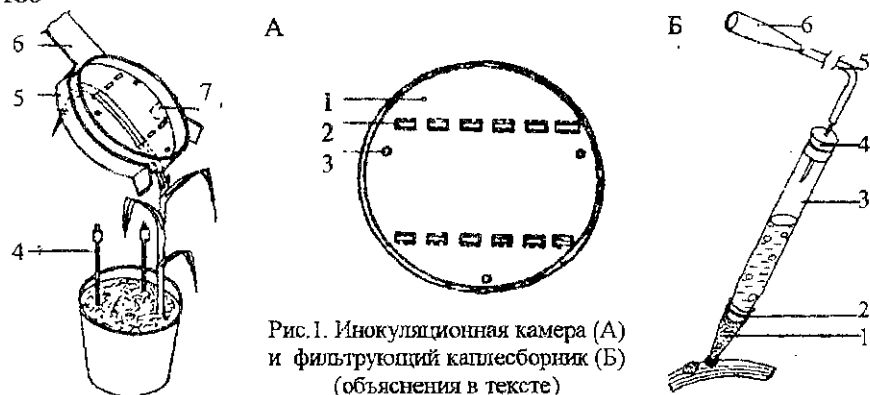


Рис. 1. Инокуляционная камера (А) и фильтрующий каплеборник (Б) (объяснения в тексте)

Концы листьев вводят в чашку через прорези (2) нижнего ряда и выводят наружу через прорези верхнего ряда так, чтобы между рядами прорезей оказался участок листа, подлежащий инокуляции. На прорези с выходящими из них листьями кладут изнутри две полосы влажной фильтровальной бумаги, чтобы уменьшить подвижность листьев. После этого держатель поворачивают и опускают так, чтобы горизонтально установить чашку отверстиями (3) на ножки (4). Концы держателя раздвигают и горизонтально смещают его так, чтобы чашка, оставаясь на ножках, вышла через разрыв в кольце.

Над иммобилизованными таким образом листьями устанавливают тefлоновый капледержатель (Аверьянов, Лапикова, 1989). С его помощью на листья наносят капли суспензии спор (100 тыс. спор/мл, по 3 шт., по 20 мкл). Чашку закрывают крышкой, к которой для локального увлажнения прикрепляют влажный бумажный фильтр. В каждом варианте используют 3 сосуда по 8 растений.

После инокуляции растения выдерживают в темноте при 23°C (влажный термостат) и собирают инфекционные капли (см. "Получение диффузатов"). Для фитопатологической оценки капледержатели и инокуляционные камеры снимают. Растения возвращают в климатическую камеру или теплицу и на 7-й день после инокуляции учитывают визуальные симптомы болезни. Прорастание инокулома (см. ниже) должно быть не менее 60%.

Определение прорастания спор

Споры в воде или диффузате (в объемах по 100 мкл) проращивают в лунках разрезанной на 3 части ячеистой пластины, помещенной в увлажненную чашку Петри. При наличии инвертированного микроскопа пластину используют, как препарат. Если же имеется только обычный микроскоп, то часть споровой суспензии после инкубации в ячеистой пластине переносят для наблюдения на

предметные стекла. В отсутствии ячеистых пластинок капли суспензии с самого начала инкубируют на предметных стеклах в тех же условиях. Суспензию выдерживают 5 часов при 23°C в темноте и фиксируют спиртовым раствором толуидинового синего или просто спиртом. Подсчитывают с помощью счетчика форменных элементов крови долю проросших спор (то есть у которых длина ростовой трубки превышает длину самой споры) в пяти выборках по 100 шт. Вычисляют средние арифметические и их среднеквадратичные отклонения.

Получение диффузатов листьев

Диффузаты получают из споровой суспензии, инкубированной на листьях 24 и 48 часов, как указано выше. Капли собирают с одновременным удалением спор инокулюма с помощью каплесборников (рис. 1а).

Проверка фунгитоксичности диффузатов зараженных листьев

Для определения фунгитоксичности диффузатов в каждую лунку ячеистой пластины вносят по 10 мкл свежеполученной суспензии спор (350 тыс./мл - исходная концентрация) и воду. Затем добавляют 80 мкл диффузата или воды. В качестве тест-объекта используют штамм, которым заражали листья. Споры в диффузатах инкубируют, как описано выше, и подсчитывают прорастание спор. Ингибирование прорастания ($A_{\%}$) рассчитывают в процентах к контролю (прорастание в воде) по формуле:

$$A_{\%} = 100(C-B)/(C-D),$$

где В - прорастание спор в диффузате, %; С - прорастание спор в воде, %; D - исходное (до инкубации) прорастание спор, %.

Для каждого варианта вычисляют средние арифметические и их среднеквадратичные отклонения.

Указанным способом определяют токсичность диффузатов, полученных через 24 часа после инокуляции. Если она сравнительно низка (30-40%), анализ повторяют с диффузатом, полученным за 48 часов. У устойчивых сортов ингибирование прорастания превышает 50% хотя бы в один из дней.

Изучение влияния некоторых факторов на токсичность диффузатов зараженных листьев

Прорастание спор в диффузатах определяют как описано выше с тем отличием, что вместо 10 мкл воды добавляют такой же объем

раствора супероксиддисмутазы или тимочевины. Кроме того, испытывают фунгиотоксичность диффузата после кипячения (30 мин на водяной бане) и охлаждают до комнатной температуры.

Для проверки влияния света диффузат разбавляют в 5 раз. Добавляют споры, освещают материал (10 клк в течение 1 часа в климатической камере), а затем 4 часа инкубируют его в темноте и определяют токсичность диффузата.

Согласно результатам наших испытаний, у сортов, обладающих частичной устойчивостью, токсичность диффузатов зараженных листьев не ослабляется кипячением, СОД или тиомочевинной (или ослабляется не более чем на треть). Свет не усиливает токсичность диффузатов частично устойчивых сортов. Желательно испытывать одни и те же сорта с несколькими расами гриба.

Таким образом, по данному признаку можно предварительно дифференцировать сорта с разными типами болезнеустойчивости.

Литература

Аверьянов А.А. Активные формы кислорода и иммунитет растений. /Успехи современной биологии, 111, 5, 1991, с.722-737.

Аверьянов А.А., Лапикова В.П. Фунгиотоксичность выделений листьев риса, обусловленная активными формами кислорода. /Физиология растений, 35, 6, 1988, с.1142-1151.

Аверьянов А.А., Лапикова В.П. Простые устройства для работы с капельными диффузатами растений. /Биологические науки, 9, 1989, с.107-111.

Аверьянов А.А., Лапикова В.П. Лабораторный экспресс-метод определения устойчивости риса к пирикулярриозу. М., ВНИИФ, 1990.

Аверьянов А.А., Лапикова В.П., Уминов А.М., Джавахия В.Г. Генерация листьями риса радикала O_2^- в связи с устойчивостью к пирикулярриозу. /Физиология растений, 34, 2, 1987, с.373-379.

Вандерпланк Я. Генетические и молекулярные основы патогенеза у растений. М., 1981, 236 с.

Гешеле Э.Э. Основы фитопатологической оценки в селекции растений. М., 1978, 208 с.

Коваленко Е.Д., Наскидашвили Ж.Г., Коломиец Т.М. Методические указания по оценке полевой устойчивости риса к возбудителю пирикулярриоза. М., ВНИИФ, 1990, 154 с.

Коломиец Т.М., Коваленко Е.Д. Особенности генотипа устойчивости к пирикулярриозу у сортов риса из разных регионов мира. /Генетика, 31, 3, 1995, с.382-384.

Лапикова В.П., Аверьянов А.А. Концентратор с плавающим фильтродержателем для биологических суспензий. /Физиология растений, 39, 3, 1992, с.613-617.

Лапикова В.П., Аверьянов А.А., Петелина Г.Г., Коломиец Т.М., Коваленко Е.Д. Фунгиотоксичность выделений листьев риса, связанная с сортовой устойчивостью к пирикулярриозу. /Физиология растений, 41,1, 1994, с.123-129.

Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. /Итоги науки и техники. Сер. физиология растений. М.: ВИНТИ, 1989, с.167.

Николаев О.Н., Аверьянов А.А. Участие супероксидного радикала в механизме фунгицидного действия фталида и пробеназола. /Физиология растений, 38, 3, 1991, с.512-520.

Пасечник Т.Д., Аверьянов А.А., Лапикова В.П., Коваленко Е.Д., Чернова Н.А. Фунгитоксичность выделений листьев риса, вызванная активированным кислородом и связанная с частичной устойчивостью к пирикулярриозу. /Физиология растений, 42, 3, 1995, с.377-384.

Чкаников Д.И., Гринченко С.Г., Артеменко Е.Н. Биохимическая оценка степени частичной устойчивости пшеницы к стеблевой и бурой ржавчине. Москва: ВАСХНИЛ, 1990, 24 с.

Якубов Б.А., Чкаников Д.И. Накопление полиолов в листьях сортов риса с различной устойчивостью к пирикулярриозу как показатель степени совместимости растения-хозяина и патогена. /С.-х биология, 1, 1993, с.162-163.

Agrios G.N. Plant pathology. San Diego, London: Academic Press Inc., 1988, 803 p.

Aver'yanov A.A., Lapikova V.P., Dzhavakhiya V.G. Active oxygen mediates heat-induced resistance of rice plant to blast disease. /Plant Science, 92, 1, 1993, p.27-34.

Brake V.M., Irwin J.A.G. Partial resistance of oats to *P.coronata* f.sp. *avenae*. /Aust. J. Agric. Res, 43, 5, 1992, p.1217-1227.

Brondy U., Zapata J.C., Nelson R.R. Evaluation of rate-limiting resistance to blast disease in rice cultivars using sub-lethal concentration of a systemic fungicide. /The Journal of Phytopathology, 122, 2, 1988, p.174-180.

Chin K.M., Amin S.M. Resistance of detached organs of the rice plant to the blast disease. /MADRI Research Bulletin, 11, 3, 1983, p.385-388.

Czapski G., Aronovitch J., Chevion M. On the mechanisms of cytotoxicity induced by superoxide. /Oxygen radical in chemistry and biology. Berlin: Walter de Gruyter & Co., 1984, p.225-229.

Dainello F.J. Control of white rust of spinach with partial resistance and multiple soil application of metaxyl granules. /Plant Disease, 74, 11, 1990, p.913-916.

Dall H., Bay H., Holm U., Sgaard B. Phenolic compounds in barley varieties with different degree of partial resistance against powdery mildew. Abstract L 13. /Natural phenols in plant resistance. Abstracts of the international symposium. Munich: Technical University, 1993.

Foote C.S. Type I and type II mechanisms of photodynamic action. /Light-activated pesticides. Eds: Heitz J.R. and Downum K.R. Washington, DC: Am. Chem. Soc., 1987, p.22-38.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. /Biochem. J., 219, 1, 1984, p.1-14.

Hyde P.M., Elahinia S.A. The expression of partial resistance to *Puccinia striiformis* in wheat. Effect on colony growth and spore production. /The J. of Phytopathology, 129, 3, 1990, p.203-209.

Iwakuma T., Matsuyama N., Wakimoto S. Reaction of protoplasts originated from rice varieties of different horizontal resistance against hyphal cell wall components of *Pyricularia oryzae*. /Annals of the Phytopathological Society of Japan, 57, 1, 1991, p.53-56.

Kaur S., Kaur P., Padmanabhan S.Y. Inheritance of resistance to *Pyricularia oryzae* Cav. at penetration and establishment phase. /Indian Phytopathology, 37, 1, 1984, p.100-106.

Latterel F.M., pMarchetti M.A, pGrove B.R. Coordination of effort to establish an international system for race identification in *Pyricularia oryzae*. /The rice blast disease. Proc. of a Symp. at the Internat. Rice Research Institute, p.July 1965. Ed: Chandier R.F. Baltimore; The Johns Hopkins Press, 1965, p.257-274.

Luke H.H., Barnett R.D., Pfahler P.L. Postpenetration development of *Puccinia coronata avenae* in slow- and fast-rusting cultivars of *Avena byzantina*. /Phytopathology, 74, 8, 1984, p.899-903.

Matsuyama N. On the detection of momilactones A and B in healthy and blast-infected rice leaves by GLC. /Annals of the Phytopathological Society of Japan, 49, 2, 1983, p.200-205.

Mehdy M. Active oxygen species in plant defense against pathogens. /Plant Physiology, 105, 2, 1994, p.467-472.

Newton A.C. Measuring the sterol content of barley leaves infected with powdery mildew as a means of assessing partial resistance to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. /Plant Pathology, 38, 4, 1989, p.534-540.

Niks R.E. Comparative histology of partial resistance and the nonhost reaction to leaf rust pathogens in barley and wheat seedlings. /Phytopathology, 73, 1, 1983, p.60-64.

Niks R.E. Failure of haustorial development as a factor in slow growth *Puccinia hordei* in partially resistant barley seedling. /Physiol. Mol. Plant Pathol., 28, 1986, p.309-322.

Niks R.E., Kuipper H.J. Histology of the relation between minor and major genes for resistance of barley to leaf rust. /Phytopathology, 73, 1, 1983, p.55-59.

Osman-Ghani N., Manners J.G. Component of partial resistance to *Puccinia striiformis* in barley. /Plant Pathology, 34, 1, 1985, p.75-82.

Parlevliet J.E. Strategies for the utilisation of partial resistance for the control of cereal rusts. /Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat. Mexico: CIMMYT, 1988, p.48-62.

Rashid K.Y. Evaluation of components of partial resistance to rust in flax. /Canadian Journal of Plant Pathology, 13, 3, 1991, p.212-217.

Roumen E.C., de Boef W.S. Latent period to leaf blast in rice and its importance as a component of partial resistance. /Partial resistance in rice to blast and how to select for it. Ed: Roumen E.C. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1993, p.31-38.

Roumen E.C., de Boef W.S. Inheritance of host plant effect on the relative infection efficiency of *Magnaporthe grisea* in rice cultivars. /Partial resistance in rice to blast and how to select for it. Ed: Roumen E.C. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1993a, p.61-72.

Roumen E.C., de Boef W.S. Responce to selection for high and low partial resistance to leaf blast in F₂ populations of three rice crosses. /Partial resistance in rice to blast and how to select for it. Ed: Roumen E.C. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1993b, p.73-79.

Simmonds N.W. A plant breeder's perspective of durable resistance. /FAO Plant Protection Bulletin, 33, 1, 1985, p.13-17.

Villareal R.L., Nelson R.R., MacKenzie D.R., Coffman W.R. Some components of slow-blasting resistance in rice. /Phytopathology, 71, 6, 1981, p.608-611.

Yeh W.H., Bonman J.M. Assesment of partial resistance to *Pyricularia oryzae* in six rice cultivars. /Plant Pathology, 35, 1986, p.319-323.

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И УЧЕТА ФОМОПСИСА ПОДСОЛНЕЧНИКА

В.И.Якуткин

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Серая пятнистость стеблей (бурая пятнистость, темно-серая пятнистость, стеблевой рак, ломкость стеблей, ожог подсолнечника, фомопсис и т.д.) в настоящее время является одним из наиболее вредоносных, интенсивно распространяющихся заболеваний подсолнечника в мире. На культурном подсолнечнике в Европе это заболевание впервые единично было отмечено в югославской провинции Воеводина в 1960 г. (Adimović et al.,1981). В последующие годы на фомопсис не обращали внимания, пока он в 1979-1981 гг. не вызвал сокрушительные потери урожая, которые в отдельных местах достигали 100% (Mihaljević et al.,1980; Marić et al.,1980). Последствия опустошительной эпифитотии болезни ощущались на производстве подсолнечника в Югославии продолжительное время (Marić et al.,1987). В дальнейшем болезнь была зарегистрирована в Румынии (Piescu et al.,1983), Венгрии (Vörös et al.,1985), Франции (Regnault,1985) и других странах Западной и Центральной Европы. Фомопсис появился на Ближнем Востоке (Madjidieh-Gassemi,1988). В США на фомопсис обратили внимание в 1975 г., когда в штате Миннесота его распространенность достигла 40% (Laville,1986). В других штатах он также начал причинять ощутимый вред (Herr et al.,1983; Yang et al.,1984). В СССР фомопсис подсолнечника появился в 1985 г. в Закарпатской области УССР (Богданова и др.,1986). В дальнейшем проявление болезни отмечалось в Молдавии и других районах Украины (Скрипка,1989; Якуткин и др.,1991).

В России фомопсис впервые обнаружен в 1990 г. (Якуткин,1991) в колхозе им. В.И. Ленина Предгорного района Ставропольского края на площади 5 га с распространенностью до 3% в семеноводческом посеве линий первого отечественного гибрида подсолнечника Полевик, созданного во Всесоюзном НИИ селекции масличных культур. Семена для посева были завезены из Краснодарского края (ОПХ ВНИИМК "Березанское"). Очевидно, что фомопсис подсолнечника в Краснодарском крае появился значительно раньше, после чего он с семенным материалом был завезен в Ставропольский край. В настоящее время это заболевание, являясь объектом внутреннего карантина, повсеместно распространилось на Северном Кавказе, нарастает в Центральной Черноземной Зоне, особенно в Белгородской области; в 1996 г. болезнь появилась в Поволжье (Волгоградская область) и в 1997 г. - на Южном Урале. В настоящее время фомопсис проявляется на площади более 2 млн. га с распространенностью от 0.01% до 100% при посевной площади подсолнечника в стране около 4 млн. га (Якуткин,1998).

Фомопсис, являясь относительно новым заболеванием подсолнечника в России, при идентификации представляет определенные сложности для многих специалистов по защите и карантину растений. Поэтому предлагается более подробная характеристика биологических и экологических особенностей возбудителя болезни, конкретные методы диагностики, специфика проявления, определения градаций поражения растений заболеванием и его учета в посевах и в семенном материале.

Этиология болезни

Возбудитель серой пятнистости стеблей подсолнечника является представителем сумчатых грибов (Ascomycetes) из р. Diaporthe, был описан Т. Нитшке в 1867 г. (Wehmeyer, 1933). Эти грибы формируют округлые перитеции с удлинённой верхушкой (носи́ком) в подушковидной, плохо выраженной стро́ме, окруженной черной полоской.

В перитециях образуются сумки, в каждой из которых находится по 8 двуклеточных, бесцветных, удлинённых аскоспор. Отдельные представители этого рода имеют конидиальную стадию типа Phomopsis.

Wehmeyer (1933), проведя ревизию представителей рода Diaporthe Nitschke, указывает, что на подсолнечнике (*Helianthus annuus* и *H. giganteus*) и некоторых видах травянистой растительности встречаются виды *Diaporthe arctii* и *D. arctii* var. *achillae*. Перитеции этих грибов сверху слегка сжатые, по форме - сферические, размером по диаметру 250-480 × 160-320 м (микрон), сумки булавовидные (47-60 × 7-10 м). В сумке находится восемь эллиптических аскоспор, каждая из которых имеет перегородку. Длина одной аскоспоры может достигать 7.5 м. В цикле развития у *D. arctii* имеется бесполовая стадия с конидиальным спороношением типа Phomopsis. Конидии формируются на прямых и коротких конидиеносцах в пикнидах. В зрелых пикнидах может быть два типа конидий: α-споры и β-споры. Иногда их называют пикноспорами или стилоспорами. Споры одноклеточные, бесцветные, эллиптической формы с двумя характерными каплями жира (липидный комплекс). Длина α-спор может быть 21 м, ширина 5.5 м. β-споры также одноклеточные, бесцветные, но изогнутые и сильно удлинённые. Длина их может составлять 42.5 м, ширина 7 м. Как указывал Нитшке, у отдельных видов *Diaporthe* α-споры выполняют роль спермациев (Wehmeyer, 1933). Что касается патогенности указанных видов грибов к подсолнечнику, то сведения о ней в сводке Вехмеера отсутствуют.

При изучении этиологии массового поражения подсолнечника в Югославии неизвестным заболеванием возбудитель болезни был

идентифицирован как *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* (Muntaiola-Cvetković et al., 1981). Как *D. arctii* и *D. arctii* var. *achilaeae*, он формировал перитеции с носиком, в которых присутствовали двуклеточные аскоспоры, однако в пикнидах обнаружены только β -споры. Несмотря на имеющиеся различия между указанными видами грибов, обнаруженных на подсолнечнике, ряд исследователей считают их синонимами (Marić et al., 1987).

В 1990 г. в Ставропольском крае нами при изучении этиологии неизвестного заболевания подсолнечника возбудитель болезни был идентифицирован как *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* (Якуткин, 1991, 1993). Патоген в пикнидах формировал только β -споры. В дальнейшем при изучении заболевания в Краснодарском крае, Ростовской и Белгородской областях, в Поволжье и на Южном Урале в пикнидах указанного гриба мы обнаружили только β -споры. Таким образом, в России, как и в Югославии, возбудителем фомопсиса подсолнечника является гриб *Ph. helianthi*. В настоящее время среди микологов и фитопатологов преобладает мнение, что возбудителем фомопсиса подсолнечника является вид гриба, обнаруженный в Югославии. В связи с принятым систематическим положением гриба в его наименовании могут быть одновременно представлены сумчатая и конидиальная стадии: *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* или же только одна из стадий - *D. helianthi*, *Ph. helianthi*.

Виологические особенности возбудителя фомопсиса подсолнечника

Основным источником инфекции возбудителя фомопсиса подсолнечника являются аскоспоры, находящиеся в перитециях. Перитеции формируются на перезимовавших в поле пораженных растительных остатках. Выход аскоспор из перитециев (эмиссия) происходит в виде белой массы, которая концентрируется на носиках плодовых тел. Эмиссия у отдельного перитеция происходит в течение 17 суток. Ее пик наблюдается на 5-6-ой день после начала. Выход аскоспор из перитециев может начинаться в апреле и заканчиваться в августе, что указывает на разные сроки созревания отдельных перитециев в популяциях патогена. Наиболее интенсивно эмиссия аскоспор происходит с середины мая до середины июля.

Заражение подсолнечника аскоспорами, как правило, происходит в фазу 4-12-ти настоящих листьев и позже при температуре воздуха от 15 до 30°C и относительной его влажности не ниже 50%. Кратковременные дожди в этот период способствуют более сильному заражению. Инкубационный период болезни в зависимости от температуры воздуха может продолжаться от 10 до 20 суток.

На пораженных частях подсолнечника, преимущественно на стеблях и реже на семенах, возбудитель болезни формирует кони-

диальную стадию в виде пикнид, в которых присутствуют β -споры. Массовое появление β -спор, выходящих из пикнид в виде светло-желтого шлейфа, происходит в конце вегетации во влажных условиях. Полагаем, что в этот период происходит вторичное заражение подсолнечника β -спорами. В условиях эксперимента, при искусственном заражении стеблей β -спорами нам удавалось вызывать типичные симптомы фомопсиса подсолнечника (Якуткин, 1993).

В полевых исследованиях в Ставропольском крае (Якуткин, 1991), а затем в Белгородской области в течение 1993-1997 гг. было установлено, что дополнительным источником инфекции возбудителя болезни являются зараженные семена. Так, в 1995 г. на Белгородской опытной станции ВНИИМК на коллекционных посевах подсолнечника, семена которого были присланы из Франции, Венгрии, Болгарии, США, ВНИИМК (Краснодар), Фирмы Каргел (Краснодарский край), Донской опытной станции ВНИИМК (Ростовская область), поражение растений фомопсисом достигало 3% и более. На посевах подсолнечника местной репродукции Белгородской ОС в том же году заболевание отсутствовало. Специалисты Всероссийского НИИ карантина растений также считают, что зараженные семена - это один из источников инфекции фомопсиса подсолнечника в России (Скрипка, 1991; Сметник и др., 1998).

Таким образом, наряду с аскоспорами, зараженные семена способствуют распространению фомопсиса в новые районы, где он ранее отсутствовал. После переживки пораженных растений подсолнечника в поле происходит дальнейшее, но более интенсивное нарастание болезни за счет инфекции аскоспор. Поэтому бесконтрольное повсеместное распространение зараженного посевного материала подсолнечника в России может привести к непоправимым последствиям. Однако, роль семенной инфекции в распространении этой болезни некоторые исследователи продолжают оспаривать (Михальчевич, 1996; Слюсарь и др., 1998).

Оптимальная температура для роста и формирования пикнид возбудителя фомопсиса, как установлено экспериментально, находится около 25°C (Якуткин, 1993). При температурах 5, 10 и 30°C наблюдается крайне замедленный рост и развитие гриба, а при 35°C его рост прекращается. На среде Чапека при 25°C начало образования пикнид наблюдается через 8 дней, а через 20 дней после посева гриба образуется их максимальное количество. В наших опытах в одной пикниде содержалось в среднем 1172 тыс. β -спор. Некоторые исследователи полагают, что чем больше в пикнидах образуется β -спор, тем интенсивнее формируются перитеции с аскоспорами на пораженных растительных остатках (Maric et al., 1987). А.А.Ячевский (1933) отмечал, что имеется ряд случаев, например у видов *Diaporthe*, *Valsa*, когда конидиальная стадия образуется внутри стромы и постепенно заменяется перитециями.

Как показали наши исследования, фомопсис наиболее интенсивно поражает подсолнечник в тех местах, где в течение двух и более месяцев вегетации при кратковременных увлажнениях среднесуточная температура воздуха превышает 20°C. В России вероятность наибольшего поражения подсолнечника фомопсисом может быть на Северном Кавказе, в Центральной Черноземной Зоне (Белгородская, Воронежская и южная часть Тамбовской области), в Поволжском регионе (Волгоградская, Саратовская и Самарская области), а также на Южном Урале. Это заболевание подсолнечника следует ожидать и в более северных районах России, однако здесь его вредоносность, возможно, будет несколько меньшей.

Диагностические признаки фомопсиса подсолнечника

Время появления фомопсиса на подсолнечнике зависит от источников инфекции. Наиболее раннее проявление болезни следует ожидать при заражении его аскоспорами. При посеве зараженными семенами заболевание проявляется значительно позже - в фазу полного цветения или созревания.

Аскоспоры гриба, инфицируя края нижних листьев подсолнечника, вызывают на них темно-бурые некрозы в виде правильных или неправильных углов. Некрозы, как правило, развиваются в направлении черешков листьев и далее охватывают стебли. При интенсивном патогенезе жилки листа темнеют. На листьях могут появляться обесцвеченные или же темные участки с разрушенной паренхимой вследствие выделения грибом токсина. Пораженная ткань вокруг больных жилок листьев отмирает, листья усыхают, создавая впечатление ожога (отсюда название болезни - ожог подсолнечника). От пораженных листьев заболевание переходит на черешки, а затем на стебли. Аскоспоры могут сразу заражать стебли растений, от которых в дальнейшем поражаются листья. На стеблях в местах прикрепления пораженных черешков образуются некротические пятна с ярко-бурой окраской и четким ободком по краям. Некрозы контрастно выделяются на фоне зеленой окраски стеблей. Распространяясь по стеблю на несколько междоузлий, они приобретают вид маслянистых пятен (темно-серая пятнистость стеблей). В дальнейшем в центре этих пятен появляется пепельно-серая окраска (серая пятнистость стеблей), которая постепенно распространяется по всему некрозу.

На серых пятнах некротизированной ткани появляются пикниды, расположенные строчками или хаотически, вразброс. Появление пикнид - наиболее характерный признак поражения подсолнечника фомопсисом. Незрелые пикниды имеют темную (черную) окраску, зрелые приобретают светлый (золотистый) вид. Пикниды, как уже было указано, являются конидиальным спороношением гриба типа *Phomopsis*. Они представляют собой прижатые шаровидные образо-

вания. Зрелые пикниды на пораженных стеблях подсолнечника располагаются под эпидермисом в виде округлых образований желтого (золотистого) цвета, одиночно или скоплениями. После заражения подсолнечника единичные пикниды гриба появляются через 25-30 дней. По мере отмирания и подсыхания пораженных растений количество пикнид в инфицированной ткани увеличивается. Обычно они легко обнаруживаются в конце августа - начале сентября на пораженных усохших, пустотелых стеблях. В местах их наибольшей локализации эпидермис, отслаиваясь от других тканей, приобретает более светлую окраску. Поэтому на пораженных стеблях появляются светло-серые пятна разного размера, что облегчает выявление болезни.

При поражении стеблей восприимчивых образцов возбудитель болезни проникает в центральный цилиндр и разрушает его. При легком прикосновении к таким стеблям подсолнечника некротизированная ткань вдавливается - это еще один из характерных признаков поражения фомопсисом. Такие стебли легко ломаются, растения погибают (рак стеблей, ломкость стеблей). Этот признак существенно облегчает диагностику фомопсиса, особенно при смешанных инфекциях, когда стебли подсолнечника дополнительно поражены фомозом, серой гнилью, склеротинией, альтернариозом или другими болезнями (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительная характеристика симптомов фомопсиса и других болезней подсолнечника

Заболевание	Поражаемая ткань стеблей подсолнечника и наличие инфекции		
	Эпидермис	Кора с проводящими сосудами	Центральный цилиндр
Фомопсис	Пикниды, β-споры	Разрушены у восприимчивых сортов и гибридов	Разрушен полностью у восприимчивых сортов и гибридов
Фомоз	Пикниды, α-споры	Нет	Нет
Альтернариоз	Мицелий, споры	Нет	Нет
Пепельная гниль	Мицелий, микросклероции	Частично разрушены, мицелий, микросклероции	Полное или частичное разрушение, мицелий, микросклероции
Белая гниль	Белый мицелий, склероции	Разрушены, склероции	Разрушен, склероции
Серая гниль	Мицелий, споры, склероции	Мицелий	Нет
Вертициллез	Споры (во влажной камере)	Некроз сосудов, микросклероции	Некроз, микросклероции
Фузариоз	Мицелий, споры (во влажной камере)	Некроз сосудов	Частично разрушен, местами ткань окрашена или обесцвечена

При сильном развитии фомопсиса происходит поражение покровных тканей корзинок и находящихся в них семян, инфекция в которых может находиться как на поверхности, так и внутри. Заболевание на корзинках проявляется в виде темных, диффузных пятен. На плодовых оболочках пораженных семян появляются пикниды в виде светлых или темных точек. Внутри ядер семян инфекция, вероятно, присутствует в виде мицелия. Как правило, растения, появляющиеся из зараженных семян, через некоторое время могут погибать, иметь скрытые симптомы болезни в течение всей вегетации или же явно проявляться в фазе цветения или несколько позже непосредственно на стеблях в виде некрозов.

Окончательное заключение о поражении подсолнечника фомопсисом можно сделать только после выделения возбудителя болезни в чистую культуру и изучения его морфолого-культуральных признаков, а также, если необходимо, дополнительно следует провести искусственную инокуляции растений для воспроизведения исходных симптомов болезни.

Фитопатологический анализ пораженного подсолнечника и оценка вирулентных свойств возбудителя фомопсиса

Фитопатологический анализ подсолнечника, пораженного фомопсисом, является важным этапом в установлении этиологии болезни. Его проводят в два приема: 1) вначале визуально, а затем анатомическим методом выявляют характерные признаки болезни; 2) после этого выделяют возбудителя болезни в чистую культуру. При визуальном осмотре в местах предполагаемой или явной наибольшей концентрации пикнид делают ряд тонких срезов ткани под бинокулярной лупой при увеличении 14×2 ($\times 28$), удерживая левой рукой стебель, а правой рукой - острую бритву в горизонтальном положении; движениями бритвы вперед делают тонкие срезы ткани.

Готовые срезы препаратальной иглой переносят на предметное стекло и просматривают под бинокулярном при указанном увеличении. Аналогичным методом можно выявить заболевание на семенах, фиксируя их при этом в специальном устройстве для получения срезов. Пикниды на пораженных семенах, как правило, образуются на лузге в виде небольших бугорков, которые хорошо обнаруживаются под бинокулярном ($\times 28$ или $\times 56$).

Зрелые пикниды в тонких растительных срезах отделяют под бинокулярном ($\times 28$) острием двух препаратальных игл вместе с небольшим кусочком ткани, переносят на предметное стекло в каплю воды и покрывают покровным стеклом. Готовые препараты просматривают под микроскопом сначала при увеличении $\times 140$, а затем $\times 280$. Для того чтобы β -споры вышли из пикнид, следует несколько

раз осторожно нажать в поле зрения микроскопа препаровальной иглой на покровное стекло в месте их расположения. Под давлением β -споры из зрелых пикнид выходят в виде гиалинового шлейфа.

После обнаружения спор в анализируемом образце проводят изоляцию возбудителя болезни в чистую культуру. Для этого минимальные кусочки тонких срезов ткани подсолнечника с пикнидами помещают на полминуты для дезинфекции в 0.1% раствор азотнокислого серебра или в 96% этиловый спирт. Затем эти кусочки переносят в стерильную воду на пять минут для удаления дезинфектора. После этого, соблюдая стерильные условия, их размещают на поверхности твердой питательной среды (среда Чапека, картофельный агар и др.) и инкубируют при температуре 25°C. На четвертые сутки после начала роста мицелия грибок должен полностью заселить поверхность среды в чашках Петри, а через восемь суток появляются первые пикниды. На десятые сутки интенсивность их образования у отдельных штаммов значительно усиливается. Свободный выход β -спор из пикнид может происходить на 50-70-е сутки после посева гриба. Вначале эмиссия спор происходит в виде светло-желтых капель густой жидкости, находящихся на поверхности пикнид. Через некоторое время она усиливается, появляется шлейф маслянистой густой жидкости желтого цвета, содержащий β -споры.

Выделение возбудителя болезни в чистую культуру из семян подсолнечника проводят следующим способом. Вначале семена промывают не менее часа непрерывным током воды. Затем их ополаскивают пять-шесть раз кипяченой охлажденной водой и стерилизуют, погружая на полминуты в 0.1% раствор азотнокислого серебра или в 96% этиловый спирт. Еще раз промывают стерильной водой в течение 5 минут. После этого семена в асептических условиях размещают на питательной среде. В одну чашку Петри на поверхность среды помещают от 5 до 10 семян. Семена, находящиеся на среде в чашках Петри, инкубируют в термостате при температуре 25°C. Для выявления внутрисеменной инфекции фомопсиса используют отдельные ядра семян подсолнечника, размещая их на питательной среде и инкубируя в термостате указанным способом.

Примерно через пять суток на питательной среде из зараженных семян или ядер подсолнечника появляется прижатый белый мицелий возбудителя фомопсиса, который следует пересеять на эту же среду, но в другой чашке или пробирке для последующей идентификации возбудителя болезни.

На зараженных семенах подсолнечника, находящихся на голодном агаре или увлажненной фильтровальной бумаге (влажная камера), как указывают отдельные исследователи (Сметник и др., 1998), через 45-70 суток могут образоваться перитеции гриба с аскоспорами. При этом данные семена, находящиеся в указанных условиях, необходимо через 10-20 суток подвергать искусственному освеще-

нию (750 лк) до 8 часов, а через 20-25 суток выдерживать их от двух до трех суток при температуре 3-5°C.

Зараженность семян фомопсисом (Ph) определяют в процентах по формуле:

$$Ph = 100N/m, \quad (1)$$

где N - количество зараженных семян, m - количество проанализированных семян всего (здоровых и больных).

Достоверность результатов анализа семян на зараженность фомопсисом можно проверить с помощью следующей формулы (Кудрин и др., 1981; Федорова, 1989):

$$\chi^2 = n \cdot m (A_1^2 + A_2^2 + A_3^2 + A_4^2 + \dots + A_n^2 - N^2/n) / N(m-N), \quad (2)$$

где χ^2 - критерий Хи-квадрат, n - количество повторностей, $A_1, A_2, A_3, A_4, \dots, A_n$ - число зараженных семян по повторностям, N, m - обозначения в формуле (1).

Пример. Проведен анализ зараженности семян подсолнечника возбудителем фомопсиса в четырехкратной повторности. В каждой повторности взято 100 семян. По повторностям число зараженных семян составило: $A_1 = 20$ шт., $A_2 = 25$ шт., $A_3 = 25$ шт., $A_4 = 37$ шт. Другие показатели для расчета критерия χ^2 имеют следующие значения: $n = 4$, $m = 4 \times 100$, $N = 20 + 25 + 25 + 37 = 107$. По формуле (2) рассчитываем критерий χ^2 :

$$\begin{aligned} \chi^2 &= 4400(20^2 + 25^2 + 25^2 + 37^2 - 107^2/4) / 107(400-107) = \\ &= 4 \times 100(3019 - 2862.3) / 31315 = 8.0. \end{aligned}$$

Зараженность семян считается статистически достоверной, если вычисленное (фактическое) значение критерия χ^2 меньше табличного (теоретического). Значение теоретического критерия χ^2 зависит от числа степеней свободы $n-1$, где n - количество повторностей в опыте.

По таблице согласно числу степеней свободы и уровню вероятности определяется теоретическое значение χ^2 . Так, при уровне вероятности $\alpha = 0.001$, χ^2 для трех степеней свободы (при четырех повторностях, как в нашем примере) равен 16.27 (Литтл, Хиллз, 1982). В приведенном нами примере рассчитанный χ^2 имеет значение 8.0. Следовательно, фактическое значение критерия меньше теоретического ($8 < 16.27$), поэтому результаты анализа можно считать достоверными. По формуле (1) определяем зараженность семян фомопсисом:

$$Ph = 100N/m = 100 \times 107/400 = 26.75 = 27\%.$$

Если результаты анализа зараженности семян подсолнечника фомопсисом оказались недостоверными, то следует увеличить число повторностей до уровня χ^2 фак. < χ^2 теор. В случае, когда во всех повторностях анализа число зараженных семян больше числа здоровых семян, для расчета критерия используется количество здоровых семян. Критерий χ^2 не применяется для оценки достоверности анализа, если общее количество зараженных семян во всех повторностях не превышает 5 шт.

Если возникли сомнения в достоверности диагноза болезни, следует обратиться к специалистам-фитопатологам. Направляемые образцы подсолнечника должны быть предварительно высушены при комнатной температуре, а затем уложены в вату, обернуты фильтровальной бумагой и снабжены соответствующей этикеткой. Для пересылки их помещают в деревянные или картонные ящики, но не в полиэтиленовые пакеты. Не следует посылать невысушенные образцы, так как они быстро гнивают и их дальнейший анализ осуществить невозможно.

Вирулентные свойства различных штаммов гриба *Ph.helianthi* и степень устойчивости подсолнечника к ним можно оценивать методом искусственной и естественной инокуляции растений. Искусственную инокуляцию подсолнечника осуществляют в фазу бутонизации чистой культурой гриба или методом опрыскивания растений его аскоспорами. При заражении чистой культурой возбудителя болезни на стеблях, примерно на 1/3 их высоты от уровня почвы, делают неглубокие продольные надрезы ткани и препаровальной иглой вводят туда небольшие кусочки среды с 8-10-суточной культурой гриба. На одном стебле достаточно одной точки инфекции. Место введения инокулома покрывают влажной ватой, а затем обертывают тонкой металлической фольгой, которая, находясь на стебле определенное время, предохраняет инфекцию от внешних воздействий. При оптимальных условиях видимые симптомы болезни на инокулированных стеблях появляются примерно через 10-15 дней.

Для опрыскивания подсолнечника водной суспензией аскоспор используют зрелые перитеции, сформировавшиеся на перезимовавших растительных остатках или выращенные на питательной среде. Оптимальная концентрация суспензии должна быть в пределах 10^4 аскоспор/мл (Perez et al., 1996). Опрыскивание растений суспензией аскоспор проводят в вечернее время. После инокуляции их следует выдержать до утра во влажной камере.

Естественную инокуляцию подсолнечника возбудителем болезни проводят методом размещения пораженных стеблей среди опытных растений. Пораженные стебли заготавливают после созревания подсолнечника и оставляют на открытом месте для перезимовки. Весной, после перехода температуры воздуха через 5°C при сухой погоде (5 дней без осадков и средней относительной влажности возду-

ха не более 45%) для стимулирования развития перитециев гриба на перезимовавших стеблях их следует периодически равномерно увлажнять.

Максимально инфицированные части стеблей, на которых сформировалось наибольшее количество перитециев, размещают в посевах подсолнечника в фазу 3-4 настоящих листьев из расчета: один отрезок пораженного стебля размером 15 см на один погонный метр посева. Для создания оптимальных условий заражения подсолнечника аскоспорами возбудителя болезни рекомендуется при засушливой погоде до смыкания рядков подсолнечника периодически обильно опрыскивать посеы водой.

В начале созревания подсолнечника вирулентные штаммы патогена разрушают центральный цилиндр стебля, что приводит к гибели растений (слом стеблей). Авирулентные штаммы образуют на стеблях небольшие, поверхностные, локальные некрозы, которые в дальнейшем могут исчезать в результате регенерации пораженной ткани.

Исследования показали, что популяции возбудителя фомопсиса подсолнечника являются гетерогенными по признаку вирулентности и представлены физиологическими расами (Якуткин, 1991). Реакция одной из них с эмпирическим тест-набором (дифференциаторами) показана в таблице 2.

Таблица 2. Реакция эмпирического тест-набора подсолнечника на заражение физиологическими расами возбудителя фомопсиса

Дифференциатор	Линия, сорт, гибрид	Реакция на заражение изолятами патогена	
		1	2
ВИР-130	Самоопыленная линия	У	У
ВИР-160	Самоопыленная линия	У	В
Солдор 220	Гибрид	В	М
Вейделевский 83	Гибрид	М	В
Везанский	Сорт	В	В

Примечание : У - устойчивость. На стебле образуются поверхностные ограниченные некрозы, иногда с темной окраской, которые при созревании подсолнечника могут исчезать. В - восприимчивость. Обширные некрозы проникают в стебель, разрушают центральный цилиндр, происходит слом стебля и гибель растения. М - промежуточная реакция. Несколько ограниченные поверхностные некрозы на стебле. Возможна некротизация внутренних тканей стебля без внешних видимых симптомов болезни (толерантность). Для выявления последнего типа реакции на заражение подсолнечника фомопсисом стебель нужно срезать у прикорневой шейки или разрезать его по всей длине.

Внутренняя (скрытая) некротизация стеблей подсолнечника при заражении фомопсисом - явление достаточно распространенное и на нее следует обращать внимание при диагностике заболеваний и оценке селекционного материала на устойчивость.

Вирулентные свойства штаммов гриба *Ph.helianthi*, как показавли последующие исследования, достаточно вариабельны не только к сортам и гибридам подсолнечника, но и к некоторым его видам (табл.3).

Таблица 3. Реакция видов *Helianthus ssp.* на заражение штаммами гриба *Ph.helianthi* (Slusar, Firaz, 1994)

Вид подсолнечника	Штаммы гриба <i>Ph.helianthi</i>		
	1	2	3
<i>H.tuberosus</i>	R	M	S
<i>H.molis</i>	S	M	S
<i>H.rigidus (coss)</i>	R	R	M
<i>H.argophyllus</i>	R	R	M

Для проведения целенаправленной селекции подсолнечника на устойчивость к фомопсису в настоящее время нужен новый тест-набор, с помощью которого можно осуществлять идентификацию генов вирулентности в популяциях гриба *Ph.helianthi*.

Учет фомопсиса подсолнечника

В полевых условиях аскоспоры гриба *Ph.helianthi* могут заражать подсолнечник в фазу 4-12 настоящих листьев, а иногда и ранее. После этого симптомы болезни, как правило, начинают проявляться в начале массового цветения растений. Поэтому первый учет болезни следует планировать в указанный период. Второй учет целесообразно провести после цветения или в начале созревания подсолнечника. Заключительный учет болезни должен быть в конце созревания культуры перед уборкой, когда заболевание проявляется наиболее четко. При учете фомопсиса определяют его распространенность (количество больных растений, %) и интенсивность проявления (развитие или степень поражения поверхности стеблей, листьев и корзинок в баллах или %). Распространенность болезни ($P_{\%}$) вычисляют по формуле:

$$P_{\%} = 100n/N, \quad (4)$$

где N - количество растений в выборке (больных и здоровых), n - количество больных растений в выборке.

Пространственное распределение болезни в посевах подсолнечника может быть равномерным или скопченным (агрегированным). Агрегированное распределение фомопсиса подчиняется закону отрицательного биномиального распределения. В этом случае дисперсия выборки растений будет больше средней арифметической

($s^2 > \bar{x}$). Для всех случаев пространственного распределения болезни в посевах подсолнечника рассчитана усредненная минимальная выборка растений для учета фомопсиса, которая должна содержать не менее 300 растений на отдельном посеве (поле) или массиве (сопряженные поля).

Учет болезни проводят путем отбора проб. Для упрощения расчетов в одной пробе желательно иметь 10 растений, соответственно на отдельном поле или массиве надо отобрать не менее 30 проб. Отбор проб на обследуемом участке осуществляется случайно по маршруту в виде латинских букв Z или W. Указанный объем выборки растений соответствует объему выборки при учете белой и серой гнилей, ложной мучнистой росы и других болезней подсолнечника (Якуткин, 1991). Поэтому кроме фомопсиса одновременно и достоверно можно учитывать и другие болезни.

При учете болезни можно корректировать объем выборки растений с помощью известной формулы (Зайцев, 1990):

$$N = 1/[(\Delta/t \times s)^2 + 1/No], \quad (5)$$

где N - оптимальное количество растений для учета болезни, Δ - допустимая погрешность средней выборки растений, t - критерий достоверности Стьюдента (при доверительном уровне $P=0.95$ $t=1.96$, при $P=0.99$ $t=2.58$ и $P=0.999$ $t=3.3$), No - общее количество растений, находящихся на обследуемой площади (тыс. шт/га \times площадь), s - среднее квадратическое отклонение количества больных растений, определяемое путем предварительных пробных учетов по формуле:

$$s = \sqrt{(\sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2 / (n-1))}, \quad (6)$$

где \bar{x}_i - среднее количество больных растений в i-выборке растений, \bar{x} - среднее количество больных растений во всех выборках растений, n - количество изученных выборок.

Интенсивность проявления или развития фомопсиса на подсолнечнике определяется по предлагаемой шкале в баллах, которые можно трансформировать в проценты поражения поверхности стеблей, листьев и корзинок:

0 балл - поражение отсутствует,

1 балл - некрозы на черешках и листьях (поражено до 25% поверхности),

2 балл - некрозы на листьях, стебле или корзинке (поражено до 50% поверхности),

3 балл - явно выраженные некрозы на листьях, стебле или на корзинке, увядание листьев (поражено до 75% поверхности),

4 балл - обширные некрозы на стебле, корзинке, увядание листьев (поражено до 100% поверхности),

5 балл - гибель растения или слом стебля (поражено 100% поверхно-

сти).

Усредненное развитие болезни (R) в баллах или % определяют по формуле:

$$R = \sum(a \times b)/N, \quad (7)$$

где $\sum(a \times b)$ - сумма произведений числа пораженных растений (a) в пробах на соответствующие балл или % проявления болезни (b) согласно принятой шкале, N - общее количество растений в выборке (здоровых и больных).

Развитие болезни на обследованных полях в хозяйстве, районе, области, крае и т.д. рассчитывают по формуле:

$$R_t = \sum(R_i \times s)/S, \quad (8)$$

где R_t - средневзвешенное развитие болезни на обследованной территории, балл или %, R_i - усредненное развитие болезни i-поля, i-района и т.д. ($i = 1, 2, \dots$), соответствующие им площади (s_i); S - общая обследованная площадь (га) хозяйства, района и т.д.

Для того чтобы иметь достоверные представления о распространенности фомопсиса в определенном хозяйстве, районе, области, крае, республике и стране, требуется обследовать соответственно не менее 10% посевной площади подсолнечника, как это принято в отношении других болезней полевых культур (Чумаков, 1971).

Влияние фомопсиса на урожай подсолнечника оценивают по его потерям, коэффициенту вредоносности, биологическому порогу вредоносности. Потери урожая от болезни (П) определяют в процентах, сравнивая продуктивность больных (Уб) и здоровых (Уз) растений (г, кг, ц, т), по формуле:

$$П\% = 100(Уз - Уб)/Уз. \quad (9)$$

Коэффициент вредоносности болезни (К) является относительным показателем и выражает потери урожая, приходящиеся на единицу поражения (балл, процент). Он позволяет установить размеры вреда, оценить экономическую эффективность мероприятий по защите подсолнечника, прогнозировать вред от болезни. Вычисление его проводят по формуле:

$$K = П/Рб, \quad (10)$$

где П - потери при соответствующей распространенности или развитии болезни, %; Рб - распространенность или развитие болезни, % или балл.

Биологический (статистический) порог вредоносности (БПВ) или порог сигнализации - это уровень проявления болезни, при котором начинают отмечаться статистически достоверные потери урожая подсолнечника. Дальнейшее нарастание заболевания приведет к

росту потерь урожая. БПВ определяют в % пораженных растений или в баллах по формуле (Сагитов и др., 1987) с некоторой ее модификацией:

$$\text{БПВ} = \Pi_1 + (\text{НСР} - \Pi_1) \times (P_2 - P_1) / (\Pi_2 - \Pi_1), \quad (11)$$

где Π_2 - показатель достоверного уровня потерь урожая при соответствующем проявлении болезни (P_2), Π_1 - ближайший преддостоверный показатель потерь урожая при соответствующем проявлении болезни (P_1), НСР - наименьшая существенная разность между показателями потерь урожая при соответствующих градациях поражения фомопсисом (с вероятностью $P=0.95$ или $P=0.99$).

Пример. На гибриде подсолнечника Санбред 254 при развитии фомопсиса в 5 баллов зарегистрированы следующие потери урожая ($\text{НСР}_{0,95}=2.6$):

распространенность болезни, %	потери урожая, %
5	2.4
10	8.7
15	13.8
20	18.0

В данном примере показатель достоверного уровня потерь урожая от фомопсиса составил 8.7% (Π_2), что соответствует 10% пораженных растений (P_2). Ближайший преддостоверный показатель потерь урожая равен 2.4% (Π_1) при 5% распространенности болезни (P_1). После расчета биологического порога вредоносности фомопсиса (БПВ) по формуле (11), его значение оказалось равным 5.2% пораженных (погибших) растений:

$$\text{БПВ} = 5 + (2.6 - 2.4) \times (10 - 5) / (8.7 - 2.4) = 5.2 \%$$

Как показали исследования, 5.2% погибших растений являются ориентировочным порогом вредоносности фомопсиса для других сортов и гибридов подсолнечника. Этот показатель рекомендуется использовать при экспертной оценке фитосанитарного состояния посевов подсолнечника, пораженных фомопсисом.

Для прогнозирования потерь урожая подсолнечника от фомопсиса (Y) можно использовать следующее уравнение:

$$Y\% = 1.516 + 0.895X \pm 1.23, \quad (12)$$

где X - доля растений, погибших от болезни в %.

Пример. На площади 500 га посевов подсолнечника в конце цветения распространенность фомопсиса составила 25% растений при средневзвешенном его развитии, равном 4 баллам. До уборки уро-

жая следует ожидать дальнейшее развитие болезни. Поэтому прогнозируемые потери урожая (Y) согласно уравнению (12) составят: $23.9\% \pm 1.23\%$ или при вероятности $P=0.95$ они могут быть в пределах от 22.7% до 25.2% :

$$Y_{\%} = 1.516 + 0.895 \times 25 \pm 1.23 = 23.9 \pm 1.23.$$

Предлагаемые методы своевременного обнаружения фомопсиса, его учета и фитосанитарной оценки состояния посевов подсолнечника являются существенными предпосылками для организации и проведения мероприятий против этого опасного заболевания.

Литература

- Богданова В.Н., Караджова Л.В., Штейнберг М.Е. Вовремя обнаружить фомопсис. /Сельское х-во Молдавии, 12, 1986, с.24-25.
- Зайцев Г.Н. Математика в экспериментальной ботанике. АН СССР, ГБС, М., 1990, с.74-78.
- Кудрин А.И., Путищев А.Ф. О статистических свойствах некоторых методов определения качества семян. Стандарты и качество, 3, 1981, с.14-15.
- Литтл Т., Хиллз Ф. Сельскохозяйственное опытное дело. Планирование и анализ. М., 1981, 320 с.
- Михальчевич М. Информация для карантинной службы. Institut za ratarstvo i povrtarstvo. Novi Sad, Yugoslavia, 1996, 4 с.
- Сагитов А.О., Васильев С.В., Перевертин К.А. Методика по обработке данных полевого опыта и построению прогностических моделей с использованием средств вычислительной техники. УНТП, Алма-Ата, Кайнар, 1987, 40 с.
- Скрипка О.В. Внутривидовая гетерогенность возбудителя фомопсиса подсолнечника. /Защита растений, 5, 1991, с.40-51.
- Скрипка О.В., Примаковская М.А., Шинкарев В.И., Матвеевко А.Н. Методические указания по выявлению фомопсиса (серой пятнистости подсолнечника). ВНИИКР, СКНИИФ, М., 1988, 12 с.
- Слюсарь Э.Л., Антонова Т.С., Бочкарев Н.И. К вопросу о распространении инфекции фомопсиса подсолнечника. /Защита растений, 1, 1998, с.33-34.
- Федорова Р.Н. Методические рекомендации по определению зараженности семян зерновых культур грибными патогенами. Л., ВИЗР, 1989, 46 с.
- Сметник А.И., Александров И.Н., Скрипка О.В., Измалкова А.Г. Семена подсолнечника как форма сохранения инфекции фомопсиса. /Защита растений, 1, 1998, с.35-36.
- Чумаков А.Е. Методы учета болезней. /Указатель возбудителей болезней сельскохозяйственных растений, вып.1. Л., ВИЗР, 1971, с.5-14.
- Шинкарев В.П., Масленникова Т.И., Дайнеко Т.С., Кобылева Э.А. Распространение болезней подсолнечника и борьба с ними за рубежом. М., 1990, 71 с.
- Якуткин В.И. Фомопсис подсолнечника. /Защита растений, 3, 1990, с.37-38.
- Якуткин В.И. Устойчивость сортов подсолнечника к склеротинии, серой гнили и фомопсису. /Защита растений, 1, 1991, с.41.

- Якуткин В.И. Идентификация возбудителя фомопсиса подсолнечника и методы его учета. Методические указания. Л., 1991, 23 с.
- Якуткин В.И. Учет, прогноз склеротинии и серой гнили подсолнечника. Методические указания. СПб., 1991, 37 с.
- Якуткин В.И. Появление бурой пятнистости стеблей подсолнечника в России. /Микология и фитопатология, 27, 5, 1993, с.68-73.
- Якуткин В.И., Ломовской С.М. Болезни и вредители подсолнечника. /Прогноз распространения главнейших вредителей и болезней с.-х. культур на 1991 г. М., 1991, с.103-109.
- Ячевский А.А. Основы микологии. М.-Л., 1933, 1035 с.
- Adimovic M., Straser N. Phomopsis sp.- a new parasite in sunflower. /Helia, 4, 1981, p.43-58.
- Herr L.J., Lipps P.E., Watters B.H. Diaporthe stem canker of sunflower. /Plant Dis., 67, 1983, p.911-913.
- Iliescu H., Jinga V., Ciurea A., Iionita A. Investigations related to the prognosis of sunflower stem canker (D.helianthi). /Helia, 8, 1985, p.51-56.
- Laville J. Cahier technique tournesol. Maladies. CETIOM, 1986, p.20-24.
- Madjidieh-Ghassemi Sh. A new sunflower disease in Iran caused by Phomopsis helianthi. /Proceedings of the 12th International sunflower conference, Yugoslavia, 2, 1988, p.108-109.
- Marić A., Camprag D., Masirević S. Bolesti i stenocine suncokreta i njihovo suzbijanje. Beograd, Nolit, 1987, 370 s.
- Marić A., Masirević S. Pojva sive pegavosti stabla (*Phomopsis sp.*) do sada nepoznate bolesti suncokreta. /Glasnik zas. bilj, 12, 1980, s.421-423.
- Mihaljcević M., Petrov M., Cvetcović M.M. *Phomopsis sp.* novi parazit suncokreta u Jugoslaviji. /Savrem. polj., 28, 1980, s.531-539.
- Peres A., Deverchere J. *Diaporthe helianthi* Munt. Cvet.: Etude de la lutte fongicide en conditions controlees. /Proceeding of the 14th International Sunflower Conference. Beijing-Shenyang, P.R.China, 12-20 June 1996. 1996, p.700-703.
- Petrov M., Muntanola-Cvetcović M.M., Mihaljcević M. New findings on the disease of sunflower plants caused by *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. et al. (*Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. et al.). /Archives des Sciences Biologiques (Beograd), 33, 1981, p.13-19.
- Regnault Y. Premieres observations sur le Phomopsis du tournesol. /Bull. CETIOM, 92, 1985, p.13-20.
- Slusar E.L., Firaz M.D. Reaction of wild sunflower species to inoculation by *Phomopsis helianthi*. /Symposium on Breeding of Oil and Protein Crops. Eucarpia. Bulgaria, 1994, p.76-81.
- Voros J., Leranth J., Vajna. Overwintering of *Diaporthe helianthi* a new destructive pathogen of sunflower in Hungary. /Acta Phytop. Acad. Sci. Hung., 18, 4, 1983, p.303-305.
- Wehmeer L.E. The genus *Diaporthe* Nitschke and its Segregates. Ann Arbor. University of Michigan Press, 1933, 349 p.
- Yakutkin V.I. Grey stem spot is a new disease of sunflower in Russia. 7th International Congress of Plant Pathology. Abstracts, 6, 1998.
- Yang S.M., Berry R.W., Luttrell E.S., Vongkaysone T. A new sunflower disease in Texas caused by *Diaporthe helianthi*. /Plant Dis., 68, 1984, p. 254-255.

ДИАГНОСТИКА ФУЗАРИОЗНОГО ПОРАЖЕНИЯ КОЛОСА И ЗАРАЖЕНИЯ ЗЕРНА НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ

Н.П.Шпилова, Л.И.Нефедова, В.Г.Иващенко

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Контроль санитарного состояния семян играет важную роль в семеноводстве, поскольку до 60% возбудителей болезней передается с семенами. Из трех типов фузариозов, обусловленных наличием грибной инфекции (фузариоз всходов, корневые и стеблевые гнили, фузариоз колоса), последний является одной из наиболее распространенных и вредоносных болезней, негативные последствия которой оцениваются как в форме прямых потерь урожая (трухлявость, различная степень щуплости), так и косвенных - снижение урожая вследствие изреживания посевов, развития корневых гнилей, белоколосости и т.д., то есть различных патологий роста и развития.

Недостаточно изученными аспектами проблемы фузариозов и, как правило, неучитываемыми при комплексной оценке последствий являются токсикологический и фитосанитарный. Это обусловлено большим разнообразием возбудителей фузариозов, формированием зональных комплексов доминирующих видов, особенностями их паразитизма в меняющихся условиях среды. Типы поражения колоса наиболее полно описаны при паразитировании на нем видов *F.graminearum* и *F.culmorum* - близких по патогенности, проявлению четких симптомов, уровню вредоносности. Характерным симптомом поражения колоса озимой пшеницы является обесцвечивание чешуй одного или нескольких колосков, что легко учитывать при маршрутных обследованиях посевов в период молочно - восковой спелости зерна. Этот явный симптом положен в основу учетов и оценки фитосанитарной ситуации в Северо-Кавказском, Дальневосточном и части Центрального регионов России, где эпифитотийные проявления болезни связаны с паразитизмом доминирующих видов фузариев. Для многих специалистов службы защиты растений отсутствие четких симптомов поражения является показателем благополучной фитосанитарной обстановки. Отчасти это связано с отсутствием информации о типах поражения колоса и зерна группами видов *p.Fusarium*, отчасти - с менее яркой визуальной симптоматикой.

В связи с вышеизложенным предлагаемые методические рекомендации знакомят с видовым составом фузариев, доминирующих на северо-западе России, особенностями развития и проявления фузариоза, приводящего к зараженности семян пшеницы, ячменя, овса и ржи. Они составлены на основе результатов многолетних экспериментальных исследований авторов в Ленинградской, Новгородской и Псковской областях.

ХАРАКТЕРИСТИКА
ПАТОГЕННОГО КОМПЛЕКСА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

Северо-запад России является зоной избыточного увлажнения с высокой относительной влажностью воздуха и коротким безморозным периодом. Уборка урожая проводится в поздние сроки. Растительные остатки, даже запаханные, минерализуются очень медленно, что удлиняет период сапротрофного развития возбудителей болезней, в том числе и возбудителей фузариоза колоса. Это обстоятельство благоприятствует накоплению первичного инокулюма грибов, однако развитие фузариоза колоса чаще зависит от условий погоды в период наибольшей восприимчивости растений (цветение - молочная спелость зерна). Так, в 1990-1991 гг. типичное проявление фузариоза колоса в среднем составило в Псковской области 1,4%, Ленинградской - 0,94, в Новгородской - сотые доли процента. В годы с засушливой второй половиной лета болезнь не проявилась (1992 и 1994), а в холодном и влажном 1993 г. зараженность зерна фузариями возросла в 4-10 раз в сравнении с предшествующим трехлетним периодом. При этом процент растений с явной формой болезни на колосе был выше в 7-10 раз и достигал на отдельных полях 3%.

Фитозэкспертиза семян зерновых позволила выявить 10 видов: *F.avenaceum*, *F.culmorum*, *F.equiseti*, *F.sambucinum*, *F.poaе*, *F.sporotrichioides*, *F.tricinctum*, *F.oxysporum*, *F.solani*, *F.nivale*. Доминируют *F.avenaceum*, *F.poaе* и *F.sporotrichioides*, широко распространены *F.culmorum*, *F.tricinctum* и *F.sambucinum*. В группу наиболее изученных для северо-запада России следует отнести *F.avenaceum* и *F.culmorum*, накапливающие в зерне vomitоксины и другие токсичные для человека и животных токсические соединения.

В этой связи необходимо учитывать возможность накопления в зараженном зерне дезоксиниваленола (ДОН) даже в отсутствие явных признаков поражения зерна. Для *F.avenaceum* (политоксичный вид) такая ситуация имела место во влажном холодном 1993 г., когда при скрытой зараженности зерна пшеницы грибом свыше 50% содержание vomитоксина достигало пороговых значений уже к периоду созревания, как это отмечено в Ленинградской области.

Вместе с тем широкое распространение видов секции *Sporotrichiella* в составе патогенного комплекса фузариев (от 20,4 до 65,8% в зависимости от культуры и года изучения), а также некоторая противоречивость в описании видов, встречающаяся в изданных за последние 20 лет определителях, обусловили необходимость более подробного изучения их патогенных свойств. Необходимость оценки встречаемости на зерне видов секции *Sporotrichiella* определяется их различной способностью образовывать микотоксины. Согласно имеющимся в литературе данным, *F.poaе* способен накапливать 2-токсина, *F.sporotrichiella* - 4, а *F.tricinctum* - 5. Помимо накопления

в зерне (преимущественно после перезимовки растений в поле) этими видами токсина Т-2, *F. tricinctum* способен к накоплению в зерне vomitоксина в период вегетации растений. Однако при знании видового состава грибов и спектра продуцируемых ими токсинов выбор наименее зараженных партий зерна на семенные, продовольственные или кормовые цели вполне возможен. Характеристика патогенного, особенно доминирующего на семенах, комплекса видов р. *Fusarium* может служить основанием для выбора протравителей, наиболее эффективно защищающих прорастающие семена и всходы от возникновения патологий роста и развития.

УЧЕТ ФУЗАРИОЗНОГО ПОРАЖЕНИЯ КОЛОСА И ЗАРАЖЕНИЯ СЕМЯН

В благоприятные для развития *F. avenaceum* годы типичная форма проявления болезни может достигать 1-3%. В такой ситуации фитозащите семян предшествует учет фузариозного поражения колоса и зерна.

Встречаемость фузариоза колоса устанавливают по результатам маршрутных обследований посевов в период наиболее яркого проявления симптомов. На каждом участке поля в период молочной - молочно-восковой спелости зерна просматривают по диагонали 20 проб по 50 колосьев и устанавливают распространенность болезни по формуле

$$P\% = 100n/N,$$

где n - количество пораженных колосьев, N - общее количество учтенных колосьев.

Для определения развития болезни учитывают степень поражения каждого колоса, которую выражают по 5-балльной шкале:

- 0 - здоровые растения,
- 1 - поражено до 10% поверхности колоса включительно,
- 2 - поражено от 11 до 25%,
- 3 - поражено от 26 до 50%,
- 4 - поражено свыше 50% поверхности колоса.

Развитие болезни вычисляют по формуле:

$$R = \Sigma(n \times b) / N,$$

где Σ - сумма произведений числа пораженных колосьев (n) на соответствующий балл или процент поражения (b), N - общее количество учтенных колосьев (здоровых и больных).

Во влажные годы колосья после наступления восковой спелости нередко покрываются темным налетом грибов родов *Alternaria* и *Cladosporium* (черноколосость), что не позволяет идентифицировать симптомы фузариоза по колосу, и болезнь проявляется только после уборки урожая на обмолоченном зерне. Определение поражения зерна фузариозом основано на визуальном просмотре и учете зерен,

приобретающих вследствие паразитизма гриба ряд отличительных признаков. В зависимости от времени проникновения гриба в зерновку (начало формирования, молочная, восковая спелость), то есть продолжительности его паразитизма и степени деструкции семени, семенная масса может состоять из 3-4 фракций:

1) легковесные, морщинистые, меловидные зерна с рыхлым, крошащимся эндоспермом и темным, нежизнеспособным зародышем (явно пораженные);

2) равномерно или локально обесцвеченное зерно с частичной или полной потерей блеска, в большинстве своем выполненное, реже - со слабо морщинистой оболочкой на спинке; эндосперм менее стекловидный, но зародыш жизнеспособный вследствие неглубокого проникновения гриба (слабо пораженные);

3) по внешнему виду, структуре, форме и выполненности зерно практически трудно отличимо от здорового, фузариозная инфекция локализована преимущественно в плодовой и семенной оболочках, зародыш жизнеспособный (зараженные);

4) внешне здоровые, хорошо выполненные всхожие семена, поверхностно (плодовая и семенные оболочки) зараженные грибами родов *Alternaria*, *Cladosporium* и другими представителями полевой микрофлоры*.

При отсутствии явных проявлений фузариоза колоса обязательна фитозэкспертиза, позволяющая выявить зараженность семян, представленных второй - четвертой фракциями в семенной партии.

Типы поражения колоса и зерна

Фузариоз колоса характеризуется двумя характерными формами проявления, связанными с преобладанием в патогенном комплексе доминирующих видов.

F.graminearum, *F.culmorum*, *F.avenaceum* вызывают типичную форму развития болезни с четкими последовательными симптомами: вначале обесцвечиваются колосковые чешуи, отдельные колоски или часть колоса, затем формируется налет мицелия розового или кроваво - красного цвета со спороношением гриба либо спородохиями оранжевого цвета. Это наиболее известный тип проявления болезни, издавна упоминаемый в отечественной и зарубежной литературе, легко учитываемый при обследовании посевов и отборах в селекции на устойчивость. Он проявляется от Дальнего Востока до Западной Украины и от Северного Кавказа до ЦЧР, где в роли основного возбудителя фузариоза колоса выступают *F.graminearum* и реже *F.avenaceum*. В эпифитотийные годы распространенность болезни составляет 30-50%, а локально и выше.

*Поверхностная колонизация семени (как и заспорения) считается полевой и рассматривается в качестве таковой в зонах промышленного семеноводства

На северо-западе России типичный фузариоз встречается редко. Для этой зоны характерно, в основном, обесцвечивание отдельных колосковых чешуй, их штриховатость или глазковая пятнистость, иногда - частичное или полное потемнение колосковой чешуи. Поражение колосковых чешуй не всегда сопровождается развитием спородохий или мицелия. Это скрытая (нетипичная) форма проявления фузариоза колоса.

Типичная форма поражения характеризуется обесцвечиванием, деформацией зерновки с налетом мицелия в зоне зародышка или по всей поверхности зерна. По мере удаления от очага инфекции на колосе признаки патологии развития семени ослабевают, но их заражение фузариями продолжается почти до созревания. При скрытой форме фузариоза в колосе иногда формируются единичные белесые зерновки. Кроме того, может происходить потемнение оболочки семени, однако этот признак не специфичный, связанный с поражением зерновки различными видами *r.Fusarium* или грибами других систематических групп. В основном же при скрытой форме развития фузариоза в колосе формируются зерна без видимой патологии (зараженные в скрытой форме).

Способность *F.culmorum* и *F.avenaceum* вызывать типичную форму проявления болезни, а видов секции *Sporotrichiella* - преимущественно нетипичную, с незначительным количеством деформированных и белесых зерен, служит основанием для разделения фузариев на две группы (табл.1).

Таблица 1. Уровень пораженности и зараженности семян пшеницы грибами *r.Fusarium*, доминирующими на северо-западе России

Группа	Вид гриба	Соотношение фракций зерна, %		
		Пораженных	Со скрытой зараженностью	Здоровых
Первая	<i>F.culmorum</i>	23.2	54.0	22.8
	<i>F.avenaceum</i>	7.1	52.0	40.9
	В среднем	15.2	53.0	31.8
Вторая	<i>F.sporotrichioides</i>	1.9	30.0	68.1
	<i>F.rosea</i>	1.2	31.8	67.0
	В среднем	1.6	30.9	67.5

При изучении паразитических свойств возбудителей фузариоза колоса необходимо учитывать способность грибов *F.graminearum*, *F.culmorum* и, в меньшей степени, *F.avenaceum* вызывать типичную форму проявления болезни независимо от зоны изучения, а видов секции *Sporotrichiella* - нетипичную, что определяет специфику оценки фитосанитарной ситуации и оценки на устойчивость при создании инфекционных фондов.

Описание синдрома болезни (комплекс симптомов) на колосе и зерне предлагается использовать для уточнения полевой диагностики фузариозов, их зональных особенностей (табл.2).

Таблица 2. Симптомы поражения колоса видами секции *Sporotrichiella* (при искусственной инокуляции растений, $1 \cdot 10^5$ конидий/мл)

Культура	Вид гриба	Основные симптомы на колосковых чешуях
Пшеница	<i>F. tricinctum</i>	Глазковая пятнистость или темно-фиолетовое потемнение
	<i>F. sporotrichioides</i>	То же
	<i>F. poae</i>	Единичные коричневые штрихи или темные пятна, со временем несколько обесцвечивающиеся
Ячмень	<i>F. tricinctum</i>	Бурые или темно-бурые пятна, постепенно обесцвечивающиеся к созреванию
	<i>F. sporotrichioides</i>	То же
	<i>F. poae</i>	Слабое потемнение или обесцвечивание чешуй

Примечание! на метелках овса четкие симптомы болезни не отмечены.

Симптомы заболевания на зерне при заражении видами секции *Sporotrichiella*

Пшеница. Изменение стекловидности зерна (более тусклое или темное, иногда в зоне зародыща), зерно часто с зеленоватым оттенком, иногда белесоватое или со сморщенной оболочкой и щуплое (возбудители *F. sporotrichioides* и *F. tricinctum*). Вид *F. poae* чаще не вызывает четких симптомов на зерне. Иногда наблюдается изменение стекловидности (более тусклое зерно). Примесь фузариозных зерен визуально незначительна, выше — при заражении видом *F. sporotrichioides*.

Ячмень. Симптомом фузариозного поражения зерна является потемнение оболочки семени или его основания (в зоне зародыща). Наиболее высокое содержание таких зерен в партии при заражении видом *F. sporotrichioides*.

Овес. Отличительных визуальных признаков не обнаружено. При сравнении с контролем отмечена некоторая щуплость зерна в опытных вариантах.

Принимая во внимание, что визуальная оценка зерна на поражение их видами секции *Sporotrichiella* затруднена и нередко может быть ошибочна, отобранное условно фузариозное зерно необходимо подвергать фитоэкспертизе. Фитоэкспертиза семян должна проводиться повсеместно, так как (как показали исследования) виды секции *Sporotrichiella* вызывают значительное заражение семян в скрытой форме.

Зараженность семян на северо-западе России в зависимости от года и культуры составляет: для *F. poae* 13-43%, *F. sporotrichioides* 20-88%, *F. tricinctum* - 4-47%.

Из средней пробы исследуемого образца (50 г) на анализ берут 200 семян. Их промывают под струей водопроводной воды (1 час), затем поверхность дезинфицируют 0.1% раствором азотнокислого серебра при экспозиции 1 минута. Затем тщательно промывают в стерильной воде (можно использовать свежее кипяченую и остуженную воду). После промывки семена просушивают между слоями стерильной фильтровальной бумаги и раскладывают (соблюдая правила стерильности) по 10 штук на поверхность агаризованной питательной среды Чапека в чашки Петри. Чашки инкубируют при температуре 23-25°C в термостате, лучше при чередовании света и темноты. На 5-7 сутки учитывают зараженность семян видами грибов р.Fusarium (количество инфицированных зерновок, приходящихся на 100 анализируемых семян исследуемого образца). Затем колонии грибов р.Fusarium отсеивают в стерильные чашки Петри на поверхность агаризованного картофельно-декстрозного агара (КДА) или среды Чапека. Виды грибов идентифицируют на 15 или 30 сутки и устанавливают зараженность образца тем или иным возбудителем. Частоту встречаемости (распространенность) видов учитывают по количеству образцов семян, в которых он встречался, и выражают в процентах от общего количества исследуемых образцов семян.

Для инкубации грибов р.Fusarium лучше использовать пластиковые чашки. Интенсивному спороношению и окраске воздушного мицелия способствует 12-часовое чередование света и темноты.

Морфолого-культуральные признаки

Морфолого-культуральные признаки видов секции *Sporotrichiella* описаны в соответствии с определителями Gerlach, Nirenberg (1982), Nelson, Toussoun, Marasas (1983) и по результатам проведенных исследований.

К культуральным признакам (на КДА) относятся скорость роста, цвет воздушного мицелия, цвет колонии и др.

Скорость роста (при 25 °C).

- а) Быстрая - 0.9-2.2 см в диаметре на 2-й день инкубации, 7.0-9.0 см на 7-й день инкубации (*F.sporotrichioides*, *F.rose*).
- б) Медленная - 0.7-1.3 см в диаметре на 2-й день инкубации, 2.8-4.2 см на 7-й день инкубации (*F.tricinctum*).

Цвет воздушного мицелия.

- а) Чаще белый на 2-е сутки инкубации; на 7-е сутки одни культивары белые или имеют розовый пигмент, другие (реже) золотистые, бело-кремовые (*F.rose*).
- б) Бело-розовый на 2-е сутки инкубации, на 7-е сутки различные оттенки красного цвета (карминный, винно-красный, темно-красный). Часто в стареющей культуре на фоне красного цвета появляется желтый пигмент. Некоторые культивары вначале

белые, позднее - желтеющие (*F. sporotrichioides*).

- в) Различные оттенки красного цвета на 2-й день инкубации, на 7 суток интенсивно-малиновый или вишневый цвета; в середине колонии иногда появляется желтый пигмент; в стареющей культуре часто присутствует белый пигмент (*F. tricinctum*).

Цвет колонии с обратной стороны чашки (реверзум).

- а) Белый, бело-розовый на 2-е сутки инкубации. Различные оттенки розового цвета, карминно-красный часто кольцеобразный на 7-й день инкубации (*F. roae*).
- б) Бело-розовый на 2-е сутки инкубации. Различные оттенки красных и розовых тонов, карминный на 7-й день инкубации (*F. sporotrichioides*).
- в) Всегда интенсивная, густая окраска; красно-малиновые тона (*F. tricinctum*).

Структура колоний.

- а) Пушистые, высокие колонии (шапочкой) на 2-й день инкубации. Пушистый или ватообразный высокий воздушный мицелий на 7-й день инкубации. Края колонии равномерно удалены от ее середины (*F. roae*, *F. sporotrichioides*).
- б) Паутистый воздушный мицелий на 2-е сутки инкубации; не пушистый, скорее шерстистый воздушный мицелий и компактные колонии на 7-й день инкубации. Края колонии неравномерно очерчены, часто образуя что-то похожее на лопасти; иногда, наоборот, четко очерчены более интенсивного цвета краевой полосой (*F. tricinctum*).

К морфологическим признакам относятся следующие.

Микроконидии.

- а) Обильные, по интенсивности образования преобладают над макроконидиями; округлые, с характерным сосочком (реповидные) и без него (почти круглые), грушевидные (*F. roae*).
- б) Обильные, 2-х типов: реповидные, грушевидные; округлые и веретенообразные (*F. sporotrichioides*).
- в) Лимоновидные (то есть имеющие с двух сторон характерный сосочек), грушевидные, иногда встречаются серповидно-изогнутые, закрученные с 2-х сторон палочкообразные (*F. tricinctum*).

Макроконидии.

- а) В основном редкие, слабо изогнутые, довольно широкие по всей длине, часто с вакуолями, в основном 3-х клеточные. Базальная клетка в виде нечеткой ножки (сосочка) - *F. roae*.
- б) Достаточно обильные, серповидные, в основном слабо изогнутые; широкие в верхней трети, суженные к концам, с 3-5 перегородками, базальная клетка часто не имеет четкой ножки. Апикальная клетка сравнительно короткая и изогнутая (*F. sporotrichioides*).
- в) Тонкие, серповидно-изогнутые, даже лукообразные, более широкие в центре и суженные к концам. Обычно 3-5 клеточные.

Апикальная и базальная клетки более длинные (*F. tricinctum*).

Конидиогенные структуры.

- а) Конидиофоры латеральные, образуются в воздушном мицелии, вначале неветвящиеся, затем густо ветвящиеся; фиалиды - всегда монофиалиды, которые часто образуются прямо на воздушном мицелии; фиалиды характерные, утолщенные и короткие (*F. roae*).
- б) Конидиофоры латеральные, образуются в воздушном мицелии, вначале неветвящиеся, затем беспорядочно или вертициллезообразно ветвящиеся. Вторичные конидиофоры густоветвящиеся. Конидиогенные клетки монобластические и полибластические, иногда - монофиалиды (*F. sporotrichioides*).
- в) Конидиофоры латеральные в воздушном мицелии, вначале неветвящиеся, затем слабо ветвящиеся, вторичные конидиофоры густоветвящиеся. Фиалиды - всегда монофиалиды, часто собраны на конидиофоре в рыхлую мутовку (*F. tricinctum*).

Хламидоспоры.

- а) Наблюдаются редко. Чаще образуются утолщения в мицелии (*F. roae*).
- б) Обильно формируются. Одиночные, в цепочках или собраны в группу (*F. sporotrichioides*).
- в) Образуются редко. Чаще наблюдаются утолщения в мицелии (*F. tricinctum*).

Основные отличительные признаки между видами секции *Sporotrichiella*, которые необходимо учитывать при диагностике, следующие.

F. roae - быстрый, обильный мицелиальный рост, пушистый мицелий. Многие культивары имеют характерный резкий запах, обильное образование микроконидий и их преобладание над макроконидиями. Характерные бутылчатообразные фиалиды.

F. sporotrichioides - быстрый, обильный мицелиальный рост, густой, пушистый мицелий. С возрастом в культуре появляются разбросанные по поверхности чашки спородохии. Два типа микроконидий: типичные для секции, округлые (с носиком и без) и веретенообразные. Обильное образование макроконидий. Монобластические и полибластические конидиогенные структуры. Обильное образование хламидоспор (одиночных, в цепочках и в клубочках).

F. tricinctum - компактные колонии, часто с неровными краями, плотный невысокий воздушный мицелий. Всегда яркая окраска (красные - малиновые тона) воздушного мицелия и реверсаума. Часто образует зону угнетения других грибов (четко заметно при фитогэкспертизе семян). Присутствие характерных именно для этого вида лимоннообразных микроконидий; присутствие серповидно-изогнутых закругленных с двух концов палочкообразных микроконидий. Лунообразные, тонкие макроконидии с заостренными базальной и апикальной клетками; наличие собранных в рыхлую мутовку монофиалид.

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ
ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ
ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА КОЛОСА

Заражение колоса грибами из рода *Fusarium* почти всегда сопровождается поражением семян. Вредоносное влияние грибов обусловлено вырабатываемыми ими токсинами и ферментами. Фитотоксины делают ткани зерновки пригодными для заселения и питания.

Ферменты растворяют полимеры, из которых построены клеточные стенки, то есть служат для проникновения и распространения внутри зерновки, а также для растворения полимеров содержимого клеток и гидролиза крахмала эндосперма, перевода их в продукты, которые могут быть использованы для обеспечения жизненных потребностей грибов.

Определение тяжести патологии в формирующихся семенах, необходимость изучения некоторых механизмов, ограничивающих вредное воздействие грибов, требует простых методов выявления мицелия в тканях зерновки пшеницы.

Подготовка материала для исследований

Объектом исследования служат зерновки пшеницы, инокулированные *Fusarium graminearum* и видами секции *Sporotrichiella*. Отбор образцов проводится по мере созревания зерна в три срока: через две, три и четыре недели после инокуляции. По каждому варианту опыта выделяют отдельные фракции зерновок, пораженные патогенами в различной степени: 1-я фракция - зерновки визуально здоровые, пораженные фузариозом поздно или вторично; 2-я фракция - зерновки с едва заметными признаками поражения, несколько белесоватые; 3-я фракция - с четко видимыми признаками поражения, зерновки шуплые, меловидные, с острой бороздкой и вдавленными бочками.

В основе проведения анатомических исследований лежат общепринятые методы. Согласно методикам Мельникова, Дегтярева (1934) и Фирсовой (1959), подготовка зерновок для анатомического анализа имеет свои особенности и требует размачивания их в водяных парах, во влажном воздухе или непосредственно в воде. Применительно к изучению микроструктур зерновки в связи с поражением фитопатогенными грибами используется метод биопсии сухих семян (Higley, 1989). В предложенном варианте он несколько модифицирован и усовершенствован. Этот метод позволяет производить отделение фрагментов всех слоев покровов зерновки.

Методика приготовления препаратов включает следующую последовательность процедур.

Перед проведением биопсии для облегчения отделения слоев тканей зерновку заключают во влажную камеру. Отобранные для анализа зерновки помещают в чашки Петри между слоями фильт-

ровальной бумаги, смоченной в дистиллированной воде, и закладывают в термостат при температуре 38°C на 30 минут.

Производят отделение покровных тканей с помощью препаровальной иглы и пинцета. Зерновку берут в руку, препаровальной иглой делают надрез оболочек в зоне исследования (область спинки, бочков и бороздки), пинцетом захватывают край покровной ткани и сдирают ее сверху вниз (от зародыша до хохолка).

Отделенные фрагменты тканей для просветления и обесцвечивания их структур помещают в часовые стекла с жавелевой водой. Материал в жавелевой воде можно держать до одних суток. За ходом просветления структур следят под микроскопом МБС-1.

Приготовление жавелевой воды (Фурст, 1979). Состав растворов: 1-й - 20 г хлорной извести ($\text{CaCl}_2 \cdot 0,3 \text{H}_2\text{O}$), 100 мл дистиллированной воды; 2-й - 15 г улекислого калия (K_2CO_3), 100 мл дистиллированной воды. Способ приготовления: хлорную известь взбалтывают и дают отстояться в дистиллированной воде, затем 2 раствора смешивают и оставляют стоять в течение 4 дней в темном месте, после чего фильтруют. Готовую жавелевую воду хранят в темном месте в хорошо закупоренной склянке.

Вынутые из жавелевой воды фрагменты тканей тщательно промывают дистиллированной водой.

Окраска тканей производится анилиновым синим в молочной кислоте (Наумов, 1954; Прозина, 1960). Состав раствора: 100 мг водорастворимого анилинового синего, 50 мг молочной кислоты, 100 мл дистиллированной воды. Все компоненты смешивают и хранят раствор в склянке из темного стекла с притертой пробкой.

Результат окраски. Гифы гриба приобретают синюю окраску, более интенсивную, чем окружающие ткани зерновки. Время окрашивания устанавливается экспериментально, судя по состоянию препарата, обычно составляет не более 5-15 минут.

Заключение готового препарата в среду. При изготовлении препаратов в качестве среды используют глицерин, разбавленный дистиллированной водой в соотношении 1:1. Глицерин не высыхает, сильно преломляет свет, химически не действует на ткани, просветляет препарат. Во избежание пузырьков воздуха, которые могут образовываться вокруг объекта, около него ставят на ребро покровное стекло и постепенно опускают на каплю глицерина. Глицерина под покровным стеклом не должно быть в избытке, так как в этом случае стекло будет смещаться. Для более равномерного распределения капли избыток глицерина отсасывают полоской фильтровальной бумаги.

Микроскопический анализ препаратов

Использование данной методики показано на примере изучения проникновения и распространения мицелия грибов *F.graminearum*, *F.culmorum* и *F.tricinctum* в тканях зерновок пшеницы.

На процесс формирования зерновок пшеницы оказывают влияние как генотип сорта, так и условия его выращивания, при этом

определяющая роль принадлежит генотипу. Модификационная (онтогенетическая) изменчивость строго обусловлена и генотипически закреплена нормой реакции сорта на изменение условий внешней среды. Для учета модификационной изменчивости анализ проводят на 5-10 гистологических препаратах по каждому варианту опыта. Необходимые измерения на них производят с помощью окуляр- и объективных микрометров.

Объект исследования - плодовая и семенная оболочки и эндосперм зерновки пшеницы, инокулированные грибами рода *Fusarium*. Анатомическое строение и характер локализации мицелия в тканях зерновок продемонстрированы на рисунке.

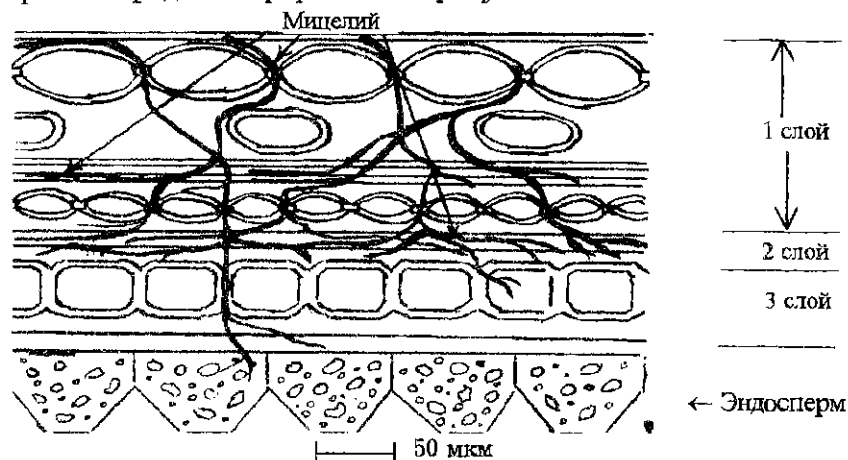


Рис. Характер локализации мицелия в тканях зерновки пшеницы

У пшеницы плодовая оболочка (перикарп) состоит из трех слоев клеток - наружного (3-4 ряда крупных четырехугольных, вытянутых в длину клеток; клетки эпидермиса на вершине зерна образуют полые выросты - хохолок), среднего (слой поперечных клеток) и внутреннего так называемого трубчатого слоя. Семенная оболочка представляет собой стенки семяпочки и состоит из двух слоев: прозрачного гиалинового (водозадерживающего) и суберинового. Эндосперм представлен двумя частями: наружным - алеироновым слоем и внутренним - мучнистым ядром. Алеироновый слой однослойный; мучнистое ядро состоит из крупных тонкостенных многогранных клеток, плотно заполненных крахмальными зернами, белковыми и другими веществами.

Мицелий грибов в основном локализуется в субэпидермальных клетках перикарпа, далее проникает в семенную оболочку, алеироновый слой и в крахмальный эндосперм.

Сравнительное изучение показало, что характер колонизации поверхности зерновки, пути распространения и локализации мицелия грибов *p.Fusarium* (*F.graminearum*, *F.culmorum* и *F.tricinatum*) и

тканях зерновки пшеницы в основном сходны. Большой частью мицелий располагается на дорзовентральной части зерновки, около зародыша и в бороздке, реже на спинке. Обильное спороношение при раннем заражении часто наблюдается в зоне зародыша. Рост и развитие гиф происходит как от основания зерновки к верхушке, так и в обратном направлении. У *F. tricinctum* отмечается поперечное ветвление гиф. Мицелий в основном локализуется в субэпидермальном слое. В период формирования монофиалид микрokonидии этого вида почти полностью заполняют клетку и через поровые каналы в клеточных стенках выходят межклеточно или прорастают в соседние клетки. Патоген при этом выделяет ферменты, лизирующие срединные пластинки клеточной стенки.

Проникающая способность фузариев в более глубокие слои зерновки у отдельных видов разная и зависит не только от вида гриба, но и от кормового субстрата, то есть от способности микроструктуры зерновок различных сортов пшеницы противостоять воздействию метаболитов грибов (табл.3).

Таблица 3. Влияние метаболитов фузариев на крахмальный комплекс эндосперма пшеницы

Сорт пшеницы	Место ре-продукции	Вид гриба	Повреждено крахмальных зерен, %	
			При скрытой зараженности	При явной пораженности
Партизанка (озимая)	Краснодарский край	<i>F.graminea-rum</i>	12.7	18.0
Ленинградка (яровая)	Ленинградская область	<i>F.culmorum</i>	4.8	15.8
		<i>F.tricinctum</i>	2.0	9.8

Анализируемые виды р.Fusarium способны достигать микроструктур эндосперма даже при скрытой зараженности семян.

В условиях Ленинградской области на сорте яровой пшеницы Ленинградка по действию на крахмальный комплекс эндосперма более вредоносным является вид *F.culmorum*, гидролизующая способность которого при скрытой зараженности в 2.4 раза превышает таковую у *F.tricinctum*.

Литература

Мельников А.Н., Дегтярев Е.К. Методика и техника анатомического исследования зерна хлебных злаков. /Тр. по прикл. бот., ген. и сел. Сер. А, 12, 1934, с.120-123.

Higley P.M., Mc. Gee D.C. Burris. Evaluation of seed biopsy methods for nondestructive seed health testing. /Phytopathology, 79, 10, 1989, p.1140.

Gerlach W., Nirenberg H. The genus Fusarium - a Pictorial Atlas. Berlin. 1982, 406 p.

Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. Fusarium species:an illustrated manual for identifications. The Pennsylvania State University Press. 1983, 193 p.

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ФОМОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПЕРИКАРПИИ СЕМЯНОК САФЛОРА КРАСИЛЬНОГО *CARTHAMUS TINCTORIUS L.*

Л.И.Берестелдкая*, Т.Е.Вахрушева**

*Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербурге

**Всероссийский НИИ растениеводства, Санкт-Петербурге

Сафлор красильный - травянистое однолетнее двудольное растение из сем. Asteraceae приурочен к степям и полупустыням. Как засухоустойчивое растение он является заменителем подсолнечника в резко засушливых юго-восточных районах России и бывшего СССР: Поволжье, Нижнее Поволжье, Северный Кавказ, Украина, Армения, Средняя Азия и т.д.

Сафлор является ценной технической культурой, которая издавна культивируется как сырье для получения краски картамина и как масличное растение. Сафлоровое масло, полученное прессованием из очищенных от лузги семян, не уступает по качеству подсолнечному. Масло из цельных семян применяется в технических целях. Кроме этого, растения сафлора имеют значение и как кормовая культура, которая по содержанию белка не уступает кукурузе, джугаре и суданке (Егорова, 1962). В отдельных хозяйствах страны в зонах возделывания сафлора его специально выращивают на сено, силос, зеленый корм. Цельные семянки и их отходы (жмыки) также идут на корм скоту и птице. Лузга используется для получения целлюлозы и т.д. В связи с широким и разнообразным применением сафлора в народном хозяйстве приобретают важное значение контроль за качеством семян, а также исследования на зараженность их грибами.

Болезням семян сафлора в нашей стране уделяется мало внимания. Нет работ, обобщающих мировой опыт по изучению семенной инфекции этой ценной культуры. В имеющихся немногочисленных зарубежных публикациях по данному вопросу чаще применяют метод высева семян на агар после поверхностной стерилизации. Так, J.Klisiewicz (1974) для выделения *Verticillium dahliae* стерилизовал семянки 1% раствором гипохлорита натрия (NaOCl) в течение 1-2 мин. с последующим тщательным промыванием в стерильной воде. Обработанные семянки помещались затем по 10 штук в чашку на картофельно-декстрозный агар. J.Irwin (1976) при изоляции *Alternaria carthami* рекомендует сначала стерилизовать поверхность семян, применяя с этой целью 0.1% раствор хлорида ртути (HgCl₂) в течение 1 мин. Затем семянки промываются 3 раза в стерильной воде, досуха просушиваются и высеваются по 4 штуки в чашку. W.Sackston (1960) изучал зараженность семян сафлора и подсолнечника белой и серой гнилью. Он обрабатывал семянки ш-

ред высевом на питательную среду 2% раствором гипохлорита натрия. При анализе одного образца сафлора он увеличивал время обработки дезинфектором до 5 минут, однако это не повлияло на количество колоний *Botrytis cinerea* и *Alternaria tenuis*, которые также выделялись из многих семян. Автор считает, что оба гриба проникают достаточно глубоко в ткани инфицированных семян. При высеве по 10 семян на питательную среду в чашки Петри было также отмечено, что колонии быстрорастущих грибов сливаются.

В одном случае Сэксон для более полного выявления *Botrytis* из семян подсолнечника отказался от стерилизации поверхности их фунгицидом, однако при этом он не дает детального описания метода. Для доказательства проникновения возбудителей в ткани семядолей существует другой ряд методов. Обычно рекомендуется применять скол (рассечение) семян с последующим высевом зародышей на питательную среду в чашки Петри. J.Irwin (1976) проводил эксперимент с поверхностной стерилизацией в асептических условиях, чтобы доказать, что *A.carthami* проникает в ткани семени через панцирный слой. Другие исследователи достигали подобных результатов, работая с инфицированными *Botrytis* семянками культуры подсолнечника, не стерилизуя поверхности (Sackston, 1960).

Н.А.Наумов (1937) рекомендовал применять различные методы при фитопатологическом исследовании семян, учитывая особенности локализации и проявления грибных патогенов.

В настоящей работе приводятся результаты изучения зараженности семян сафлора фомозом, обнаруженным в некоторых сортообразцах, поступивших в Микологический гербарий из Отдела технических культур ВИР. В испытуемых сортообразцах пикниды *Phoma* sp. концентрировались в основании семян (в месте прикрепления к цветоложу корзинки), что является, очевидно, следствием проникновения грибов из стеблей в корзинки. Ранее в отечественной и иностранной литературе имелись отдельные указания о нахождении *Phoma* sp. на листьях сафлора (Хохряков ред., 1978; Farr et al., 1989). На засохших стеблях М.Н.Родигин (1939) описал новый вид *Ph.carthami*, обнаруженный им в Повольжье в 1932-1935 гг.

Кроме описания уточненного метода обнаружения фомозной инфекции с применением посева нестерилизованных семян на питательную среду в работе предлагается определительная таблица, составленная на основании собственных данных, облегчающая идентификацию видов из р.*Phoma* - *Ph.potomum* и *Ph.leveillei*, ранее не отмеченных на культуре сафлора.

Они были выделены в чистую культуру, изучены и описаны при росте на овсяном агаре. Краткое описание *Ph.potomum* на пораженных яблоках опубликовал Н.М.Пидопличко (1978). Однако диагнозы обоих видов при культивировании их на питательных средах отсутствуют в отечественных определителях.

Описание метода обнаружения фомоза

Для обнаружения фомоза отбирали по 100-200 семянков от каждого образца и размещали в марлевые мешочки по 50 штук, которые затем промывали водопроводной водой в течение часа. Экспериментально доказано, что промывание семянков водой менее 1 часа приводит к занижению фактических данных. Так, в результате сокращения времени промывания до 20-30 мин. у сортообразца К-261 (репродукция Ср. Азия, 1985 г.) было выявлено лишь 12-13% инфицированных семянков, тогда как промывание их в течение часа позволило выявить 44% семянков, пораженных фомозом. В варианте, где для высева на питательную среду использовались сухие семена, положительные результаты не были получены. После промывания семянки погружали в раствор стрептомицина (100 мг/л) на 1 мин. для снятия бактериального загрязнения. Затем следует 2-3-разовое споласкивание стерильной или свежекипяченной охлажденной водой и тщательное просушивание семянков между листами стерильной фильтровальной бумаги. Подготовленные семянки раскладывали в асептических условиях в чашки Петри на питательные среды - среду Чапека или сусло-агар со стрептомицином (200 мг/л) по 10 штук с добавлением в среду ограничителя роста колоний. С этой целью применяли Triton X-100 (0.1 мл/л среды), который вносили в колбу с расплавленной средой перед разливом в чашки. Рост колоний также замедляет медицинская желчь (4 мл/л), которую добавляют в колбы со средой в стерильных условиях, как указано для Triton X-100. Чашки с семянками инкубировали в темноте в термостате при постоянной температуре 24°C. Через 3 дня после посева проводили учет всхожести. В условиях среды Чапека проростки достигали 1-1.5 см на 3 сутки. Одновременно подсчитывали число колоний грибов.

В дальнейшем наблюдения и учет колоний проводили через каждые 2-3 дня. Начало развития колоний *Phoma* регистрировали на 4-5 сутки. Наиболее полное заселение колониями происходит на 7-8 сутки. Окончательный результат устанавливался на 10 сутки. Колонии возбудителей фомоза и видов грибов из других родов учитывали для каждого случая отдельно и подсчитывали их процентное соотношение от общего количества разложенных семянков. При этом сравнивалась зараженность проросших и непроросших семянков.

Выделение возбудителей фомоза в чистую культуру и идентификация

Колонии грибов изолировали в стерильных условиях сначала на питательные агаризованные среды со стрептомицином в чашки Петри для предупреждения бактериального загрязнения, а затем на

косяки агара в пробирки в течение всего времени инкубирования с момента появления первых колоний и следили за их развитием. Колонии грибов р.*Phoma* на ранних стадиях роста регистрировали двух типов: почти амицелиальные с паутинистым мицелием и пикнидами в центральной части колонии, буровато-коричневые, и мицелиальные колонии, которые имели низкий войлочный белый или розоватый мицелий с коричневыми пикнидами. В целях идентификации были отобраны по 4 изолята каждого типа, выделенные из семян одного сортообразца К-261 и изученные в процессе роста на овсяном агаре - основной среде, рекомендованной для изучения грибов р.*Phoma* (Dorenbosch, 1970; Domsch et al., 1980), в темноте при постоянной температуре 24°C в течение 10 дней. Затем чашки содержали в комнатных условиях.

Определение пигментации колоний проводили по шкале А.С.Бондарцева (1953). Основным руководством для определения видов р.*Phoma* служила монография Domsch et al. (1980). Измерение диаметра колоний проводили ежедневно в течение 10 дней во время культивирования грибов на овсяном агаре при постоянной температуре 24°C. Измерения длины и ширины проводили у 100 конидий для каждого изолята (по 2 изолята для каждого типа колоний).

Состав и приготовление питательных сред

1. Овсяный агар (Plant..., 1968): овсяная мука - 30 г, агар - 20 г, вода - 1000 мл. Овсяную муку варят в воде в течение одного часа на водяной бане, помешивая стеклянной палочкой, фильтруют через марлю, доводят объем до 1000 мл, добавляют агар и снова варят до растворения агара. Стерилизуют в автоклаве при 0.5 атм. в течение 30 мин.

2. Среда Чапека (Литвинов, 1969): сахароза - 20 г, натрий азотнокислый (NaNO_3) - 2 г, калий фосфорнокислый однозамещенный или двузамещенный (KH_2PO_4 , KHP_4) - 1 г, магний сернокислый ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0.5 г, калий хлористый (KCl) - 0.5 г, железо сернокислое (закисное) (FeSO_4) - 0.01 г, агар - 15-20 г, вода дистиллированная - 1000 мл. Стерилизуют в автоклаве при давлении 1 атм. в течение 20 мин.

3. Солодовое сусло и сусловой агар (Литвинов, 1969): неохмеленное пивное сусло (16-17° по ареометру Баллинга) разбавить водопроводной водой в соотношении 1:1 до 7-8° Баллинга и разлить в колбы. Стерилизовать в автоклаве при давлении 0.5 атм. в течение 30 мин. При приготовлении сусло-агара к неохмеленному разбавленному суслу добавляют 20 г агара, расплавляют при подогревании, разливают в подготовленную стерильную посуду (колбы, пробирки). Стерилизовать при давлении 0.5 атм. в течение 30 мин.

Статистическая обработка экспериментальных данных

Данные измерений длины и ширины конидий подвергаются элементарной математической обработке с определением среднего арифметического значения, ошибки средней ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), коэффициента вариации (cv, %) и критерия Стьюдента (t-критерий) (Плохинский, 1970; Жукова и др., 1978).

Пример. В результате анализа у сортообразца К-261 при всхожести 95% было обнаружено 44% пораженных фомозом семян, из которых только 3% не проросли. Остальную микрофлору составляли сапротрофы из р. *Penicillium* (7%) и р. *Aspergillus* (1%). В двух случаях на проростках выявлен образующий белые колонии с лохматым мицелием гриб, не определенный до вида. Относительно всех выделенных грибов доля видов *Phoma* у сортообразца К-261 составила 81%. Изучение культуральных и морфологических свойств на овсяном агаре позволило получить характеристику комплекса признаков, в том числе и диагностических (диаметр колоний на 7 сутки; характер роста мицелия, пигментация воздушного мицелия и обратной стороны колоний (реверсаума); форма, размеры, цвет пикнид и структура поверхности; наличие цетинок, цвет и размеры их; форма, цвет и размеры конидий; наличие хламидоспор и их типы - мицелиальные, конидиальные, многоклеточные или диктиохламидоспоры, форма, цвет и размеры их; наличие кристаллов и др.). На основании полученных результатов выделенные изоляты *Phoma* sp. были отнесены к видам *Phoma rotorum* и *Ph. leveillei*. Оба вида имеют характерные отличия и могут быть сравнительно легко идентифицированы при помощи представленной ниже таблицы 1.

Таблица 1. Отличительные культуральные и морфологические свойства *Ph. rotorum* и *Ph. leveillei* при росте на овсяном агаре

Признак	<i>Ph. rotorum</i>	<i>Ph. leveillei</i>
Диаметр колоний	54 мм (на 7 сутки роста)	41 мм (на 7 сутки роста)
Мицелий	Слабо развитый паутинистый, имеет концентрическую зональность, окрашен в центральной части в темно-коричневый цвет. Образующиеся пикниды придают колонии мелкую порошистость и бурый оттенок. Появление розоватой слизи связано с выходом спор из пикнид	Слабо развитый низкий войлочный мицелий, беловатый в первые дни роста, затем с розовым оттенком от споровой слизи. Пикниды в кучках создают крупную порошистость и придают колонии буровато-коричневый оттенок

Пикниды	Сферические, конусовидные, бочонковидные, из толстостенных в основном крупных клеток, угловатой текстуры, темно-коричневые, бурые, табачно-бурые или сигарные, у поруса темнее, одиночные или спаренные, расположены беспорядочно, размерами 46.9-167.5 × 40.2-100.5 мкм. Край порусов okay-млн короткими гидами-отростками (рис.2)	Сферические или слегка приплюснутые, мешковидные, грушевидные, бочонковидные, волосистые, текстура слабо заметна, в виде сеточки тонкостенных клеток, с темно-коричневыми щетинками длиной 10-33.5 мкм, чаще парные или в конгломератах по 3-7, иногда со сливающимися порусами, светлобуровато-коричневые, располагаются концентрическими окружностями, размерами 127.3-268 × 127.3-227.8 мкм. У поруса пикниды имеют характерный коричневый поясok (рис.3)
Конидии	Цилиндрические, овально-цилиндрические, иногда суженные к одному концу, эллипсоидальные, одноклеточные, редко с 1 перегородкой. Крайние размеры: 4.0-7.6(9) × 1.6-3.6 мкм	Цилиндрические, реже овально-цилиндрические, прямые или слегка согнутые, одноклеточные, реже с 1 перегородкой. Крайние размеры: 3.6-8.0 × 1.0-2.0 мкм
Мицелиальные хламидоспоры	Интеркалярные по 1-2 или в коротких цепочках, реже терминальные, шаровидные, бочонковидные, иногда с продольной перегородкой, серовато-бурые, темно-оливковые (6-8 × 5-8 мкм). Прорастают ростковыми трубками, почкуются	Образуются вздутые мицелиальные клетки, окрашенные и неокрашенные хламидоспороподобные клетки. Интеркалярные хламидоспоры в коротких цепочках встречаются редко (отмечены у изолята 4-3 и не отмечены у изолятов 4-2 и 5-2)
Конидиальные хламидоспоры	Образуются при старении культуры из набужших конидий, которые округляются, темнеют и имеют уплотненную оболочку (4×3.6 мкм) почкуются	Не отмечены
Диктиохламидоспоры	Отмечены на овсяном агаре спустя 3 месяца роста. Размеры: 16-30 × 10-12 мкм	В данных условиях не отмечены
Кристаллы	Имеются	Имеются

Некоторые из приведенных в таблице 1 характеристик были выявлены для этих видов впервые. Это - образование конидиальных хламидоспор у *Ph.potomum*, неокрашенных и окрашенных в коричневый цвет хламидоспороподобных клеток и хламидоспор. у *Ph. leveillei*.

Ph.potomum распространяется в чашке с большей скоростью, чем *Ph. leveillei*. При этом разница в диаметре колоний увеличивалась со временем и в конце опыта на 10-ые сутки была равна 16.7 мм (рис.1.)

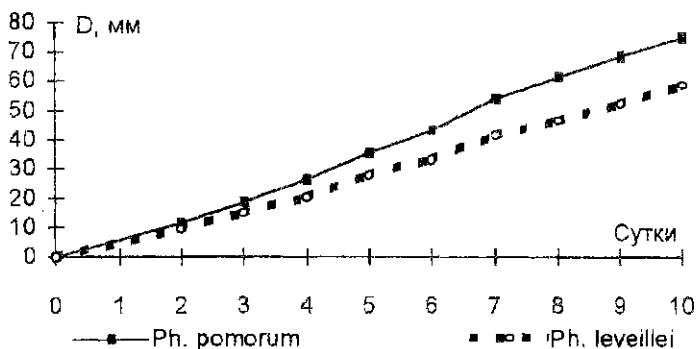


Рис. 1. Динамика роста колоний *Phoma pomorum* и *Ph. leveillei*. Существенные различия в диаметре колоний видов наблюдаются, начиная с 3-х суток культивирования (при $P \geq 0.95$)

Плодовые тела *Ph. pomorum* образовывались в слабо развитом почти субстратном мицелии, более светлые волосистые пикниды *Ph. leveillei* закладывались в строме (рис.2,3). Характеристики поверхностных тканей пикнид (из угловатых толстостенных или тонкостенных сегчатых клеток) с возрастом теряют свое значение, так как пикниды темнеют вследствие кутинизации, становятся черными и в результате структуру поверхности трудно описывать.

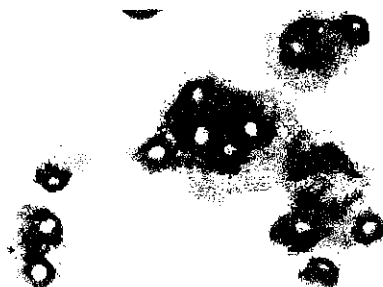


Рис.2. Пикнида *Ph. pomorum* $\times 350$ Рис.3. Пикниды *Ph. leveillei* $\times 170$

Также выявлены отличия между видами в размерах конидий по длине и ширине. Измерения осуществлялись на 11 сутки роста на среде ОА. Достоверность различий между средними значениями размеров доказана на доверительном уровне 95% (табл. 2.). Следовательно, размеры конидий могут служить диагностическим признаком для изучаемых видов.

Данные таблицы 2 позволяют также сделать выводы о большей вариабельности значений длины, чем ширины у *Ph. leveillei*, в то время как у *Ph. rotogit* такой резкой разницы в изменчивости этих параметров не выявлено.

Таблица 2. Размеры конидий видов
Ph. rotogit (изоляты 4-1 и 5-1) и *Ph. leveillei* (изоляты 4-2 и 5-2)

№	Изоляты	Длина конидий, мкм		Ширина конидий, мкм		Сравнение изолятов с помощью t_d -критерия		
		$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	cv, %	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	cv, %	Изоляты	Длина	Ширина
1	4-1	5.47 ± 0.06	12	2.30 ± 0.04	16	№1 с №3	11.9*	8.9*
2	5-1	5.35 ± 0.08	15	2.22 ± 0.03	14	№1 с №4	7.9*	14.1*
3	4-2	4.42 ± 0.06	13	1.90 ± 0.02	9	№2 с №3	11.3*	8.9*
4	5-2	4.66 ± 0.08	18	1.67 ± 0.02	12	№2 с №4	6.1*	15.2*

*Разлиа существенны при $P \geq 0.95$. \bar{x} - средняя, $s_{\bar{x}}$ - ошибка средней, cv - коэффициент вариации.

Образование пикнид и разного типа меланизированных хламидоспор приводит к изменению облика колоний. Так, при старении *Ph. rotogit* колонии становились кожистыми, черными или коричневыми оттенков (умбровыми, сепия), у *Ph. leveillei* бледно-бурыми с желто-бурым или буровато-коричневым оттенком. Пигментация обратной стороны колоний двух видов была подвержена изменениям меньше. На 10-е сутки роста на ОА для обоих видов под пикнидами фиксировали темно-фиолетовую, фиолетовую, грязно-фиолетовую окраску реверзума. Последний оставался не окрашенным или оливково-серым там, где пикниды отсутствовали или были редки. С возрастом пигментация обратной стороны колоний почти не изменилась у первого вида, у второго наблюдалось появление охристых, бежевых и буровато-коричневых оттенков.

Следует заметить, что для вида *Ph. leveillei* были также получены амицелиальные неокрашенные формы с пикнидами, которые распределялись по колонии концентрическими кругами, что придавало колонии порошистость, напоминая внешним видом *Ph. rotogit*. У изолята 5-2 вида *Ph. leveillei* на 18 день роста на жидкой среде Чапека были отмечены не меланизированные диктиохламидоспоры (многоклеточные хламидоспоры с поперечными и продольными перегородками). Образованием диктиохламидоспор, подобных конидиям *Steinphylium*, характеризуется обычно *Ph. rotogit*. Однако требуются дополнительные исследования для выяснения таксономического значения этих структур. Замечено также, что разные изоляты характеризовались неодинаковой способностью к образованию различных форм хламидоспор.

Литература

- Вартенев Д.И. Сафлор и его применение. /Уч. зап., 3, 8, Уральск, 1956.
- Бондарцев А.С. Трутовые грибы Европейской части СССР и Кавказа. М.-Л., 1953, 1106 с.
- Егорова Н.П. Бурая пятнистость сафлора. Автореф. канд. дисс. Ташкент, 1962, 20 с.
- Жукова Р.А., Коммунарская А.Д., Пронина М.И., Терещин И.М., Журавлева Н.П., Шабас М.Н. Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов. Л., 1978, 160 с.
- Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. Л., 1971, 751 с.
- Литвинов М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л., 1969, 119 с.
- Наумов Н.А. Методы микологических и фитопатологических исследований. М.-Л., 1937, 270 с.
- Пидопличко Н.М. Грибы - паразиты культурных растений. Определитель, т.3. Пикнидиальные грибы. Киев, 1978, с.53.
- Плохинский Н.А. Биометрия. М., 1970, 367 с.
- Хохряков М.К. (ред.) Указатель возбудителей болезней сельскохозяйственных культур (по прядильным и масличным культурам), в.6. Л., 1978, 41 с.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of Soil Fungi, v.I. London-New-York, Akademik Press, 1980, p.630-642.
- Dorenbosch M.J. Key to nine soil-borne Phoma-like fungi. /Persoonia, 96, 1, 1970, p.1-14.
- Farr D.F., Bills G.F., Chamuris G.P., Rossman A.Y. Fungi on Plants and Plant products in the United States. St. Paul, APS PRESS, 1989, 1252 p.
- Irwin J.A.G. Alternaria carthami, a seed-borne pathogen safflower. /Austral. J. of Experim. Agriculture and Animal Husbandry, 16, 83, 1976, p.921-925.
- Klisiewicz J.M. Assay of Verticillium in safflower seed. /Plant Disease Reports, 58, 10, 1974, p.936-927.
- Plant Pathologist's Pocketbook. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 1968, 267 p.
- Sackston W.E. Botrytis cinerea and Sclerotinia sclerotiorum in seed of safflower and sunflower. /Plant Disease Reporter, 44, 8, 1960, p.664-668.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАРАЖЕННОСТИ СЕМЯН ЛЮПИНА АНТРАКНОЗОМ

А.С.Якушева, А.И.Самолшкина

Всероссийский НИИ люпина, Брянск

Зараженность семян люпина антракнозом способствует быстрому распространению его как на поле, когда от беспорядочно разбросанных очагов инфекции происходит заражение здоровых растений на ранних стадиях их развития, так и по стране в другие, свободные от него районы. Возбудитель антракноза сохраняется и внутри семени люпина, и на его поверхности.

Специальной методики определения зараженности семян люпина антракнозом не существовало. В связи с высокой вредоносностью этого заболевания возникла необходимость ее разработки. В настоящее время во Всероссийском НИИ люпина такая методика разработана, апробирована и применяется в производстве.

В последние годы в практике государственных семенных инспекций, а также научно-исследовательской работе при оценке посевных качеств семян люпина отдается предпочтение проращиванию их в бумажно-полиэтиленовых рулонах. Несомненные преимущества последних отражены в публикациях Б.С.Лихачева и др. (1989,1991). Поэтому этот способ был положен в основу данной методики.

Для определения уровня зараженности семян антракнозом берется из их партии общая проба, из которой отбирается средняя проба в количестве не менее 200 шт. Отобранные семена раскладывают на бумажно-полиэтиленовые рулоны, изготовление которых проводится следующим образом: на полоску полиэтиленовой пленки размером 16×125 см накладывают такого же размера полоску фильтровальной бумаги, предварительно простерилизованной в сушильном шкафу в течение 2-х часов при температуре 100°C. Фильтровальную бумагу увлажняют стерильной водой и на ней, отступая от верхнего края 3 см, раскладывают пинцетом семена (25 штук) с интервалом не менее 5 см (во избежание их перезаражения внутри рулона). Сверху семена прикрывают двойной полоской увлажненной фильтровальной бумаги (также простерилизованной) шириной 10 см, совмещая верхний край с пленкой. Затем полиэтиленовую и бумажную полоски с семенами сворачивают (свободно без нажима) в рулон, который устанавливается (край ближе к семенам должен быть вверху) в стерильный сосуд (растительный и т. д.) со стерильной дистиллированной водой слоем в 2-3 см. Сосуды с рулонами помещают в термостат с постоянной температурой 23°C. Через 4 дня их вынимают из него и ставят на стеллажи под люминесцентные

лампы, где выдерживают еще 3-4 дня при температуре 18-20°C, после чего проводят учеты результатов фитогэкспертизы.

Нередки случаи сильного поверхностного заражения семян люпина посторонними патогенами, особенно при уборке в неблагоприятных погодных условиях (повышенной влажности и т.д.). В таких случаях необходима поверхностная стерилизация семян для удаления посторонних патогенов, так как последние могут, конкурируя, подавлять развитие антракноза и затруднять его учет. Семена люпина погружают в 96% спирт на 2 минуты, после чего тщательно промывают (трижды) в дистиллированной или свежeproкипяченной холодной воде и закладывают в рулоны (как описано выше).

Определение зараженности семян проводят спустя 7-8 дней после их закладки в рулоны. Подсчитывают общее число проростков и количество их с признаками поражения антракнозом. На проростках в это время наблюдаются следующие симптомы поражения: светлокоричневые в виде штрихов некрозы, язвы буро-оранжевого цвета различного размера, на семядолях масляно-бурые пятна, увядание развивающихся настоящих листьев, мацерация проростка или его гибель. Средний процент зараженных проростков ($P\%$) вычисляется по формуле:

$$P = 100n/N,$$

где N - общее число проростков, n - количество больных проростков.

Литература

Лихачев Б.С., Зенкина З.А., Гайдай А.Я. Модернизация рулонного способа проращивания семян зерновых культур. /Селекция и семеноводство, 1, 1989.

Лихачев Б.С., Скавченко С.А., Яговенко Л.П., Корнев А.П., Косоротикова А.Н. Об оценке посевных качеств семян люпина. /Селекция и семеноводство, 1, 1991.

МЕТОД РАСТЕНИЙ-ИНДИКАТОРОВ В ФИТОВИРУСОЛОГИИ

Ю.И.Власов, Т.С.Фоминых, А.Е.Цыпленков, Т.А.Якуткина

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербурге

В современных условиях, когда получили широкое распространение молекулярно-биологические методы диагностики вирусов, целесообразно заново оценить роль и значение метода растений-индикаторов в фитовирусологии.

Растения-индикаторы (в фитовирусологии) - это растения, реагирующие на заражение тем или иным вирусом четкой и достаточно специфической реакцией, отличимой от реакции на другие патогены. При проведении диагностических исследований метод растений-индикаторов обычно не выступает как самостоятельный, он сочетается с другими приемами идентификации патогена (иммунодиагностика, электронная микроскопия, полимеразная цепная реакция, молекулярная гибридизация). Необходимость его дополнения другими приемами связана с тем, что индикаторным методом (если он применяется для диагностики неизвестного патогена) фактически устанавливается не вирус, а лишь тип симптомов, характерный для того или иного вируса. И здесь возможны различные ошибки и неточности. Для окончательного установления именно вирусной природы болезни и отнесения патогена в определенную таксономическую группу применяются вышеперечисленные методы.

Тем не менее растения-индикаторы продолжают широко использоваться в работах многих фитовирусологов. Это в основном происходит в следующих случаях.

- При первоначальном перенесении патогена на чувствительные растения, чтобы доказать инфекционность болезни. По реакции на индикаторах можно предварительно ориентироваться в отношении вида вируса, вызвавшего заболевание.

- Для создания и поддержания "живой коллекции" вирусов. Так, вирус огуречной мозаики (ВОМ) удобнее длительное время сохранять на растениях-индикаторах (например, *Nicotiana glutinosa*), чем на растениях огурцов.

- Для разделения близких вирусов и их штаммов. Например, растение *Nicotiana sylvestris* четко дифференцирует типичный (табачный) штамм ВТМ от вируса мозаики томага (ВМТо), также относящегося к группе ВТМ. На типичный ВТМ *N.sylvestris* реагирует системной реакцией (мозаика), на ВМТо - местной (локальные повреждения). В подобных случаях индикаторное растение выполняет роль растения-дифференциатора.

- Для сравнительного количественного учета вирусов методом биологического титрования (методом "половинок листьев"), который проводится на индикаторах с местной реакцией на вирус. В настоя-

щее время известны достаточно точные методы количественного определения вирусов. Тем не менее использование для этой цели индикаторов нередко практикуется при изучении действия на вирус различных ингибиторов.

- Для селекции штаммов вирусов с использованием "метода мононекрозов". В ВИЗР такой подход был применен при селекции слабопатогенных штаммов ВМТо (Власов и др., 1989).

Условия и особенности работы с растениями-индикаторами

Успех диагностики фитовирусов методом растений-индикаторов определяется уровнем знания особенностей биологии фитовирусов, выполнением ряда условий заражения растений и их выращивания. Растения-индикаторы обычно выращивают в изолированных боксах в теплице или в камерах искусственного климата на хорошо удобренной почве. Нежелательно выращивать их в открытом грунте, где сложнее предотвратить различные случайные заражения.

Оптимальными условиями для работы с индикаторами являются температура воздуха 20-25°C и освещенность в пределах 4-10 тыс. люкс.

Для искусственных заражений наиболее подходящими являются молодые, интенсивно растущие растения. Перед механической инокуляцией листьев рекомендуется затенение растений на 24-72 часа, что способствует повышению их чувствительности к заражению. После инокуляции растения снова затевают на небольшой период (12-24 часа), чтобы они легче перенесли последствия механического (хотя и слабого) травмирования листьев. Если же только что зараженные растения оставить при ярком освещении, то листья могут завянуть и отмереть. В дальнейшем растения находятся в нормальных условиях освещения.

С целью правильной интерпретации полученных результатов необходимо принимать профилактические меры, чтобы предотвратить случайные заражения индикаторов другими вирусами. Это иногда происходит в теплицах, если не проводить регулярную борьбу с возможными переносчиками инфекции (тлями, белокрылками и др.). Заражение растений-индикаторов осуществляется разными методами: механическим заражением листьев индикаторов соком испытуемых растений, прививкой, передачей инфекции переносчиками или передачей вируса через посредство повилки.

Многие вирусы в значительной мере теряют свою активность в соке, получаемом из листьев или других тканей больных растений. Это происходит, в частности, благодаря присутствию в соке различных ингибиторов вирусной инфекции, а также изменению pH среды.

В связи с этим перед заражением растений-индикаторов и приготовленный материал добавляют различные буферы и стабилизаторы вирионов в инфекционном соке. В числе стабилизаторов

можно назвать раствор никотиновой кислоты (0.1%), сульфит натрия (0.5%), 1%-й меркаптоэтанол и др. Установлено также, что отрицательное действие ингибиторов вирусов в соке заметно снижается в присутствии бентонита и активированного угля. Выбор определенного варианта стабилизации вируса зависит от конкретного объекта, и такие данные можно найти в специальных публикациях. Так, в отношении чрезвычайно лабильного вируса бронзовости томатов методы стабилизации вирионов описаны Д.Д.Тертяком (1990).

Заражение листьев растений-индикаторов осуществляется путем потирания их смоченными в инфекционном соке ватным тампоном, поролоновой губкой или пестиком. Инокуляцию проводят путем вращательных движений тампоном по верхней поверхности листа. Вирус проникает в клетки растений через легкие травмы, связанные с поранением волосков листьев и эпидермальных клеток. Нередко для увеличения таких травм поверхность листьев перед инокуляцией посыпают небольшим количеством порошка - карборунда с размером частиц 500-600 мек.

После заражения (через 2-3 мин.) листья рекомендуется промыть в струе воды, что будет способствовать сохранению их в состоянии тургора. В результате промывания сохраняется в чистоте и внешний вид листьев (без загрязнения их, например, активированным углем), что позволяет четко учитывать проявление реакции на вирус. При этом не следует опасаться смывания с поверхности листа какого-то количества вируса, поскольку проникновение его в клетки растений при инокуляции происходит практически мгновенно. Это показано во многих работах и в наших исследованиях.

Наблюдения за появлением симптомов проводятся обычно в течение 2-х недель, если ожидается местная реакция на вирус. В случае системной реакции симптомы могут в некоторых случаях проявляться через 1-2 месяца после заражения. Как уже было отмечено, индикаторный метод в необходимых случаях дополняется другими приемами диагностики. Из листьев индикаторов, проявивших симптомы болезни, можно приготовить препараты для электронной микроскопии либо провести дополнительную идентификацию патогена другими общепринятыми в вирусологии методами.

Рассмотрим примеры использования индикаторов в случае работы с вирусами, передаваемыми механической инокуляцией, - вирусами огуречной мозаики, некротического пожелтения жилок свеклы, X-вирусом картофеля, а также с непередаваемым инокуляцией сока вирусом хлоротической курчавости листьев томата.

Вирус огуречной мозаики (*Cucumber mosaic virus*)

Вирус огуречной мозаики (ВОМ) - один из наиболее распространенных и вредоносных фитовирусов. По последним данным, список его растений-хозяев включает 775 видов, относящихся к 365

родам и 85 семействам.

На территории бывшего СССР ВОМ распространен повсеместно и особенно вредоносен на тыквенных, пасленовых и бобовых культурах, а также зарегистрирован на ряде плодовых, ягодных и декоративных культур и многих видах сорных растений. Наиболее опасны некротические штаммы ВОМ, приводящие к отмиранию не только листьев, но и некротизации плодов.

ВОМ принадлежит к возбудителям типичных природноочаговых болезней и входит в состав естественных биоценозов. На культурные растения распространяется многими видами тлей. Вирус имеет изометрические частицы диаметром 30 нм, принадлежит к группе кукумовирусов.

Идентификация ВОМ по симптомам на растениях-хозяевах нередко затрудняется из-за смешанной инфекции. С помощью электронной микроскопии отличить ВОМ от других изометрических, часто сопутствующих ему вирусов, также не представляется возможным. Наиболее надежные способы идентификации ВОМ - иммунологические и молекулярно-биологические методы и тесты на растениях-индикаторах, но и в этих случаях могут наблюдаться различные типы реакций из-за штаммовых отличий ВОМ.

Вопросы классификации и многообразия штаммов ВОМ обсуждаются в литературе на протяжении нескольких десятилетий. Впервые возможность распределения изолятов ВОМ по группам была предложена Морроу и др. в 70-х годах. На основании симптомов на растениях-хозяевах изоляты ВОМ были разделены на 4 группы. Позднее с помощью индикаторного метода французские изоляты ВОМ были классифицированы как две группы ToRS и DTL. В качестве растения-дифференциатора рекомендовали табак сорта Xantic. В 1983 г. был предложен новый дифференциатор штаммов ВОМ *N.glutinosa*. Для штаммов первой группы симптомы на *N.glutinosa* характеризовались глянцо-желтой пятнистостью, курчавостью листьев и повышенным куцением. Представители другой группы вызывали значительное удлинение листьев и мозаику с темно-зелеными вздутиями и пятнами.

Приведенные примеры из мировой литературы свидетельствуют о том, что метод растений-индикаторов может служить надежным ключом не только для идентификации вируса, но и для классификации штаммов в отдельные отличающиеся группы. Однако для проведения данных исследований необходимо иметь чистые линии ВОМ.

Получение чистых моноклоновых линий ВОМ осуществляется следующим образом. Отбирают образцы сельскохозяйственных культур с симптомами нитевидности и деформации листьев, что наиболее типично для ВОМ. Затем заражают набор растений-индикаторов с системной реакцией на ВОМ, одновременно проверяя материал на наличие других вирусов. Далее, от растений, где обнаружен ВОМ, заражают для получения чистых моноклоновых линий

растения с местной реакцией на вирус - *Vicia faba*, *Vigna sinensis*, *Chenopodium quinoa*. Отдельно вырезанные некрозы используют для накопления вируса на *N.glutinosa* или на огурце, чтобы избежать загрязнения другими вирусами. Оценку гомогенности повторяют не менее 4-5 раз пассажами через хозяина с местной и системной реакцией.

Согласно литературным данным, описано более 20 тест-растений, характеризующих штаммовые различия ВОМ. Среди них наиболее часто используют следующие: *N.tabacum*, *N.sylvestris*, *N.glutinosa*, *N.debneyi*, *Vicia faba*, *Cucurbita pepo* (сорт Президент), *Capsicum annuum*, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa*, *Ch.amaranticolor*, *Cucumis sativus*, *Lycopersicum esculentum*, *Vigna sinensis* и другие.

В наших исследованиях совместно с учеными МГУ и РГУ было отселектировано 23 изолята ВОМ (Цыпленков и др.,1992). Наиболее надежным дифференциатором изолятов ВОМ, по нашему мнению, явился дурман - *D.stramonium*; так, в результате его заражения все изоляты ВОМ удалось сгруппировать по общим признакам проявления симптомов. Первая группа, обозначенная нами "DL", характеризовалась только локальной реакцией. Вторая группа изолятов, названная "DS", заражала дурман системно.

Существенные различия по симптомам между изолятами наблюдали не только на *D.stramonium*, но и на *C.pepo*, *N.glutinosa*, *V.faba* (табл.1).

Таблица 1. Реакция на заражение различными изолятами ВОМ растений-дифференциаторов

Вид, сорт растения-индикатора	Изоляты ВОМ			
	В-А (группа DL)	В-Л (rp.DL)	В-З (rp.DS)	В-25 (rp.DS)
<i>Datura stramonium</i>	<u>ChlSp</u> -	<u>DifSp</u> -	<u>DifSp</u> MiM	<u>0</u> SeDis
<i>Cucurbita pepo</i> с.Президент	<u>ChlSp</u> MiDis	<u>0</u> SeStu	<u>-</u> -	<u>+</u> -
<i>Nicotiana glutinosa</i>	<u>0</u> YRiSp	<u>0</u> SeDisStu	<u>0</u> MiM	<u>0</u> RiSp
<i>Vicia faba</i> с.Русские черные	<u>N</u> 0	<u>N</u> 0	<u>N</u> Mo	<u>N</u> 0

Примечание: в числителе - локальная реакция, в знаменателе системная реакция, + - латентное наличие вируса, - - вирус отсутствует, 0 - симптомы отсутствуют, DifSp - диффузная пятнистость, MiDis - слабая деформация, MiM - слабая мозаика, RiSp - кольцевая пятнистость, SeDis - сильная деформация, нитевидность, SeStu - сильная задержка роста, карликовость, YRiSp - желтый кольцевой рисунок, N - некротическая локальная реакция, ChlSp - хлоротическая пятнистость.

Полученные результаты по изучению симптоматики различных изолятов ВОР свидетельствуют о том, что для идентификации и их группировки можно использовать сравнительно минимальный набор тест-растений. Для подтверждения возможности использования данного набора дифференциаторов с целью классификации ВОР по группам нами был использован метод ИФА с поликлональными и моноклональными антителами к ВОР.

Результаты показали, что поликлональные антитела реагировали положительно, хотя и в разной степени, со всеми проверенными изолятами ВОР. С моноклональными антителами часть изолятов не реагировала и принадлежала к группе "DS", дающей системную реакцию на *D.stramonium*. В связи с этим представляется возможным сделать вывод о том, что изоляты ВОР, разделенные на группы "DS" и "DL" по симптомам на *D.stramonium*, являются серологически различными штаммами.

Таким образом, используя различные наборы индикаторов, можно не только достоверно идентифицировать ВОР, но и получить определенные данные о групповой принадлежности выделенных изолятов согласно международной классификации этого вируса.

Х-вирус картофеля (ХВК)

Этот патоген, относящийся к группе Potexvirus, широко распространен на картофеле, а также поражает некоторые овощные культуры (томат, перец). Потери урожая томатов от ХВК составляют в зависимости от одинарной либо смешанной инфекции (с ВТМ) от 20 до 60% (Фоминых, 1985). На картофеле ХВК вызывает сравнительно небольшие потери, однако при смешанных инфекциях (например, с УВК) возникают тяжелые формы поражения растений.

Диагностика ХВК не представляет серьезных трудностей, поскольку этот вирус накапливается в растениях в достаточно высоких концентрациях и легко передается механическим путем. Кроме того, форма и размеры вирионов (470–580 нм × 13 нм) позволяют без особых сложностей обнаруживать патоген при электронномикроскопических исследованиях. В то же время по морфологии штаммы ХВК практически не отличаются.

Метод растений-индикаторов в случае с ХВК применяется чаще всего при дифференцировании штаммов этого вируса. В нашей лаборатории было выделено и идентифицировано пять изолятов ХВК из растений томатов, возделываемых в крупных тепличных хозяйствах России и стран СНГ. Все изоляты вызывали одинаковую реакцию (местные некрозы) на основном индикаторе на ХВК — *Gomphrena globosa*. Инкубационный период составлял 7–10 дней. Однако на других индикаторах (*Datura stramonium*) удалось подразделить разные изоляты вируса на мозаичную и некротическую группы. Хорошим дифференциатором мозаичных и некротических

штаммов ХВК является также *Nicotiana tabacum* v. *Sansun* 47/10.

При заражении указанных индикаторов некротическими штаммами ХВК помимо мозаики, крапчатости или желтой пятнистости развиваются некротические поражения растений; при заражении мозаичными штаммами - крапчатость, хлоротическая пятнистость, мозаика, но без каких-либо некротических явлений. Проявление симптомов обычно наступает через 7-8 дней на *D.metel* и *D.stramonium* и через 10-12 дней - на *N.tabacum*.

Таким образом, при дальнейшей классификации штаммов ХВК индикаторный метод, наряду с другими показателями, будет иметь немаловажное значение. Его преимуществом является наглядная демонстрация различий или сходства между исследуемыми штаммами по характерным симптомам на тест-растениях.

Поддерживать штаммы ХВК удобно на растении *N.glutinosa*, реагирующей на этот вирус симптомами мозаики или крапчатости. Некротических явлений на *N.glutinosa* от заражения испытанными штаммами в наших опытах не наблюдалось.

Хлоротическая курчавость листьев томата

Рассмотрим и проанализируем пример обнаружения нового растения-индикатора, ранее не известного для данного вируса.

Хлоротическая курчавость листьев томатов (ХКЛТ) - новое для стран СНГ вирусное заболевание. Оно впервые было описано и изучено в Туркменистане группой специалистов ВИЗР и Туркменистана (Власов, Сейидов, 1997; Сейидов, 1998). Болезнь широко распространилась на культуре томатов открытого и защищенного грунта. В результате проведенных исследований был установлен переносчик инфекции - оранжерейная (тепличная) белокрылка *Trialeurodes vaporariorum*.

Далее требовалось сопоставить указанное заболевание с аналогичными болезнями, известными в литературе. Совершенно неожиданно оказалось, что хлоротическая курчавость листьев томатов по некоторым существенным признакам отличается от сходных поражений на этой культуре.

Прежде всего, широко распространенная в ряде стран болезнь томатов - желтая курчавость листьев вызывается гемини-вирусами, тогда как в нашем случае в тканях больных растений обнаруживались, как правило, изометрические вирионы с размерами порядка 50 нм. Этот вирус еще не классифицирован, но его размеры и строение принципиально отличны от гемини-вирусов. Кроме того, желтая курчавость листьев томатов (гемини-вирус) распространяется не оранжерейной, а табачной белокрылкой.

Таким образом, установлены два отличия туркменской ХКЛТ от распространенной в других странах желтой курчавости листьев томатов - по морфологии вирионов и по наличию разных видов пере-

носчиков. Выяснилось, что дифференцировать эти болезни можно также с помощью растений-индикаторов. Методом прививок (болезнь не передается инокуляцией сока), а также путем передачи инфекции оранжерейной белокрылкой в проведенных опытах была отмечена характерная реакция на вирус у растения *Nicotiana glutinosa*. Это - морщинистость, зонтичность листьев и тесное группирование их на верхушке растения. Края листьев бывают более светлыми. Растения *N. glutinosa* отстают в росте, но долго вегетируют. Перечисленные признаки поражения *N. glutinosa* не являются случайными, и они, подчеркнем еще раз, проявляются как в результате прививки побегов больного томата на *N. glutinosa*, так и после передачи вируса на это растение посредством вирофорной белокрылки.

Учитывая специфичность симптомов на *N. glutinosa*, это растение может быть использовано как индикатор на хлоротическую курчавость листьев, распространенную в Туркменистане. Следует отметить, что в литературе нами не встречено аналогичных сведений о реакции *N. glutinosa* на подобные заболевания. При заражении *N. glutinosa* вирусом желтой курчавости листьев томата (геминивирус) на растении внешние признаки заболевания отсутствуют и отмечается лишь латентная инфекция.

Таким образом, в описанном случае обнаружен новый тип вирусного поражения томатов, что, помимо данных о морфологии вируса, подтверждается характерной реакцией на *N. glutinosa*.

Вирус некротического пожелтения жилок свеклы (ВНПЖС)

Этот патоген является возбудителем наиболее опасного вирусного заболевания сахарной свеклы - ризомании. Он относится к группе фузовирусов (палочковидные вирусы, переносимые грибами) и распространяется посредством зооспор гриба *Polymyxa betae*. В республиках бывшего Союза болезнь была впервые идентифицирована и изучена специалистами ВИЗР в Киргизии и Казахстане). В идентификации и изучении ВНПЖС значительное место в нашей работе занимал, наряду с другими приемами (иммунодиагностика, электронная микроскопия), метод растений-индикаторов. В частности, он использовался при идентификации и характеристике различных штаммов вируса. Было установлено, например, что растение *Gomphrena globosa* не реагирует на киргизские и некоторые казахские изоляты ВНПЖС. В то же время один из казахских изолятов, вызывающий системное поражение свеклы (симптомы и на корнеплодах, и на листьях) заражал *Gomphrena globosa*. На этом растении через 7-10 дней после заражения соком из листьев свеклы, содержащим ВНПЖС, развивались крупные диффузные хлоротичные пятна на инокулированных листьях. На примере ВНПЖС можно также проиллюстрировать зависимость реакции некоторых расте-

ний-индикаторов на вирус от экологических условий. Это важно иметь в виду, чтобы выращивать индикаторы в оптимальных условиях для типичного проявления инфекции (см. выше).

Так, растение *Chenopodium quinoa* характеризуется четкой локальной реакцией на большинство штаммов ВППЖС (однородные диффузные желтые пятна, постепенно увеличивающиеся в размерах - от 1-2 мм в диаметре до 5-10 мм). В то же время при чрезмерно высокой температуре воздуха либо при резких перепадах температуры нами неоднократно отмечалось и системное проявление ВППЖС на указанном виде растения-индикатора.

Способность к системной реакции на ВППЖС у *Ch. quinoa* может быть связана и с особенностями штамма вируса (табл.2).

Таблица 2. Особенности реакции растений-индикаторов на различные изоляты ВППЖС

Индикаторы на ВППЖС	Изоляты ВППЖС; симптомы на тест-растениях		
	Каз-89 (S)-изолят из листьев, Казахстан	Каз-88 - изолят из конеплодов, Казахстан	К-88 - изолят из корнеплодов, Киргизия
<i>Beta vulgaris</i>	L:GrSp-ChlSp-YSp, VC, VN	L:GrSp-ChlSp-YSp	L:ChlSp-YSp
Ялтушовская односемянная, Киргизская односемянная 25	S:GrSp, ChlSp, VC, NV, Rug, Dis, Stu	S:O	S:O
<i>Tetragonia expansa</i>	L:ChlSp-YSp, NLe, WLe S:O	L:ChlSp-YSp, NLe S:O	L:ChlSp-YSp, NLe, WLe S:O
<i>Gomphrena globosa</i>	L:ChlSp S:(-)	L:O S:O	L:O S:O
<i>Chenopodium quinoa</i>	L:YSp, NLe, WLe, Def S:O(-)	L:ChlSp-YSp, NLe, WLe, Def S:O(-)	L:ChlSp-YSp, NLe, WLe, Def S:VC, Dis, Ma, Stu, M(±)
<i>Ch. amaranticolor</i>	L:ChlSp-YSp, YSp, NLe, WLe, Def S:O	L:ChlSp-YSp, NLe, WLe, Def S:O	L:ChlSp-YSp, NLe, WLe, Def S:O
<i>Ch. murale</i>	L:ChlSp-YSp, NLe, WLe, Def S:Dis, Ma, Stu, M, Nec(±)	L:ChlSp-YSp, NLe, WLe, Def S:Dis, Ma, Stu, M, Nec(±)	L:ChlSp-YSp, NLe, WLe, Def S:Dis, Ma, Stu, M, Nec(±)

Условные обозначения: L - локальная реакция, S - системная реакция, CrSp - светлозеленые пятна, ChlSp - хлоротичные пятна, YSp - желтые пятна, VC - посветление жилок, VN - некроз жилок, Rug - морщинистость, Dis - деформация, W - увядание, Stu - задержка роста, Ma - искривление, M - мозаика, Le - лист, N - некротизация, Nec - отмирание (гибель), 0 - отсутствие реакции, (-) - сведения нуждаются в уточнении, (±) - проявление реакции у части растений, Def дефолиация.

Один из Киргизских изолятов ВНИЖС - К 88, наряду с местной реакцией на вирус, периодически вызывал симптомы и на отрастающих листьях индикатора в виде ярко-желтых и хлоротических пятен, а также деформации молодых листьев. В этом плане более одногипно реагирует на ВНИЖС *Chenopodium amaranticolor*. На заражение штаммами вируса различного происхождения, охарактеризованными в литературе (из Франции, Японии, США, Италии), а также из Киргизии и Казахстана, *Ch.amaranticolor* отвечает только локальной реакцией (Каверзнева и др.,1988). Таким же стабильным типом местной реакции на ВНИЖС характеризуется *Tetragonia expansa*. Более подробно особенности реакции различных видов растений на изоляты ВНИЖС из Казахстана и Киргизии показаны в таблице 2 (Якуткина и др.,1991).

Публикуемые данные должны учитываться специалистами стран СНГ при проведении фитосанитарного мониторинга на выявление ризомании сахарной свеклы и идентификации ВНИЖС.

Заключение

Метод растений-индикаторов не потерял своего значения и продолжает достаточно интенсивно применяться в фитовирусологии. Он обычно сочетается с другими приемами диагностики. В наших исследованиях растения-индикаторы широко используются при дифференцировании штаммов различных вирусов. Обращаем внимание фитопатологов, что ВИЗР проводит консультации по различным аспектам применения метода растений индикаторов в фитовирусологии, высылает по заявкам методическую литературу.

Литература

- Власов Ю.И., Сейидов Б. Новое инфекционное заболевание томатов - хлоротическая курчавость листьев. /Агро XXI, 4, 1997, с.8-9.
- Власов Ю.И., Теплоухова Т.Н., Якуткина Т.А., Ганжиган Е.П. Методические указания по селекции слабопатогенных штаммов вируса мозаики томатов (ВМТо). Л., ВИЗР, 1989, 20 с.
- Каверзнева Г.Д., Ларина Э.И., Власов Д.Ю. Ризомания сахарной свеклы. М., 1988, 52 с.
- Сейидов Б.К. Вирусные и микоплазменные болезни томатов в Туркестане и обоснование мер борьбы с ними. Автореф. канд. дисс. СПб., 1998, 19 с.
- Тертяк Д.Д. Возбудители вирусных болезней томатов в Молдове и усовершенствование методов их диагностики. Канд. дисс., Кишинев, 1990, 159 с.
- Фоминых Т.С. X-вирус картофеля на томатах защищенного грунта. Авт. канд. дисс. Л., ВИЗР, 1985, 20 с.
- Цыпленков А.Е., Одинец А.Г., Кириллов А.Б. Идентификация штаммов вируса огуречной мозаики различных сельскохозяйственных культур. /С.-х. биология, 5, 1992, с.115-121.
- Якуткина Т.А., Власов Д.Ю., Акперлизов М.А. Методические указания по оценке зараженности сахарной свеклы ризоманией. Л., ВИЗР. 1991, 32 с.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУСА ЖЕЛТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ЯЧМЕНЯ ПРИ ПОМОЩИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Т.Я.Васильева*, Т.Н.Ерохина**, Т.Б.Кастальева*, К.А.Можжаева*

*Всероссийский НИИ фитопатологии, Москва

**Институт биоорганической химии им.М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова, Москва

Принцип метода

Для определения вируса желтой карликовости ячменя ВЖКЯ в образцах зерновых культур используется "сэндвич" - вариант прямого иммуноферментного анализа (ИФА), то есть сначала на поверхности лунок полистироловых планшетов адсорбируют специфичные к ВЖКЯ антитела, затем в лунки вносят тестируемый материал, и, если в нем присутствует антиген, то происходит связывание последнего с антителами. Количество связанного антигена определяют с помощью антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, которые добавляют в лунки на следующем этапе. Оно пропорционально количеству связанного конъюгата, определяемого спектрофотометрически или визуально после добавления субстратов пероксидазы и прохождения ферментативной реакции.

В качестве иммуносорбента используются антитела моноклонов 4В5 и 3С2, полученных с помощью гибридомной технологии. Антитела 4В5 обладают специфичностью в отношении PAV штамма ВЖКЯ, но могут быть использованы и для определения двух других штаммов I серологической подгруппы - MAV и SGV. Антитела моноклона 3С2 специфичны в отношении RPV штамма II серологической подгруппы.

Сбор образцов

Для проведения анализа необходимо 0.5-1.0 г сухих листьев. Отбор образцов проводится в фазу колошения-цветения или в более ранние сроки при появлении типичных симптомов поражения злаковых ВЖКЯ: равномерного, начиная с верхушки, яркого пожелтения листьев ячменя и покраснения листьев овса и пшеницы. Для анализа составляют среднюю пробу из 7-10 листьев с разных растений. Поскольку вирус в большей степени накапливается в корнях и нижних листьях, для анализа брать не флаговые, а еще не отмершие листья первого - третьего междоузлий от корней. Собранные листья сразу высушивают и хранят при комнатной температуре. Одновременно с отбором образца дается общая характеристика: площадь посева, его состояние, фаза развития растений, степень

поражения посева ВЖКЯ (сплошное, очаговое или единичные растения), наличие и степень заселения растений тлями, присутствие других вирусов и патогенов (грибов, бактерий). Все эти данные желательно указывать в описании образца. Для контроля, особенно при сборе нескольких образцов, берутся листья со здоровых растений, вдали от инфицированных ВЖКЯ.

Приготовление экстракта

Высушенные на воздухе при комнатной температуре растения (листья или корни) мелко нарезать ножницами и растереть в порошок в ступке с жидким азотом. Для приготовления экстракта к 100 мг сухой измельченной ткани растений добавить 2.5 мл буфера для образцов или 0.1 М фосфатный буфер с pH 7.0. Периодически (в течение 1 часа) тщательно перемешивать и оставить на ночь при комнатной температуре. Утром еще раз тщательно перемешать, дать отстояться, надсадочную жидкость отобрать пипеткой и отцентрифугировать 10 мин при 10000 об./мин. Осветленный экстракт хранить в холодильнике при 4°C не более суток.

Проведение ИФА

1. Моноклональные антитела, хранящиеся при -20°C, разбавить покровным буфером до концентрации 5 мкг/мл. В каждую лунку полистиролового планшета внести 100 мкл раствора антител, закрыть крышкой и инкубировать 4 часа при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C.

2. Удалить раствор из лунок (вытряхнуть, перевернув планшет). Заполнить лунки промывочным буфером, потрясти планшет поступательными движениями влево-вправо, вперед-назад и вытряхнуть раствор. Операцию повторить 4-8 раз, после чего ударами перевернутого планшета по листу фильтровальной бумаги тщательно удалить раствор из лунок.

3. Каждый из предварительно приготовленных экстрактов растений тщательно перемешать и нанести по 100 мкл в лунку в расстановке, то есть в первую лунку внести 100 мкл экстракта без разведения, во вторую - 100 мкл разведенного в 5 раз исходного экстракта, в третью - 100 мкл разведенного в 25 раз исходного экстракта. Разведение можно делать непосредственно в лунках следующим образом: в первую лунку внести 100 мкл экстракта, во вторую и третью - по 100 мкл буфера, во вторую лунку добавить 25 мкл исходного экстракта, тщательно (возвратно-поступательными движениями поршня автоматической микропипетки) перемешать, отобрать 25 мкл раствора и перенести их в третью лунку, где также тщательно перемешать с буфером и удалить лишние 25 мкл раствора. Инкуби-

ровать в течение ночи при 4°C с закрытой крышкой, а затем промыть (см.п.2.).

4. Конъюгаты антител с пероксидазой хрена разбавить буфером для разведения конъюгата в 100 раз и внести в каждую лунку по 100 мкл раствора. Инкубировать 2 часа при комнатной температуре, закрыв крышкой. Тщательно промыть (п.2.).

5. Приготовить раствор субстрата: 10 мг о-фенилендиамина растворить в 10 мл свежеприготовленного фосфатно-цитратного буфера с рН 5.0 (см.ниже) и добавить 50 мкл 30%-ной перекиси водорода. В каждую лунку внести по 100 мкл полученного раствора. Инкубировать при комнатной температуре около 30 мин. для развития окраски. Остановить реакцию, добавив 50 мкл 1 N раствора серной кислоты.

Оценка результатов

Оценку результатов ИФА можно проводить с помощью специально предназначенного абсорбциометра при 492 нм или визуально. Оптическое поглощение для положительных проб должно превышать среднее поглощение отрицательных проб на величину трехкратного стандартного отклонения отрицательных проб при доверительном уровне 95 %. При разведении вирусного раствора в 5 и 25 раз должно происходить линейное уменьшение оптической плотности, в несколько раз превышающее уменьшение оптической плотности, наблюдаемое при разведении контрольного экстракта из здоровых растений. Если этого не происходит, то положительные значения можно считать ложными.

При визуальной оценке результатов анализа, дающей информацию "да" или "нет", применяется следующая шкала:

- вирус отсутствует: едва заметное окрашивание (как в отрицательном контроле),
- материал заражен: слабое, но хорошо заметное окрашивание, отличное от отрицательного контроля,
- материал сильно заражен: интенсивное окрашивание (как в положительном контроле, или еще более интенсивное).

Реактивы, растворы, оборудование

Фосфатно-солевой (промывочный) буфер (рН 7.4):

Натрий хлористый	8.0 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный (безводный)	1.15 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0.2 г
Калий хлористый	0.2 г
Твин-20 (добавляется после растворения остальных реактивов)	0.5 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл

Покровный буфер (рН 9.6):

Натрий углекислый	1.59 г
-------------------	--------

Натрий двууглекислый	2,93 г
Азид натрия	0,2 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл

Буфер для приготовления образцов:

Яичный альбумин	20,0 г
Азид натрия	0,2 г
Фосфатно-солевой промывочный буфер без добавления твина	до 1000 мл

Фосфатный буфер (0,1M, pH 7.0):

Калий фосфорнокислый двузамещенный ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$)	1,403 г
Натрий фосфорнокислый однозамещенный (NaH_2PO_4)	0,468 г
Дистиллированная вода	до 100 мл

Буфер для разведения конъюгата:

Бычий сывороточный альбумин (БСА)	2,0 г
Поливинилпирролидон	20,0 г
Азид натрия	0,2 г
Фосфатно-солевой промывочный буфер	до 1000 мл.

Фосфатно-цитратный буфер (pH 5.0):

Лимонная кислота	0,105 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный (безводный)	0,246 г
Дистиллированная вода	до 10 мл

Другие реактивы:

Жидкий азот,
Бычий сывороточный альбумин,
0-Фенилендиамин,
Гидроперит.

Для приготовления 30%-ного раствора перекиси водорода часть таблетки гидроперита (30 мг) растворить в воде (970 мкл).

Оборудование:

Весы, микроцентрифуга типа "Eppendorff", пробирки к ней, полистироловые планшеты, автоматические микропипетки, абсорбциометр типа "Titertek Multiskan", дююры.

Посуда:

Фарфоровые ступки, пробирки, мерные колбы, цилиндры.

Общие замечания

Концентрированные растворы антител и конъюгатов хранить при температуре $-15^{\circ}C$ - $20^{\circ}C$.

Разбавлять только такое количество антител и конъюгатов, которое необходимо для работы в течение дня.

Буферные растворы хранить в холодильнике при $+4^{\circ}C$. Раствор промывочного буфера без детергента (твина-20) стабилен в течение 6 месяцев.

Использовать только свежеприготовленный раствор субстратов

ПРИМЕНЕНИЕ ИМИТАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ PESTINS ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХИМИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Н.Н.Семенова, К.В.Новожилов, Т.М.Петрова

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Прогнозирование особенностей деградации и миграции пестицидов в почве имеет существенное значение как для рационального использования препаратов в сельском хозяйстве, так и для окружающей среды в целом. Применяемые химические средства защиты растений могут попадать в почву разными путями: целенаправленно, при их непосредственном внесении в почву и в результате "побочного эффекта" от наземных обработок - при смыве с листовой поверхности. Накоплены многочисленные данные, свидетельствующие о способности пестицидов сохраняться в почве длительное время, образуя устойчивые соединения с почвенно-поглощающим комплексом, и затем мигрировать в смежные природные среды. Все более жесткие требования, предъявляемые к экологической безопасности химических средств защиты растений, стимулируют развитие математических методов исследования поведения применяемых препаратов в различных компонентах экосистем и прогнозирования возможных последствий загрязнения почв.

За последние десять лет построены подробные имитационные модели поведения пестицидов в почве. Эти модели основаны на фундаментальных исследованиях физических, химических и биологических процессов в системе почва - пестицид - окружающая среда и в большинстве своем являются детерминированными. Использование имитационных моделей, прошедших всестороннюю проверку, может явиться серьезной альтернативой полевым экспериментам, проводимым для определения степени опасности применяемых химических средств защиты растений. Тестирование, основанное исключительно на полевых опытах, требует значительных затрат и занимает много времени (необходимо изучить поведение достаточно широкого круга препаратов при различных сочетаниях почвенно-климатических условий). Компьютерная модель дает возможность сравнивать поведение пестицидов в широком диапазоне изменения характеризующих данные условия факторов.

В настоящее время большое внимание уделяется возможности использования построенной модели не только авторами разработки, но и другими заинтересованными лицами, что ставит задачу создания интерфейса, обеспечивающего удобный для пользователя диалоговый режим, не требующий специальных знаний в области программирования, а только некоторых навыков работы на ПЭВМ. Кроме того, для работы с моделью необходим определенный набор вход-

ной информации. Таким образом, проблема прогнозирования поведения химических средств защиты растений в почве требует для своего решения построения не просто имитационной модели, а имитационной системы, куда бы входили и сама модель, и базы данных, и оболочка, осуществляющая счет модели, вывод и соответствующее оформление результатов, а также обеспечивающая общение с базой данных.

Описание системы

Конструирование именно такой прогностической имитационной системы PESTINS, моделирующей динамику и миграцию нелетучих пестицидов в почве, было предпринято в ВИЗР. Интеллектуальным ядром системы является математическая модель прогнозирования поведения пестицидов в почве (Петрова, Семенова, 1991). Принципиальным отличием данной модели от построенных на той же функциональной основе моделей типа PRZM (Carsel et al., 1984), LEACHMP (Hutson, Wagenet, 1987) и PESTLA (Boesten, Linden, 1991), главная цель которых - оценка опасности проникновения препаратов в грунтовые воды, является ее ориентированность на решение задач защиты растений. Достоверность модели проверялась в ряде экспериментов: с инсектицидами базудин и дурсбан - на дерново-подзолистых почвах и черноземах и с гербицидами трефлан и прометрин - на каштановых почвах (Zaslavsky et al., Petrova, Semenova, 1992; Новожилов и др., 1997).

В систему PESTINS входят также оболочка, реализующая диалог с пользователем, и специальная база данных. Оболочка поддерживает следующие функции системы: ввод данных и общение с базами данных; счет модели; вывод результатов; повтор расчетов при изменении входных данных. Результаты моделирования оформляются в виде таблиц и графиков; кроме того, есть возможность просмотра и вывода на печать файла входных данных и стандартного выходного файла, которые создаются в ходе каждого прогона модели.

База данных системы PESTINS делится на две части, одна из которых закрыта для пользователя, а содержащиеся в другой части числовые данные доступны для корректировки. Пользователю предлагается список препаратов, который состоит из наиболее употребляемых пестицидов (инсектицидов, гербицидов, фунгицидов), а также список типов почв, различающихся по своему градулометрическому составу. Выбор препарата означает подключение файла, содержащего характеристики физико-химических свойств предложенного списка препаратов: адсорбции, деградации, диффузии. Эти параметры в процессе работы с моделью могут быть изменены. Гидрофизические характеристики почвы уточняются непосредственно по ред первым прогоном модели и в дальнейшем изменению по подде-

жат. Аппроксимация характеристики водоудерживания и коэффициента влагопроводности проводится с использованием экспоненциально - логарифмических зависимостей Терлеева (Терлеев, 1988).

Структура оболочки позволяет повторять расчеты при замене только тех данных, которые характеризуют проводимые агротехнические мероприятия. Это дает возможность, задавая различные сценарии режимов полива и варьируя количество вносимого пестицида, проводить сравнительные экологические экспертизы агротехнологий, определять оптимальные дозы для конкретных почвенно-климатических условий. Под оптимальной в данном случае понимается такая доза пестицида, при которой достигается максимальная биологическая эффективность при минимальных значениях содержания пестицидов и глубины миграции.

Система прогнозирования PESTINS позволяет также оперативно определять распределение пестицида в интересующем пользователя слое почвы, содержание пестицида в почвенном растворе, динамику сорбции пестицида почвой, потери за счет деградации для широкого спектра метеорологических условий. Для расчета может быть использован стандартный набор среднесуточных, среднедекадных или среднемесячных метеоданных.

Лежащая в основе системы имитационная модель совместного переноса влаги и пестицида по почвенному профилю учитывает взаимодействие пестицида с почвенно-поглощающим комплексом и относится к одномерным детерминистским моделям. Степень сложности описания физико-химических процессов, происходящих в почве, была выбрана таким образом, чтобы достигался компромисс между прикладной направленностью модели и возможностью использовать модель для решения задач исследовательского характера.

Коэффициенты, входящие в систему уравнений, описывающую модель, зависят от влажности почвы, а в некоторых случаях и от концентрации растворенного вещества, поэтому данная система дифференциальных уравнений является квазилинейной. Нахождение аналитических решений таких систем возможно лишь в некоторых частных случаях, поэтому использовался традиционный численный метод конечных разностей. Система дифференциальных уравнений заменялась ее дискретным аналогом. Почвенный профиль разбивался на N слоев, которые не обязательно должны иметь одинаковую толщину. Шаг по времени был выбран равным 1 суткам. В расчетном алгоритме, использующем разностную схему Кранка-Николсена, заложено использование условий (Заславский, Семенова, Терлеев, 1989), гарантирующих применимость процедур прогонки и сходимость итерационного процесса, то есть выбранная расчетная схема дает возможность контролировать накопление погрешности в заданных пределах.

Предполагается, что основные процессы, оказывающие непо-

средственное влияние на перераспределение и трансформацию пестицида в почве, это диффузионно-конвективный перенос, деградация и сорбция препарата. В данном случае и деградация, и сорбция - это интегральные характеристики целой совокупности процессов. Сорбция включает в себя адсорбцию, абсорбцию, хемосорбцию и выпадение в осадок. Считается, что миграция пестицида по почвенному профилю происходит либо при сорбционно-десорбционном равновесии между жидкой и твердой фазами, либо задается кинетическим уравнением, но в обоих случаях описывается линейной изотермой. Деградация, включающая в себя фотолиз, гидролиз, окисление, биодеградацию и т.д., задается соотношением первого порядка. Параметры, характеризующие сорбцию и деградацию, могут меняться в зависимости от глубины почвенной толщ.

Можно выделить два основных направления использования разработанной системы. Первое - это исследование особенностей поведения отдельных препаратов в конкретном полевом эксперименте и вклада различных факторов в формирование этих особенностей, второе - оценка и сравнительная характеристика некоторого набора препаратов при применении их в различных почвенно-климатических условиях. В зависимости от целей применения изменяются и требования к получению входных данных, необходимых для работы с системой. В первом случае требуется конкретная информация о генетическом типе почвы, гранулометрическом составе и гидрофизических характеристиках опытного поля, настройка параметров системы, описывающих физико-химические свойства пестицида, к данным почвенным условиям, метеоданные за исследуемый период времени. Во втором случае возможно использование среднестатистических характеристик определенных типов почв и препаратов, среднедекадных или среднемесячных метеоданных.

Работа с системой PESTINS

Система PESTINS работает в OS MSDOS версии 3.2 и выше с альтернативной кодировкой символов кириллицы. Требуется 512 Kb оперативной памяти и 880 Kb памяти на жестком диске. Для работы с системой необходимо, чтобы все ее файлы помещались в одну директорию. В этой директории находится группа файлов, содержащих данные, характеризующие физико-химические свойства пестицидов, включенных в систему. В названиях файлов использованы начальные буквы названий препаратов: BASUD.DAT, DA24.DAT и т.д.

Обращение к системе производится запуском командного файла MEN.BAT, причем вызов осуществляется из того же директория, где располагаются файлы системы PESTINS. Входные данные и результаты вычислений содержатся в файлах DAN.DAT и PSRES.DAT соответственно, которые образуются в результате работы с системой

Поэтому в текущем директории необходимо иметь место для размещения временных файлов. Размер этих файлов существенно зависит от длины временного промежутка, на котором производится расчет. При перезапуске системы все временные файлы удаляются.

Описание данных, вводимых пользователем

После вызова системы на экране появляется информация, характеризующая функции системы PESTINS. Нажатием произвольной клавиши можно перейти непосредственно к выбору препарата, который предполагается исследовать. Сначала надо задать группу, к которой принадлежит пестицид: инсектицид, фунгицид или гербицид, а затем установить курсор на требуемом названии. Вид экрана при выполнении указанных действий демонстрирует рисунок 1.

Инсектициды	Фунгициды	Гербициды
Амбуш	Альто	Ацетохлор
Базудин	Байлетон	2-4 Д
Волатон	Беномил	Прометрин
Децис	Гилт	Рейсер
Дурсбан	Фоликур	Трефлан
Малатион		
Линдан		
Фамидофос		
Фастак		
Цимбуш		

Рис 1. Вид экрана при выборе препарата

Параметры, характеризующие деградацию и сорбцию пестицидов, входящих в систему PESTINS, приведены в таблице 1. Гибкая структура системы допускает включение дополнительного списка препаратов, если известны их физико-химические свойства.

После выбора препарата пользователь должен ввести дату внесения его в почву (день, месяц, год) и дату окончания эксперимента. Данный экран управляется двумя клавишами: <ENTER> - ввод даты, <ESC> - возвращение к предыдущей, если необходимо внести исправление.

Далее предлагается выбрать тип почвы и ее гранулометрический состав. Генетические типы почв и градации ее гранулометрического состава, включенные в систему PESTINS, приведены в таблице 2. Затем требуется ввести содержание гумуса в процентах. В имитационной модели предусмотрено разделение почвы на два горизонта: пахотный и подпахотный, что дает возможность ввести меняющиеся по глубине гидрофизические характеристики.

Таблица 1. Физико-химические свойства исследуемых препаратов

Название препарата	Скорость деградации $K_p = 0.697 / DT_{50}$ 1/сут.	Распределительные коэффициенты для определения адсорбции	
		$\log(K_{oc})$	$\log(K_{ow})$
2,4-Д	0.03-0.046 (c); 0.096 (d) *0.025	1.3 (d)	-1.4, +2.8 (b)
Альфафаметрин	0.013-0.063 (f) *0.038	4.12(g)	6.94 (c2)
Ацетохлор	*0.34 (c1)	2.74(g2)	2.95 (h2)
Беномил	0.0063-0.1486(a) *0.075	2.03(g)	2.42 (a)
Декаметрин	*0.0056 (c2)	5.9 (g)	7.6 (h2)
Диазинон	0.03-0.089 (k); 0.033-0.067(a) 0.021 (d); *0.046	1.93 (d)	3.4 (b)
Карбофос	0.415-2.91(c2) *1.64	2.2 (d)	2.8 (b)
Линдан	0.0009-0.0029(b); 0.0038(d) 0.0058-0.017(к); *0.012	3.11(d)	3.7 (b)
Перметрин	0.017-0.043 (b); 0.035(n) *0.03	4.2 (g) 2.5 (g)	6.5 (b) 2.88 (d)
Прометрин	0.0154-0.0462(c1); 0.0126 (d) *0.0308	2.79 (d)	3.3 (b)
Пропроназол	0.023-0.035(e); *0.029	3.27 (i)	3.74 (h)
Тebuконазол	*0.069 (c1)	2.98 (g)	3.7 (c2)
Триадимефон	0.023-0.035(e); *0.029	3.03 (ii)	3.26 (d)
Трифлуралин	0.0063-0.0126 (c2) 0.0026-0.0956(j)	3.8 (d)	4.6 (b)
Фамидофос	0.0057(a); 0.007-0.046(к) *0.026	0.59(g2)	0.8 (b)
Флорохлоридон	0.007-0.0063 (c1) *0.0066	2.7 (g)	3.35 (c2)
Фоксим	0.024 (c2); 0.0026 (d); 0.012-0.028(к); *0.02	3.11(d)	4.02 (h2)
Хлорпирифос	0.012-0.38 (к); 0.011 (d); *0.025	3.78(d)	4.3 (b)
Цимбуц	0.014-0.023(m); *0.019	4.98(g)	6.3 (c2)
Ципроконазол	*0.033 (c1)	2.39 (g)	2.91 (c2)

Примечание: DT_{50} - период полураспада (дни);

K_{ow} - коэффициент распределения между октанолом и водой (cm^3g^{-1});

K_{oc} - коэффициент распределения между органическим углеродом и водой (cm^3g^{-1}); Sol - растворимость препарата; Mw - молекулярный вес;

* - значение, внесенное в базу данных; a) Carsel et al.,1984;

b) Finizio et al.,1997; c1) Новожилов и др.,1980;

c2) The pesticide manual, 9 edit.,1995; d) Juri et al.,1987;

e) Друскельдизов,1990; f) Максютa,1990;

g) вычислено по формуле $\log(K_{oc}) = 0.89 \log(K_{ow}) - 0.23$;

g2) вычислено по формуле $K_{oc} = 0.63K_{ow}$ (Karickhoff et al.,1979);

h2) вычислено по формуле $\log(K_{ow}) = 5.01 - 0.67 \log(Sol) + 0.67 \log(Mw)$ (Finizio et al.,1997);

- и1) вычислено по формуле $\log(K_{oc}) = 3.0 - 0.54 \log(\text{Sol}) + 0.54 \log(\text{Мв})$ (Carsel et al., 1984);
 и2) вычислено по формуле $\log(K_{oc}) = 3.64 - 0.55 \log(\text{Sol})$ (Carsel et al., 1984);
 j) Калмакбаев, 1992; к) Новожилов и др., 1984; м) Briggs, 1981;
 н) Шууровенков, Гулидова, 1987.

Таблица 2. Основные типы исследуемых почв и градации гранулометрического состава

Дерново-подзолистые	Чернозем	Кашиановые	Серые лесные
Песчаные	Легко-суглинистые	Суглинистые	Песчаные
Супесчаные	Суглинистые	Тяжело-суглинистые	Супесчаные
Легко-суглинистые	Тяжело-суглинистые	Легко-глинистые	Легко-суглинистые
Суглинистые	Легко-глинистые	Глинистые	Суглинистые
Тяжело-суглинистые	Глинистые	Тяжело-глинистые	Тяжело-суглинистые
Легко-глинистые	Тяжело-глинистые		Легко-глинистые
Глинистые			Глинистые

В следующих окнах задается сетка для расчетов динамики пестицидов и влаги в почве, то есть пользователь определяет число и глубину слоев в пахотном и подпахотном горизонтах. Таким образом, для каждого слоя будет вычисляться среднее значение концентрации препарата и влажности почвы. Разумным представляется ограничение на суммарное количество слоев - не более 30.

Выбранная конечно - разностная схема решения дифференциальных уравнений допускает задание неравномерных слоев по глубине. Толщины слоев могут изменяться в интервале от 1 до 30 см. Оптимальными в смысле достижения наименьшей погрешности будут слои, равные 5 см для пахотного слоя и 10 см - для подпахотного. Если препарат сильно сорбируется почвой и почва содержит значительное количество органического вещества (больше 3-4%), и, следовательно, миграция на значительную глубину невозможна, то толщины слоев вблизи поверхности почвы можно выбрать равными 1 см. При вероятности миграции препарата на большую глубину (больше 2 м) слои почвы вблизи нижней границы расчетной толщи следует задавать максимальной величины - 30 см. Сильная неравномерность слоев (например, после слоя толщиной 5 см выбран слой с толщиной 30 см) может увеличить погрешность вычислений. Поэтому требуется постепенный переход к слоям с большой толщиной: 5 - 10 - 15 - 20 - 25 - 30 см.

Продолжает формирование данных серия вопросов о физических характеристиках почвы для пахотного и подпахотного горизонтов: требуется ввести объемную плотность, полную влагоемкость и

максимальную гигроскопичность. Значения данных характеристик почвы в зависимости от ее гранулометрического состава приведены в таблице 3.

Таблица 3. Гидрофизические характеристики почв в зависимости от ее гранулометрического состава

Гранулометрический состав почвы	Максимальная гигроскопичность ^a см ³ /см ³	Полная влагоемкость* см ³ /см ³	Объемная плотность** г/см ³
Песчаная	0.02 (0.001-0.039)	0.417(0.354-0.480)	1.02(0.86-1.45)
Супесчаная	0.035(0.003-0.067)	0.401(0.329-0.473)	
Легко-суглинистая	0.041(0.0-0.0106)	0.412(0.283-0.541)	1.49(1.25-1.76)
Суглинистая	0.027(0.0-0.074)	0.434(0.334-0.534)	1.42(1.16-1.58)
Тяжело-суглинистая	0.075(0.0-0.174)	0.390(0.279-0.501)	1.30(0.94-1.54)
Легко-глинистая	0.056(0.0-136)	0.321(0.207-0.435)	
Глинистая	0.090(0.0-0.195)	0.385(0.269-0.501)	

*Rawls W.J et al.,1982.

**Baes C.F. et al.,1983.

Один из существенных факторов, определяющих поведение пестицида в почве, это увлажненность поля в момент проведения обработки. Пользователь должен задать влагозапас либо для расчетного, либо для нахотного, либо для метрового слоя почвы. Для увеличения точности расчетов предпочтительнее информация о влагозапасе в расчетной толще, особенно для песчаных и супесчаных почв, для которых велик риск проникновения препарата на глубину более 1 м.

В почве перед внесением новой дозы могут присутствовать остаточные количества препарата. Содержание остаточных количеств пестицида вводится в кг/га и задается глубина, на которой он обнаружен. Если данный пестицид в почву ранее не вносился или к началу проведения эксперимента обнаружить его не удалось, то остаточное количество пестицида задается равным нулю. Далее вводятся данные о способе внесения препарата в почву: количество внесенного препарата в кг/га и глубина его заделки. Обычно глубина заделки не превышает 10-15 см. В случае поверхностного внесения препарата глубина заделки предполагается равной 1 см.

Следующий блок вопросов связан с заданием погодных условий. Это температура и влажность воздуха, сумма выпавших осадков. Если район, где происходит исследование препарата, находится в зоне поливного земледелия, то пользователь может задать сценарий полива. В зависимости от целей исследования и имеющейся в сто

распоряжении информации пользователю предлагается выбрать, каким образом задавать гидрометеорологические данные. Это средние значения температуры и влажности воздуха за месяц, за декаду или за сутки и, соответственно, суммарные осадки за месяц, декаду или сутки (в мм).

Естественно, чем более обобщенными задаются климатические условия на входе, тем более приближительный характер имеет то, что получается на выходе. При введении среднемесячной информации результаты по распределению пестицидов в почвенном профиле носят скорее качественный, сравнительный характер. Разработка сценария полива по существу равносильна выбору специального управляющего воздействия на перераспределение пестицида в почве, поэтому в дальнейшем при проведении расчетов возможно изменять даты и объем поливов.

К сожалению, информация о температуре почвы не относится к разряду легкодоступных, поэтому в диалоге предусмотрено два варианта: пользователь не имеет таких данных; пользователь может сообщить ход изменения температуры почвы по месяцам, декадам или суткам.

Глубина залегания грунтовых вод является естественным мериллом определения опасности применения пестицида. В системе предлагаются два варианта выбора условий их расположения: совпадает или не совпадает уровень грунтовых вод с границей расчетной толщи. Если уровень грунтовых вод расположен ниже границы расчетной толщи, то следующий выбор пользователя базируется на его информированности: при наличии сведений о расположении грунтовых вод надо задать уровень их залегания, при отсутствии таковых надо хотя бы приблизительно оценить ситуацию - ниже или выше 5 метров они находятся. Здесь также из неопределенности исходной информации возникает неопределенность ответа на основной вопрос: проникают ли пестициды в грунтовые воды? В спорных ситуациях следует провести расчеты на большей глубине.

Таким образом всю необходимую для работы с системой информацию можно классифицировать согласно Б.Г.Заславскому и Р.А.Полужакову (1988) и представить в виде таблицы (табл.4).

Компьютерный эксперимент с моделью

После ввода данных автоматически производится прогон расчетного модуля системы и пользователю предлагается меню (рис.2). В нем предусмотрены просмотр и печать файлов, содержащих: результаты расчетов; входную информацию, вводимую пользователем, и параметры модели, входящие в закрытой базе данных; графическую интерпретацию этих расчетов. Вход в пункт меню "измене-

ние данных” позволяет задать новый набор управляющих воздействий: дозу и глубину внесения препарата, даты и объем поливов, после чего необходимо перейти в пункт меню ”повтор расчета”.

Таблица 4. Классификация входных данных

Начальное состояние модели	Время проведения эксперимента	Параметры модели	Набор метеоданных	Расчетная схема модели	Управляемые входные данные
Препарат и его физико-химические свойства.	Дата начала эксперимента.	Содержание гумуса.	Осадки.	Число почвенных слоев.	Вносимая доза препарата.
Тип и механический состав почвы.	Дата окончания эксперимента.	Максимальная гигроскопичность.	Температура воздуха.	Толщина слоев.	Глубина заделки препарата.
Содержание остаточных количеств препарата.		Полная влагоемкость.	Влажность воздуха.		Дата полива.
Влагозапас.		Объемная плотность.			Объем полива.

После первого прогона модели, просмотра и анализа полученных результатов может возникнуть ситуация, при которой требуется настройка модели по имеющимся экспериментальным данным. Такая настройка может осуществляться путем корректировки физико-химических характеристик препарата (коэффициентов деградации и распределения) при входе в пункт меню ”изменение данных”.

После настройки модели для выбранного пестицида возможно решение задач по сравнительному анализу и оперативному прогнозу его поведения. В первом случае целью эксперимента является сравнительное изучение поведения препарата при различных сочетаниях заданных управляющих воздействий при многократном прогоне модели, во втором случае производится однократный прогон до даты прогноза.

Просмотр:	Печать:	Изменение данных:	Повтор расчета	Выход
1.Файла результатов 2.Входных данных 3.Графиков	1.Файла результатов 2.Входных данных 3.Графиков	1.Дозы и глубины внесения 2.Входных данных полива 3.Коэффициентов деградации препарата 4.Коэффициентов распределения		

Рис.2. Вид экрана при повторных прогонах модели

Структура данных в выходных файлах системы

В файле, содержащем результаты моделирования (PSRES.DAT), выдаются профили объемной влажности почвы, содержание пестицида в растворенной фазе, содержание пестицида в адсорбированном виде и общее содержание пестицида по слоям. Временные интервалы для этих данных согласованы с типом задания гидрометеорологических данных, то есть если задаются среднемесячные (среднедекадные, среднесуточные) данные, то и данные о содержании пестицида и влаги в почве выдаются через соответствующий временной интервал. Если гидрометеорологические данные задаются как среднесуточные и временной интервал проведения эксперимента превышает 20 суток, то выходная информация выдается подекадно. В файле результатов содержатся также данные об изменении в течение расчетного периода влагозапаса почвы, общем и адсорбированном количестве препарата по всей расчетной толще. Просмотр файла входных данных (DAN.DAT) поможет пользователю проконтролировать себя и проверить правильность введенной информации.

При проникновении пестицида в грунтовые воды выдается ответ, в какой момент времени после внесения препарата это произошло и какое количество пестицида в промежуток времени до окончания эксперимента успело туда попасть. Если пестицид за расчетный период в грунтовые воды не проник, но прошел в нижние расчетные слои, а нисходящие водные потоки преобладают, то рекомендуется повторить эксперимент, увеличив размер расчетной толщи.

Пример работы с системой

В заключение приведем конкретный пример, иллюстрирующий схему проведения машинного эксперимента с помощью системы PESTINS, не углубляющийся в детали практики моделирования.

В работе К.В.Новожилова, Т.М.Петровой, Ю.В.Андреева (1984) проводилось комплексное исследование транслокации и трансформации гранулированного инсектицида базудин на двух генетических типах почв Среднего Поволжья: черноземе легкосуглинистом и дерново-подзолистой супесчаной. Для изучения характера динамики препарата в почве были поставлены полевые деляночные опыты. Закладку опытов организовали во второй декаде мая (дата внесения 10-15 мая). Конец эксперимента приходился на окончание вегетационного периода. Параметры, характеризующие гидрофизические свойства почв и содержание гумуса, приведены в таблице 5.

Почву обрабатывали гранулированным препаратом, содержащим 10% действующего вещества, из расчета 30 и 50 кг/га (3 и 5 кг/га д.в.). Препарат вносили вручную равномерным рассевом гранул по поверхности почвы с последующей заделкой дисковым культива-

тором в пахотный слой на глубину 10 см. Почвенные образцы для определения содержания инсектицидов отбирали сразу после внесения препаратов и через 7, 14, 28, 56, 84, 112 дней. Для отбора образцов использовали почвенный бур диаметром 2.5 см.

Таблица 5. Характеристика исследуемых почв

Тип и гранулометрический состав почвы	Максимальная гигроскопичность, $\text{см}^3/\text{см}^3$	Полная влагоемкость, $\text{см}^3/\text{см}^3$	Объемная плотность, $\text{г}/\text{см}^3$	Содержание гумуса
Чернозем легко-сушливый	0.12 (а)	0.43	1.4	8.4 (с)
	0.14 (б)	0.46	1.5	1.5
Дерново-подзолистая супесчаная	0.04	0.36	1.4	2.8
	0.06	0.40	1.5	0.5

а) Среднее для пахотного слоя. б) Среднее для подпахотного слоя. с) В %.

Агрометеорологические условия вегетационного сезона в пунктах проведения опытов определялись подекадно. В лабораторных условиях изучалась динамика разрушения препарата в зависимости от температуры, влажности и микробиологической активности почвы. В результате проведения экспериментов получен интервал изменения времени полураспада DT_{50} от 23 до 77 дней. Исходя из данных исследования, были выбраны средние значения коэффициентов деградации для дерново-подзолистой почвы и чернозема, соответствующие периодам полураспада, равным 33 и 24 суткам. Коэффициент распределения (K_{OC}) был выбран согласно данным работы Jury et al. (1987), равный $84.5 \text{ см}^3/\text{г}$. Грунтовые воды на экспериментальных полях находились на глубине не выше 3 метров. Таким образом, мы имеем полный набор данных для проведения компьютерного эксперимента.

Пусть целью эксперимента является сравнительное изучение поведения инсектицида базудин при внесении его в равных дозах (3 кг/га по д.в.) в почвы различных генетических типов с заделкой гранул на различную глубину (10 см и 5 см) для двух контрастных по влажности сезонов и оценка влияния этих трех факторов на биологическую эффективность и экологическую безопасность препаратов. Для чернозема, кроме того, проводились расчеты для дозы препарата 5 кг/га по д.в. Так как на проволочников, против которых применяется данный препарат, базудин воздействует только в растворенной фазе, то в качестве показателя биологической эффективности пестицида возьмем количество препарата, содержащегося в растворе во всем расчетном слое почвы в момент наибольшей активности вредителей (в данном случае через три недели после внесения). Для оценки экологической безопасности традиционным критерием является количество препарата, разложившегося к концу вегетации, и глубина, на которую мог проникнуть пестицид.

На первом этапе компьютерного эксперимента производится на-

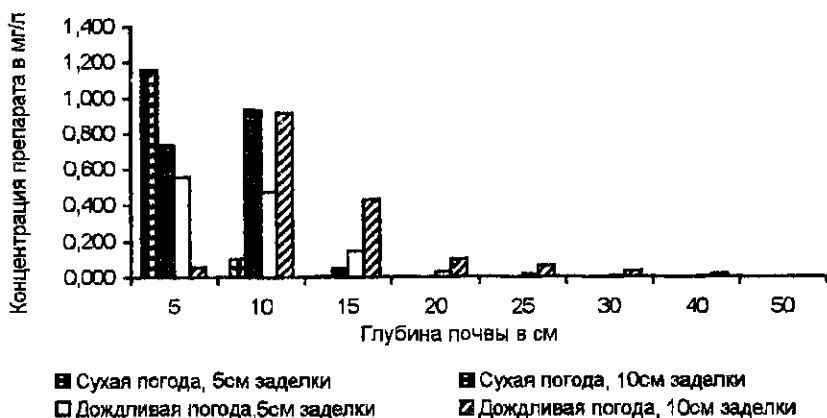


Рис.5. Содержание базудина в почвенном растворе на 21 сутки после внесения в дерново-подзолистую почву в дозе 3 кг/га

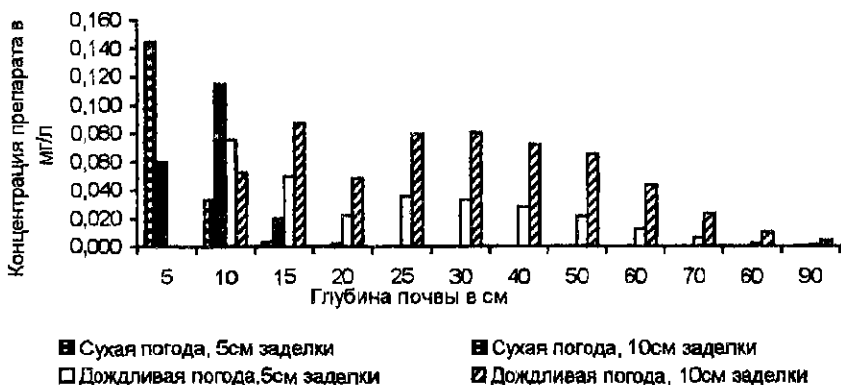


Рис.6. Содержание базудина в почвенном растворе на 122 сутки после внесения в дерново-подзолистую почву в дозе 3 кг/га

Показатель экологической опасности - процент разложившегося препарата в конце сезона вегетации - имеет достаточно сглаженный характер для чернозема при остальных градациях факторов. Не слишком сильное варьирование этого показателя (не более 7%) наблюдаем и для дерново-подзолистой почвы. Но сравнение всех вариантов по содержанию препарата в почвенном растворе дает нам совсем иную картину. Содержание препарата в почвенном растворе

для дерново-подзолистой почвы в варианте заделки на 10 см и при большом количестве осадков отличается от аналогичного количества для той же почвы и варианта заделки в 5 см при сухой погоде в 6 раз, а для чернозема при всех градациях факторов - в 20 раз.

На рисунках 4, 6 показано влияние различных сочетаний исследуемых факторов на глубину проникновения базудина. Как и следовало ожидать, наиболее экологически опасным является вариант внесения базудина для дерново-подзолистой почвы при глубине заделки 10 см и дождливой погоде. В этом случае препарат может проникнуть на глубину до 1 м. Для чернозема практически все количество препарата содержится в слое 0 - 15 см.

Следовательно, основным результатом компьютерного эксперимента можно считать вывод о необходимости расчета содержания препарата в почвенном растворе как для определения биологической эффективности, так и для оценки экологической опасности препарата.

Заключение

Таким образом, имитационная система прогнозирования поведения пестицидов по почвенному профилю позволяет решить ряд важных проблем. В первую очередь, это замена дорогостоящих, занимающих много времени полевых экспериментов компьютерными, причем для экстремальных условий, которые не всегда можно реализовать в природе. Кроме того, заложенные в модель представления о физико-химических и биологических аспектах взаимодействия пестицидов с почвой дают возможность решать задачи исследовательского характера, в частности не только определять степень экологического риска, возникающего при применении того или иного пестицида, но и получить представление о возможных механизмах его возникновения.

Литература

Друскельдинов С.Б. Деградация перспективных пестицидов в почве и в растениях зерновых культур. /Тез. докл. симпоз. "Деградация пестицидов при защите с.-х. культур от комплекса вредных организмов". Л., 1990, с.20.

Заславский Б.Г., Полуэктов Р.А. Управление экологическими системами. М., 1988, 296 с.

Заславский Б.Г., Семенова Н.Н., Терлеев В.В. Численный метод расчета миграции влаги и растворенного вещества в почве. /Физика и физико-химия корнеобитаемого слоя почвы. Тр. АФИ, Л., 1989, с.33-48.

Калмакбаев Т.Ж. Поведение пестицидов различного фитосанитарного назначения в почве в условиях орошения. /Агрохимия, 7, 1992, с.117-121.

Максота Л.А. Изучение персистентности фастака в почве. Там же. с.103.

Новожилов К.В., Мельников Н.Н., Попова Т.Н. Химические средства защиты (Пестициды). Справочник. М., 1980, 286 с.

стройка модели по данным полевых опытов, а потом осуществляется прогон модели по всем градациям изучаемых факторов. В таблице 6 приведены результаты расчетов по модели.

Данные таблицы 6 свидетельствуют, что тип почвы оказывает самое большое влияние на содержание препарата в растворе на 21 сутки, то есть на основную характеристику биологической эффективности. Во всех случаях в расчетной толще дерново-подзолистой почвы количество базудина в растворе почти в два раза превышает аналогичное количество для чернозема при одинаковой дозе в 3 кг/га. Примерно такой же показатель биологической эффективности для чернозема может быть достигнут только внесением дозы в 5 кг/га.

Таблица 6. Сравнительная характеристика содержания базудина в расчетной толще почвы

Глубина заделки базудина:	0 - 5 см				0 - 10 см			
	Погода:		Погода:		Погода:		Погода:	
	сухая	дождливая	сухая	дождливая	сухая	дождливая	сухая	дождливая
Дни после внесения базудина:	21	122	21	122	21	122	21	122
Чернозем,	0.12*	0.006	0.11	0.004	0.12	0.006	0.12	0.005
доза 3кг/га д.в.	47.8**	97.4	51.0	98.1	47.8	97.4	49.3	97.6
Чернозем,	0.21	0.01	0.19	0.008	0.20	0.01	0.20	0.01
Доза 5кг/га д.в.	47.8	97.4	51.0	98.1	47.8	97.4	49.3	97.4
Дерново-подзолистая,	0.20	0.023	0.19	0.045	0.20	0.025	0.26	0.11
доза 3кг/га д.в.	41.1	93.4	48.0	83.6	40.2	92.9	43.0	78.0

*Содержание базудина в почвенном растворе в кг/га,

**Количество деградировавшего базудина в % от внесенного.

Влияние глубины заделки для чернозема практически отсутствует, а для дерново-подзолистой почвы выражено только для периода с повышенной влажностью. Воздействие повышенной влажности на показатель биологической эффективности неоднозначно и может быть объяснено только с учетом миграции препарата по почвенному профилю. С одной стороны, повышенная влажность вызывает усиление деградации базудина, что видно по незначительному уменьшению количества препарата в почвенном растворе для чернозема. С другой стороны, при выпадении большого количества осадков следует ожидать проникновения пестицида в более глубокие почвенные слои, где процесс деградации происходит гораздо медленнее. Именно такую картину мы наблюдаем для дерново-подзолистой почвы: количество препарата в почвенном растворе для дождливого периода в случае заделки на глубину 10 см увеличивается почти на 30%.

На рисунках 3-6 приведены графики распределения базудина по почвенному профилю на 21 и 122 сутки соответственно. На 21-ые

сутки базудин в рассматриваемом варианте достигает глубины 30 см (что является максимальной глубиной для всех градаций факторов). Поскольку скорость деградации базудина и сорбционные свойства почвы уменьшаются с глубиной, повышенное количество препарата в почвенном растворе вполне объяснимо. Кроме того, препарат, проникшей на глубину, большую толщины пахотного слоя, уже не оказывает воздействие на вредителя. Поэтому для оценки биологической эффективности следует рассматривать не общее количество препарата в почвенном растворе, а только ту его часть, которая приходится на пахотный горизонт.

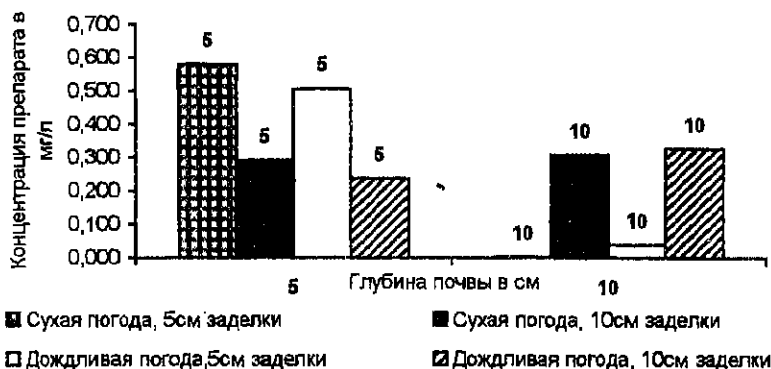


Рис.3. Содержание базудина в почвенном растворе на 21 сутки после внесения в чернозем в дозе 3 кг/га

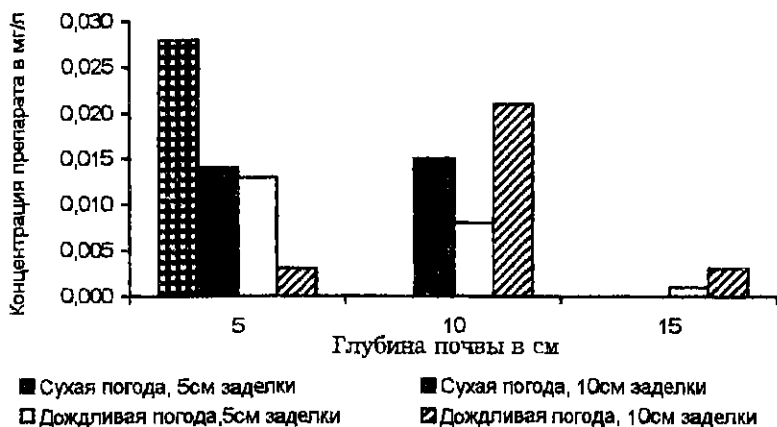


Рис.4. Содержание базудина в почвенном растворе на 122 сутки после внесения в чернозем в дозе 3 кг/га

Новожилов К.В., Петрова Т.М., Андреев Ю.Б. Транслокация и трансформация пестицидов в почве и растении. /Труды сов.-амер. Симпоз. прогнозирования пестицидов в окружающей среде. Л., 1984, с.94-99.

Новожилов К.В., Петрова Т.М., Семенова Н.Н. Имитационное моделирование процессов деградации и транслокации пестицидов в агроэкосистемах. /Сб. тр. Всерос. съезда по защите растений. С.-Петербург, 1997, с. 297-307.

Петрова Т.М., Семенова Н.Н. Моделирование разрушения пестицидов в почве. Тр. ВИЗР. Экологическое обоснование применения инсектоакарицидов. Л., 1991, с.37-45.

Терлеев В.В. Информационная поддержка модели влагопереноса в почве. Омский СХИ., 1988, 11 с. /Деп. в ВНИИТЭИагропром, № 700 ВС - 88.

Шуровенков О.Ю., Гулидова Л.А. Деградация синтетических пиретроидов в почве и растениях рапса в интенсивных технологиях его возделывания. /Тез. докл. симпоз. "Деградация пестицидов в условиях интенсивных технологий выращивания с.-х. культур". Рига, 1987, с.16.

Baes C.F., Sharp R.D. A proposal for estimation of soil leaching constants for use in assessment models. /J. Environmental Quality, 12(1), 1983, p.17-28.

Boesten J.H.T.I., van der Linden A.M.A. Modelling the influence of sorption and transformation of pesticide leaching and persistence. /J. Environ. Qual., 20, 1991, p.425-435.

Briggs G.C. Theoretical and experimental relationship between soil adsorption octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. /J. Agric. Food Chem., 29, 1981, p.1050-1059.

Carsel R.F., Mulkey L.A., Lorber M.H., Dean J.D. & Lowise P.P. User's manual for the pesticide root zone model: Release 1. U.S. Environmental Protection Agency, EPA-600/3-84-109, 1984.

Finizio A., Vighi M., Sandroni D. Determination of N - octanol/water partition coefficient (K_{OW}) of pesticide critical review and comparison of methods. /Chemosphere, 34, 1, 1997, p.131-161.

Karickhoff S.W., Brown D.S., Scott T.A. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. /Water Res., 13, 1979, p.241-248.

Juri W.A., Focht D.D., Farmer W.J. Evaluation of pesticide groundwater pollution potential from standard indices of soil - chemical adsorption and biodegradation. /J. of Environmental Quality, 16, 4, 1987, p.422-428.

Rawls W.J., Brakensiek D.L., Saxton K.E. Estimation of soil water properties. /Transactions ASAE paper No 81-2510, 1982, p.1316-1320.

The pesticide manual, 9 edit. Ch. S. Worthing, publ. by Brit. Crop Prot. Council, 1995.

Wagenet R.J., Hutson J.L. LEACHM: a finite difference model for simulating water, salt and pesticide in the plant root zone. Continuum. 2 Version 2.0, New-York State Water Res. Inst., Cornell Univ., Ithaca, NY, 1989.

Zaslavsky B.G., Petrova T.M., Semenova N.N. Computer system for analysis of pesticide fate in soil. Biophysical and physical processes in agroecosystems. /Agrophysical Research Institute, 44, 1992, p.115-139.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕСТ-МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ИНСЕКТИЦИДОВ НА МЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ ВОДЫ И ИОНОВ У НАСЕКОМЫХ

О.В.Сундуков*, Р.Г.Парнова**

*Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

**Институт эволюционной физиологии и биохимии им.И.М.Сеченова

Ректум насекомых является органом, повторно возвращающим воду и электролиты из кишечного канала в полость тела. Вследствие этого он может служить удобным физиологическим препаратом для изучения влияния биологически активных веществ на проницаемость цитоплазматических мембран для воды и ионов. Как было показано, ионы натрия и калия вместе с водой могут активно реабсорбироваться из ректума в гемолимфу даже против стократного градиента их концентрации (Phillips, 1964), и этот транспорт осуществляется в столбчатых клетках, образующих в кутикулярной выстилке ректума своеобразные сосочки (Gupta, Berridge, 1966; Phillips, Dockrill, 1968). Считается, что гормональный контроль является основным регулятором функциональной активности ректума у наземных насекомых (Phillips et al., 1982). Репепторы, реагирующие на воздействие гормональных агентов, находятся на наружной, обращенной в полость тела, поверхности ректума. Поэтому при изучении действия биологически активных веществ на водно-электролитный транспорт использовался изолированный ректум американского таракана *Periplaneta americana* в естественном, невывернутом состоянии, помещенный в физиологический раствор, в который вносились исследуемые вещества. В методику, предложенную Фитингофом (Vietinghoff, 1966), нами были внесены усовершенствования, касающиеся способов количественной оценки проявления физиологического эффекта.

Ректум вырезался из самцов тараканов, которые 1-2 суток перед этим содержались без корма для освобождения кишечника от экскрементов. В опытах использовался физиологический раствор, состоящий из (ммоль): 154 NaCl, 2,7 KCl, 1,8 CaCl₂, 20 глюкозы, 5,5 Na-фосфатного буфера pH 6,7-6,9 (Tolman, Steele, 1980).

Задний конец изолированного и промытого физиологическим раствором ректума перевязывался хлопчатобумажной ниткой, а передний привязывался к введенному в него капилляру длиной 120 мм с внутренним диаметром 1 мм, который предварительно заполнялся физиологическим раствором и плотно закрывался полиэтиленовым колпачком, предотвращающим вытекание из него жидкости. Зажимами капилляр прикреплялся вертикально к измерительной шкале с

миллиметровыми делениями так, чтобы ректум был целиком погружен в физиологический раствор объемом 5 мл, находившийся в бюксе на плотике с отверстием. Плотик был опущен в емкость с водой, температура которой поддерживалась на уровне 20-21°C. Физиологический раствор в бюксе в течение всего эксперимента непрерывно аэрировался через опущенную в него тонкую трубочку с помощью миникомпрессора.

После прикрепления капилляра к измерительной шкале с него снимался колпачок и ректум заполнялся физиологическим раствором. Первые показания регистрировались через 5 минут, но эта величина в оценочные расчеты не принималась, поскольку сильно варьировала в зависимости от величины ректума у разных особей и уровня прикрепления его к капилляру. От этой величины отсчитывались последующие показания, которые регистрировались через каждые 5 минут. Ректум заполнялся тем же самым физиологическим раствором, что находился снаружи его, в бюксе, и постепенно уменьшающийся объем выхода жидкости из ректума в течение 45 минут составлял в норме 18.2 ± 3.1 мкл (табл.2). Такую динамику выхода жидкости из ректума можно было получить только на здоровых, активных особях с достаточным запасом АТФ в клетках для осуществления трансмембранного транспорта воды и ионов против возрастающего градиента концентраций. В тех случаях, когда в ректум вместе с капилляром вводился разбавленный водой физиологический раствор по сравнению с тем, что находился снаружи, то объемы и скорость выхода жидкости из ректума возрастали в зависимости от степени разбавления находившегося в полости ректума раствора. Это свидетельствовало о том, что основным лимитирующим фактором выхода жидкости через стенку ректума являлось не гидростатическое давление столбика раствора, а градиент ионной концентрации жидкости внутри и снаружи ректума. При использовании изотонического физиологического раствора оптимальным для производимых замеров был период времени между 15 и 45 минутами. В этом интервале показания регистрируемых объемов выходящей из ректума жидкости у разных особей в норме были наиболее стабильными. Одним из оценочных вариантов функциональной активности ректума служил показатель соотношения объемов жидкости, прошедших через стенку ректума за 5 минут до внесения в наружный физиологический раствор тестируемого вещества и за 5 минут после внесения (табл.1). Вещества вносились на 15-й минуте от начала эксперимента.

Другим показателем был объем вышедшей из ректума жидкости за 15 минут от начала действия тестируемого вещества по сравнению с контролем (табл.1). Полученные результаты с использованием нейромедиаторов и нейропептидов, представленные в таблице 1, показывают, что данная методика позволяет количественно оце-

нить эффект влияния биологически активных веществ на функциональную активность ректума.

Таблица 1. Действие нейромедиаторов и регуляторных пептидов на систему транспорта воды через стенку изолированного ректума американского таракана (мкл, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=10$, $p<0.05$)

Тестируемые вещества	Концентрация (моль)	Соотношение объемов жидкости, прошедшей в течение 5 минут через стенку ректума ($\sqrt{V_{15-20}}/\sqrt{V_{10-15}}$)		Объем жидкости (мкл), прошедшей через стенку ректума в интервале между 15-30 минутами
Контроль	-	0.66 ± 0.03		3.95 ± 0.2
Дофамин	10 ⁻⁴	0.97 ± 0.12		5.35 ± 0.7
Норадреналин	10 ⁻⁴	1.8 ± 0.2		5.68 ± 0.7
Серотонин	10 ⁻⁴	-0.95 ± 0.13		-2.08 ± 0.5
ЦАМФ	10 ⁻⁴	0.7 ± 0.06		5.5 ± 0.9
Нейропептид MI*	10 ⁻¹⁰	0.36 ± 0.1		2.56 ± 0.4
Нейропептид MII**	10 ⁻¹⁰	-0.83 ± 0.1		0.56 ± 0.5

*Нейропептид MI (периплаветин I) p Glu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Asn-Trp-NH₂.

**Нейропептид MII (периплаветин II) p Glu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂.

Поочередное воздействие на ректум соединений с известным фармакологическим эффектом и вновь исследуемых позволяет выяснить механизмы молекулярного действия последних. Так, действие серотонина на ректум определенно связано с вмешательством в функцию кальциевых каналов, поскольку при отсутствии в физиологическом растворе катионов кальция характерный эффект серотонина не проявляется (табл.2).

Таблица 2. Действие серотонина на транспорт воды через стенку изолированного ректума американского таракана (мкл, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=7$, $p<0.05$)

Время от начала эксперимента (мин.)	Физиологический раствор (контроль)	Концентрация серотонина			Действие серотонина 10 ⁻⁴ М в физ. р-ре без Ca ²⁺
		10 ⁻⁴ М	10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁸ М	
5	8.6 ± 1.5	10.5 ± 2.0	9.3 ± 1.5	12.7 ± 1.1	14.6 ± 2.1
10	3.3 ± 0.4	4.1 ± 1.0	5.0 ± 1.6	3.7 ± 0.7	2.4 ± 0.5
15	2.1 ± 0.4	**2.4 ± 0.7	**2.2 ± 0.5	**2.0 ± 0.6	**1.3 ± 0.4
20	1.4 ± 0.2	-8.6 ± 2.5	-7.8 ± 2.2	-2.7 ± 1.8	2.0 ± 0.4
25	0.9 ± 0.2	1.6 ± 0.5	2.2 ± 0.3	-1.5 ± 1.2	0.9 ± 0.06
30	0.7 ± 0.1	2.0 ± 0.7	1.4 ± 0.7	-0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.2
35	0.6 ± 0.1	2.1 ± 0.7	1.1 ± 0.6	0.9 ± 0.8	0.6 ± 0.1
40	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.6	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.06
45	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.4	0.3 ± 0.1

**Время внесения в физиологический раствор серотонина.

Действие серотонина также не проявляется, если в физиологический раствор предварительно внесены перфеназин - антагонист кальмодулина, являющегося, предположительно, "рецептором" катионов кальция в клетке, или сензит - блокатор кальциевых каналов. Аналогичным образом эффект серотонина снимается после кратковременного воздействия на мембраны эпителиальных клеток ректума инсектицидами различных химических групп: фосфорорганической - ДДФФ (0,0-диметил-0-2,2-дихлорвинилфосфат), хлорорганической - линдан (гамма-изомер гексахлорциклогексана) и пиретроидной - децис (S-альфа-циано-м-феноксбензил-3-2,2-дибромвинил-2,2-диметил-циклопропан-карбоксилат) (табл.3).

Известно, что инсектициды острого токсического действия (быстро убивающие насекомых), встраиваясь в углеводородную область липидного бислоя мембран клеток, в места, занимаемые в жирнокислотных цепях фосфолипидов холестерином (Голубев,1993), дезорганизуют тем самым их транспортные функции. Результаты данного эксперимента позволяют предположить, что использованные инсектициды блокируют каналы кальция, который является одним из важнейших компонентов регуляторных систем организма животных. Он обеспечивает стабильность работы натриевых и калиевых насосов, контролирует химическую и электрическую возбудимость электрогенных мембран, стимулирует различные секреторные и биосинтетические процессы эндокринных клеток, окислительное фосфорилирование, каталитическую активность многих ферментов, синтез ДНК, мышечные сокращения и прочее. Нарушение инсектицидами функций кальциевых каналов в организме насекомых можно считать поэтому одним из критических нарушений в патогенезе инсектицидного отравления.

Таблица 3. Влияние серотонина 10^{-4} М на транспорт воды через стенку изолированного ректума американского таракана после воздействия фармакологических тест-агентов и инсектицидов (мкл, $\bar{x} \pm s_x$, n=7, p<0.05)

Время от начала эксперимента (мин.)	Действие серотонина 10^{-4} М в контроле	Перфеназин 10^{-4} М	Сензит 10^{-4} М	ДДФФ 10^{-4} М	Линдан 10^{-4} М	Децис 10^{-4} М
5	10.0 ± 0.8	7.4 ± 1.1	7.0 ± 1.1	14.0 ± 2.0	14.0 ± 1.8	10.8 ± 1.6
10	3.6 ± 0.6	3.5 ± 0.7	4.0 ± 0.9	4.8 ± 1.4	4.8 ± 0.9	4.8 ± 0.8
15	1.9 ± 0.4	*2.6 ± 0.5	*2.6 ± 0.5	*2.4 ± 0.7	*2.2 ± 0.3	*2.2 ± 0.3
20	0.8 ± 0.1	-0.2 ± 0.7	0 ± 0.3	1.8 ± 0.6	-1.8 ± 1.2	-0.5 ± 0.7
25	0.6 ± 0.1	0 ± 0.2	0 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.2 ± 0.7	1.7 ± 0.6
30	**0.6 ± 0.06	**0.1 ± 0.1	**0.8 ± 0.5	**1.2 ± 0.2	**0.3 ± 0.2	**1.2 ± 0.1
35	-3.2 ± 0.5	0.4 ± 0.2	-0.3 ± 0.06	1.7 ± 0.6	0.1 ± 0.2	0.5 ± 0.2
40	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.8	0.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2
45	0.8 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.3	1.5 ± 0.4	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1

*Время внесения в физиологический раствор токсиканта.

**Время внесения в физиологический раствор серотонина.

Таким образом, физиологический модельный препарат изолированного ректума может быть использован для решения многих вопросов, касающихся регуляции водно-солевого гомеостаза в организме насекомых.

Литература

Голубев В.Н. Механизмы взаимодействия пестицидов с липидным бислоем клеточных мембран. /Успехи химии, 62, 7, 1993, с.726-734.

Gupta B.L., Berridge M.J. A coat of repeating subunits on the cytoplasmic surface of the plasma membrane in the rectal papillae of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Meig.), studied in situ by electron microscopy. /J. Cell. Biol., 29, 1966, p.376-382.

Phillips J.E. Rectal absorption in the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forskal. /J. Exptl. Biol., 41, 1964, p.15-67.

Phillips J.E. Hormonal control of renal functions in insects. /Fed. Proc., 41, 8, 1982, p.2348-2354.

Phillips J.E., Dockrill A.A. Molecular sieving of hydrophilic molecules by the rectal intima of the desert locust (*Schistocerca gregaria*). /J. Exptl. Biol., 48, 1968, p.521-532.

Tolman J.H., Steele J.E. The effect of the corpora cardiaca - corpora allata system on oxygen composition in the cocroach rectum: the role of Na⁺ and K⁺. /J. Compar. Physiol., 138B, 4, 1980, p.347-355.

Vietinghoff U. Untersuchungen uber die Funktion der Rektaldrusen der Stabheuschrecke *Carausius morosus* Br. /Zool. Anz (Suppl.), 29, 1966, s.157-162.

**МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЯ ФУНГИЦИДОВ
И ХИМИЧЕСКИХ АКТИВАТОРОВ БОЛЕЗНЕУСТОЙЧИВОСТИ
РАСТЕНИЙ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
ПРОТИВ МУЧНИСТОЙ РОСЫ ТОМАТОВ,
ВЫЗЫВАЕМОЙ *ERYSIPHE ORONTII***

Т.Б.Дорофеева

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

На томатах закрытого грунта сравнительно недавно обнаружена патогенность гриба *Erysiphe orontii* - возбудителя мучнистой росы (Fletcher et al., 1988). В настоящее время "Государственный каталог пестицидов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации" (1997) содержит только один фунгицид для использования против мучнистой росы томатов в закрытом грунте - байлетон, 25% с.п., появившийся в 70-х гг. Фактически этот препарат был рекомендован против мучнистой росы, вызываемой другим патогеном - *Leveillula taurica*. Байлетон, по нашим данным, проявляет высокую активность и против нового возбудителя заболевания. Ассортимент средств защиты необходимо расширять, так как устойчивых сортов или гибридов томатов к данному заболеванию пока не обнаружено, а к байлетону может быстро развиться резистентность.

Основным руководством для испытаний фунгицидов и химически активных соединений на биологическую активность в настоящее время являются "Методические указания по государственным испытаниям..." (1985). К сожалению, в них приведены материалы, касающиеся только одного заболевания томатов закрытого грунта - бурой пятнистости. Нет конкретных рекомендаций и в других пособиях.

Предлагаемая методика испытания фунгицидов и химических активаторов болезнеустойчивости растений разрабатывалась нами в течение ряда лет и была апробирована в производственных условиях.

Распространение и биологические особенности гриба

До недавнего времени единственным возбудителем мучнистой росы на томатах считали гриб *Leveillula taurica* (Папоян, Маркосян, 1972; Гелюта, 1989). Новый возбудитель мучнистой росы на томатах (*Erysiphe orontii*) был впервые отмечен в Европе в 1987 г. (Fletcher et al., 1988). В 1988 г. это заболевание зарегистрировано в западной части бывшего СССР (Heluta et al., 1994). Затем случай появления нового вида мучнистой росы на томатах был зафиксирован в теплицах Канады в 1993 г. (Belanger, 1994), несколько позже - в США (Arredondo, 1996; Karasevicz, Zitter, 1996; Smith et al., 1997).

В настоящее время большинство авторов идентифицируют этот новый для томатов патоген как анаморфную стадию гриба *Erysiphe orontii* (*Golovinomyces orontii*). Конидиальное спороношение возбудителя (телеоморфа не образуется) представлено типом *Oidium* s.str (=Euoidium), то есть конидии формируются в цепочках. Форма ко-

нидий варьирует от удлинненно-вазовидной до почти цилиндрической. Четко выраженных фиброзинговых телец нет. Размеры конидий сохраняются в пределах (30-48)×(12-24) мкм. Это позволяет отличить его от гриба *Leveillula taurica*, верхняя конидия у которого обладает ланцетовидной формой и суживается к вершине, а вторичные конидии эллипсоидальные, с общими размерами (52-71)×(14-18) мкм (Белюсова, Абдулаев, 1989).

Следует отметить, что *Er. orontii* способен поражать растения томатов на протяжении всего вегетационного периода, начиная с семидольных листьев. После появления первых признаков заболевания пораженность быстро нарастает, принимая при благоприятных условиях эпифитотийный характер.

Изолят мучнистой росы, полученный нами в ноябре 1990 г. с растений томатов (с-з "Ленинградский" П/О "Лето"), поражал дурман (*Datura stramonium*, Solanaceae), петунию (*Petunia hybrida*, Solanaceae) и ограниченно огурец (*Cucumis sativus*, Cucurbitaceae). По литературным данным можно судить о дальнейшем расширении круга потенциальных хозяев данного патогена, экономическую значимость из которых имеют представители родов Cucurbitaceae и Solanaceae (Whipps et al., 1998). Способ сохранения и перезимовки *Er. orontii* вне вегетирующего растения, по литературным данным, пока не найден. Для поддержания культуры после изоляции из естественной популяции необходимо иметь питомник, обновляемый раз в три-четыре недели.

Метод искусственного заражения растений томатов

Как показали наши исследования, заражение томатов *Er. orontii* можно осуществлять методом создания инфекционного фона (т.е. совместного содержания экспериментальных и ранее инфицированных растений) или методом встряхивания над здоровыми растениями зараженных листьев. Однако, наиболее удобен метод опрыскивания растений суспензией конидий, позволяющий регулировать и заранее задавать уровень инфекционной нагрузки.

Для приготовления суспензии конидий в колбу с дистиллированной водой помещают пораженные листья и сильно встряхивают в течение минуты. В качестве поверхностно активного вещества для облегчения смачивания листовой поверхности добавлялся твин 21 (0.01%). Плотность инокулюма определяют с помощью камеры Горяева. Оптимальная инфекционная нагрузка для заражения растений томатов в фазе 4-5 настоящих листьев составляет 20-40 тыс. конидий/мл при расходе жидкости 100 мл на 200 растений.

Обработки препаратами проводят из расчета 10 мл на 20 растений. Контрольные растения следует обрабатывать водой. Вариант должен содержать не менее 20 растений. Максимальная продолжительность опыта 50-60 дней. Работу по испытанию фунгицидов и биологически активных веществ против мучнистой росы томатов (*Er. orontii*) можно проводить на любых районированных сортах и гибридах, так как устойчивых к этому заболеванию форм до сих пор не обнаружено. В наших исследованиях объектом служили растения томатов сорта Волгоградский 5/95, гибридов Гренада, Ласточка, Ви-

Методы учета

В случае изучения профилактического действия препаратов их применение может быть проведено до заражения или во время инкубационного периода, завершающегося обычно через 7-10 дней. При изучении лечебного действия препаратов обработки ими проводят по первым признакам заболевания. В качестве стандарта используют препарат байлетон (25% с.п.). Оценку пораженности листьев делают на 10, 14, 21 день по ярусам, используя обычную шкалу для пятнистостей в баллах:

- 0 - поражение отсутствует,
- 0.1 - единичные пятна,
- 1 - пятна занимают 25% площади листа,
- 2 - пятна занимают 50% площади листа,
- 3 - пятна занимают 75% площади листа,
- 4 - весь лист покрыт налетом мучнистой росы.

Развитие болезни в % вычисляют по формуле:

$$R = 100 \sum(a \times v) / NK,$$

где R - развитие болезни (%), a - число растений с одинаковыми признаками поражения, v - соответствующий этому признаку балл поражения, N - число растений в учете, K - высший балл учетной шкалы.

При необходимости подсчитывают биологическую эффективность (БЭ, %) применяемых препаратов по показателю развития болезни или степени пораженности:

$$БЭ = 100(P_k - P_o) / P_k \%,$$

где P_k - развитие или степень поражения растений в контроле (%), P_o - развитие или степень поражения на опытном участке (%). В производственных опытах следует дополнительно подсчитывать распространение болезни по формуле:

$$P = 100n / N,$$

где P - распространенность болезни (%), n - количество больных растений, N - общее число растений в пробах.

При испытании новых препаратов, предназначенных для обработки вегетирующих растений, необходимо определять уровень их фитотоксичности. Фитотоксичность устанавливается по наличию ожогов при обработке растворами препаратов различных концентраций. Она определяется по следующей шкале:

- 0 - физиологические изменения отсутствуют,
- 1 - незначительные изменения формы листовой пластины или появление отдельных (1-2) на лист темных/обесцвеченных пятен,
- 2 - заметные изменения формы листовой пластины или незначительные округлые, резко очерченные пятна/просветления, занимающие до 5% поверхности листа,

3 - сильные изменения формы листовой пластинки или пятна, занимающие до 25% поверхности листа,

4 - наблюдаются ожоги, занимающие до 50% поверхности листа; повреждается стебель, растение теряет тургор и увядает.

Результаты проведенной оценки подвергают дисперсионному анализу.

Заклучение

По предлагаемой методике нами было испытано на биологическую активность против мучнистой росы томатов около 10 фунгицидов (байлетон, бактофит, фитолавин, фундазол, импакт, фадеморф, текто и др.) и 40 различных химических активаторов болезнеустойчивости (производные полиакриловых кислот, фумаровых, хитозана и др.). Лучшие из имеющихся препаратов были апробированы в производственных условиях. За время проведения работ методика доказала свою адекватность. Результаты, полученные в производственных опытах, полностью совпадают с данными лабораторных исследований по изучению биологической активности фунгицидов и активаторов болезнеустойчивости против мучнистой росы томатов, вызываемой грибом *Erysiphe orontii*.

Литература

Белоусова В.В., Абдулаев С.Г. Мучнистая роса пасленовых культур в Азербайджане. Бюлл. ВИЗР, 74, 1989, с.30-35.

Государственный каталог пестицидов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. М. 1997.

Гелута В.П. Флора грибов Украины. Мучнисторосные грибы. Киев, 1989, 256 с.

Методические указания по государственным испытаниям фунгицидов, антибиотиков и протравителей семян сельскохозяйственных культур. 1985, 130 с.

Папоян Ф.А. Маркосян А.А. Настоящая мучнистая роса в Армении. /Изв. с.-х. наук АрмССР, 10, 1972, с.97-101.

Arredondo C. et al. First report of powdery mildew of tomato in California caused by an Oidium. /Plant Disease, 80, 1996, p.1303.

Belanger R.R. Occurrence of powdery mildew (*Erysiphe* sp.) on greenhouse tomatoes in Canada. /Plant Disease, 78, 1994, p.640.

Fletcher J., Smewin B., Cook R. Tomato powdery mildew. /Plant Pathol., 37, 1988, p.594-598.

Geluta V.P., Ivanova G.P., Dorofeyva T.B. et al. Tomato powdery mildew in the West Part of SNG. Укр. бот. журнал, 51, 4, 1994, с.58-63.

Karasevicz D.M., Zitter T.A. Powderi mildew on greenhouse tomato plants in New York. /Plant Disease, 80, 1996, p.709.

Smith V., Douglas S., LaMondia Ja. First report of powdery mildew of tomato caused by an *Erysiphe* sp. in Connecticut. /Plant Disease, 81, 1997, p.229.

Whipps J.M., Budge S.P., Felton J.S. Characteristics and host range of tomato powdery mildew. /Plant Pathology, 47, 1998, p.36-48.

ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕРОПРИЯТИЙ ПО ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ПЕРЕХОДНОГО ПЕРИОДА

Н.Р.Гончаров, О.П.Каширский

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Переход к рыночным отношениям в АПК России по прогнозам специалистов будет осуществляться в течение 15-20 лет. В это время уже не функционирует плановая административно-командная система, но еще в полной мере не действует и рыночная. Поэтому переходный период нуждается в разработке собственной теоретической базы, особенно в области ценовой, кредитной, налоговой и инвестиционной политики. Требуются корректировки методических подходов определения экономической эффективности мероприятий по защите растений, действовавших в период планового ведения сельскохозяйственного производства с фиксированно стабильными ценами, тарифами и услугами. При этом возникает основная проблема - проблема сопоставимости затрат, вкладываемых в защиту растений в разные временные сроки, между собой и по отношению к периоду получения эффекта - сохраненного урожая.

Для преодоления этой проблемы в условиях переходного периода с неустановившимися экономическими отношениями авторы считают целесообразным все текущие производственные затраты оценивать ко времени реализации продукции, используя при этом (для корректировки текущих цен) данные о проценте инфляции или процентной ставки местного банка (при расчетах на перспективу).

Данная методика разработана на основе "Методики по экономической оценке мероприятий по защите растений" (М.,1985) и является логическим развитием ее принципов и положений применительно к условиям переходного периода.

Общие положения

Экономическую оценку новых мероприятий следует проводить в сравнении с эталоном или базовым (то есть заменяемым) вариантом. За базовый вариант, как правило, берут лучшее по показателям однотипное мероприятие, широко применяемое в регионе.

Для экономической оценки мероприятий организуют производственные опыты в хозяйствах, отражающих типичные природно-экономические и социальные условия зоны, где намечается использовать результаты экспериментов.

Для опытов выбирают участки, однородные по рельефу, почвенному типу, сортовому и возрастному составу растений, уровню плотности вредных организмов, агротехническим и другим условиям.

Опыт включает, как правило, 2-3 варианта (новый вариант, базовый вариант, чистый контроль) и имеет обычно 3 повторности.

Размер, форма делянок и их размещение должны удовлетворять требованиям механизированного выполнения работ по возделыванию сельскохозяйственных культур и уборке урожая. Размер делянок - не менее 1 га для опытных вариантов и 0.5 га - для контрольных. Для плодово-ягодных культур в качестве контроля можно оставлять до 10 деревьев или кустов. Целесообразна удлиненная форма делянок. При малом количестве вариантов их размещают последовательно в пределах каждой повторности.

При оценке мероприятий по защите растений в условиях отдельного эксперимента полученные результаты отражают строго обусловленную ситуацию: тип почвы на конкретном поле, сорт культуры, фитосанитарную обстановку, погодные условия и т.д. При изменении условий (например, численности вредных организмов) меняется и уровень экономических показателей. Поэтому для оценки ситуации в масштабах определенного региона необходимо накопление и обобщение частных экспериментальных данных при разных типичных условиях.

Определение исходных показателей экономической оценки мероприятий

Учет урожая. Очень важно уборку урожая со всех опытных делянок проводить одновременно. Отступления могут быть, когда различия в сроках уборки предусмотрены программой эксперимента. В зависимости от особенностей сельскохозяйственных культур уборку урожая проводят с использованием средств механизации сплошным способом на выделенных учетных полосах или вручную на учетных площадках. При отсутствии защитных полос между вариантами учетные полосы и площадки выделяют в центральной части делянки на расстоянии не менее 10 м от ее границ при использовании штанговых опрыскивателей и не менее 30 м - при использовании вентиляторной аппаратуры.

При уборке урожая учитывают все повреждения и поражения растений различными вредителями и болезнями. Так, например, полевые и сломанные растения зерновых культур, поврежденные гессенской мухой, при механизированной уборке остаются в поле, в результате чего имеют место дополнительные потери зерна. Урожай картофеля, пораженного фитофторой, учитывают дважды: в момент уборки и при хранении, при полном проявлении заболевания.

При учете урожая определяют не только количество, но и качество продукции: содержание клейковины в зерне, стандартность клубней картофеля, содержание сахара в винограде, корнеплодах сахарной свеклы, номерность и выход волокна прядильных культур,

сортность плодов и т.д. Показатели урожайности, а также качества продукции тщательно анализируются и подвергаются статистической обработке.

Оценка урожая. Стоимость продукции в каждом из вариантов складывается соответственно из стоимости основной и побочной продукции. Основную продукцию оценивают по ценам реализации с учетом ее качественных показателей. Побочную продукцию переводят в основную посредством установленных коэффициентов.

В целом стоимость продукции в новом (Впн) и базовом (Впб) вариантах в расчете на единицу объема работ можно рассчитать по формулам:

$$Впн = \sum В_{ni} \times Ц_i \quad \text{и} \quad Впб = \sum В_{bi} \times Ц_i,$$

где: $В_{ni}$, $В_{bi}$ - продукция i -качества в натуральном выражении в расчете на единицу объема работ в новом и базовом вариантах;

$Ц_i$ - реализационная цена продукции i -качества, руб.

Определение производственных затрат, приведенных ко времени реализации продукции. Приведенные производственные затраты в новом и базовом вариантах рассчитываются на единицу объема работы (удельные приведенные производственные затраты).

При расчете приведенных затрат по элементам необходимо:

- оценку материальных затрат производить на основе цен приобретения сырья и материалов с учетом % инфляции (процентной кредитной ставки банка) с момента их приобретения до основных сроков реализации продукции,

- расходы по заработной плате учитывать, исходя из количества работников, норм выработки и тарифных ставок (включая все виды основной и дополнительной оплаты, а также начисления на заработную плату) с учетом % инфляции (% кредитной ставки банка) с учетом сроков начисления и выдачи заработной платы и реализации основной части продукции,

- амортизационные отчисления (исходя из установленных нормативов) и затраты на текущий ремонт и технические уходы (по факту) определять с поправкой на инфляцию или процент банковской ставки с учетом сроков произведенных затрат и реализации продукции,

- общепроизводственные и общехозяйственные расходы устанавливать, исходя из сложившегося в хозяйстве процентного отношения этого вида затрат к сумме прямой оплаты труда, амортизационных отчислений и расходов на текущий ремонт.

Приведение элементов производственных затрат осуществляется обычно по периодам работ в пределах месяца с последующим их суммированием.

Для определения приведенных затрат при постановке полевых опытов пользуются данными бухгалтерского учета и официальными данными о проценте инфляции (процентной кредитной ставки банка,

где имеется счет конкретного хозяйства).

Для расчета приведенных производственных затрат в базовом варианте рекомендуется следующая формула:

$$С_{бп} = С_{хп} - С_{зхп} + С_{бзп},$$

где: $С_{бп}$ - приведенные производственные затраты в базовом варианте, руб/га;

$С_{хп}$ - приведенные производственные затраты в хозяйстве, приходящиеся на единицу уборочной площади по изучаемой культуре, руб/га;

$С_{зхп}$ - средние приведенные производственные затраты в хозяйстве на защиту изучаемой культуры против конкретного вредного организма, руб/га;

$С_{бзп}$ - приведенные затраты на защиту культуры против изучаемого вредного организма в базовом варианте, руб/га.

Аналогичным образом рассчитывают приведенные производственные затраты в новом варианте:

$$С_{нп} = С_{хп} - С_{зхп} + С_{знп},$$

где: $С_{нп}$ - приведенные производственные затраты в новом варианте, руб/га;

$С_{знп}$ - приведенные затраты на защиту культуры против изучаемого вредного организма в новом варианте, руб/га.

Определение приведенных затрат, связанных с защитой растений. Затраты на проведение мероприятий по защите растений являются частью общих производственных затрат на выращивание культуры, уборку, доработку урожая и его складирование.

В состав затрат, связанных с защитой растений, входят стоимость пестицидов или биопрепаратов; заработная плата; амортизация основных средств (машин и механизмов, специальных производственных сооружений); расходы на текущий ремонт и техническое обслуживание машин и производственных сооружений; расходы на топливо и смазочные материалы; затраты на уборку, транспортировку и доработку сохраненного урожая.

Расходы на пестициды или другие препараты с учетом торговой наценки, доставки и стоимости тары (если она не возвращается поставщикам-производителям) рассчитываются по формуле:

$$С_{п} = Ц_{п}[(1 + Н_{т}/100) + Ц_{т}/q] m,$$

где: $С_{п}$ - стоимость препарата на единицу работы, руб.; $Ц_{п}$ - цена препарата, руб/кг;

$Н_{т}$ - торговая наценка с доставкой, %;

$Ц_{т}$ - цена тарной единицы, руб.;

q - количество препарата, содержащееся в тарной единице, кг;
m - расход препарата, кг/га.

Все исходные показатели можно установить в хозяйстве на основе актов об использовании минеральных, органических и бактериальных удобрений, средств защиты растений, а также из счета-фактуры поставщика.

Расходы на пестициды, приведенные к месяцу реализации продукции, определяют по формуле:

$$C_{\text{шп}} = C_{\text{п}} + C_{\text{п}} \times X/100,$$

где: $C_{\text{шп}}$ - стоимость препарата на единицу работы, приведенная к месяцу реализации продукции, руб.;

X - здесь и далее процент кредитной ставки банка за период, обусловленный сроком производственных издержек и сроком реализации готовой продукции.

Расходы на заработную плату складываются из заработной платы трактористам-машинистам на опрыскивании посевов и подвозке растворов (воды), заработной платы рабочим, занятым приготовлением раствора: погрузкой, разгрузкой и подвозкой пестицидов и др. Заработная плата на единицу обрабатываемой площади для каждого вида работ определяется по формуле:

$$З = Э\tau(1 + Д_0)/w,$$

где: З - сумма заработной платы для данного вида работ, руб./га;

Эт - тарифная ставка за норму выработки, руб.;

Д₀ - коэффициент для учета резерва на отпуска и налоговых проплат юридическими лицами;

w - сменная норма выработки, га.

Исходными данными являются фактические сведения хозяйств, которые отражаются в штатном расписании, а также материалах по установленным нормам выработки и расценкам за выполняемые работы и т.д.

Расходы на заработную плату, приведенные к срокам реализации продукции, определяют по формуле:

$$З_{\text{п}} = З + З \times X/100,$$

где: $З_{\text{п}}$ - сумма заработной платы для данного вида работ, приведенная к срокам реализации продукции.

Издержки на амортизацию определяют по всем видам основных средств, действующих в технологическом процессе защиты растений: тракторам, сельскохозяйственным машинам, пунктам приготовления рабочих растворов, заправочным агрегатам и т.д.

Амортизационные отчисления по каждому виду основных

средств можно рассчитать по формуле:

$$A = B \times a/100 \times Tг \times \text{вч},$$

где: А - амортизационные отчисления по каждому виду основных средств, руб./га;

В - балансовая стоимость машины, руб.; а - норма амортизационных отчислений от балансовой стоимости машины, %;

Tг - годовая загрузка машины, час;

вч - производительность машинотракторного агрегата за час сменного времени, га.

Балансовая стоимость основных средств берется по данным бухгалтерского учета хозяйств. Нормы амортизационных отчислений представлены в официальном издании. Годовая загрузка тракторов и машин определяется по данным годовых отчетов хозяйств.

Издержки на амортизацию, приведенные к срокам реализации продукции, определяют по формуле:

$$A_{п} = A + A \times X/100,$$

где: $A_{п}$ - амортизационные отчисления по каждому виду основных средств, приведенные к срокам реализации продукции, руб.

Затраты на текущий ремонт и техническое обслуживание машин определяют аналогично расчетам затрат на амортизацию. Нормы отчислений от балансовой стоимости на текущий ремонт и техническое обслуживание берутся по данным хозяйств или справочной литературы. Затраты на текущий ремонт и техническое обслуживание машин приводятся к срокам реализации продукции аналогично затратам на амортизацию.

Стоимость топлива и смазочных материалов. Расход топлива в зависимости от вида и условий выполнения работ берется по нормам, установленным в хозяйстве. Стоимость топлива определяется, исходя из рыночных цен приобретения, и корректируется, соответственно, исходя из сроков реализации продукции.

Накладные расходы - это расходы предприятия по управлению и обслуживанию производства. В отличие от прямых, накладные расходы не могут быть отнесены непосредственно на себестоимость одного или нескольких видов продукции, а косвенно распределяются на все виды продукции или работ, по которым составляется калькуляция затрат. Поэтому накладные расходы называются также косвенными. В сельскохозяйственных предприятиях накладные расходы делятся на общепроизводственные и общехозяйственные.

В расчете себестоимости работ по защите растений накладные расходы исчисляют пропорционально распределению их в хозяйстве по отраслям растениеводства. Процент накладных расходов относят к сумме прямой оплаты труда, амортизационных отчислений и рас-

ходов на текущий ремонт на работах по защите растений, исчисленных с учетом кредитной ставки банка и времени реализации продукции.

Затраты на уборку и доработку сохраненного урожая берутся по фактическим данным хозяйства с поправкой на издержки инфляции.

Общая сумма приведенных ко времени реализации продукции затрат на защиту растений в базовом и новом вариантах Сзбп и Сзнп устанавливается в результате суммирования приведенных расходов на единицу обрабатываемой площади по перечисленным выше элементам.

Расчет показателей экономической эффективности

Экономический анализ выполняется с использованием комплекса показателей, основным из которых является годовой экономический эффект. Дополнительными показателями служат повышение урожайности, рентабельности производства продукции и снижение ее себестоимости. Важным является показатель снижения трудовых затрат. Однако на современном этапе экономического развития сельского хозяйства России он практически не учитывается и произвести необходимые расчеты будет очень трудно.

Годовой экономический эффект, полученный в конкретных условиях и приведенный к месяцу реализации продукции, рассчитывается по формуле:

$$\text{Эгхп} = [(В_{пн} - С_{пн}) - (В_{пб} - С_{пб})],$$

где: Эгхп - годовой экономический эффект, приведенный ко времени реализации продукции, руб/га.

Уровень повышения урожайности (дополнительная продукция) устанавливается путем сопоставления урожайностей в новом и базовом вариантах опыта по формуле:

$$\Delta B = B_n - B_b,$$

снижение себестоимости продукции, приведенной к месяцу ее реализации, рассчитывается по формуле:

$$С_{п} (\%) = (С_{пбп} - С_{пнп}) / С_{пбп} \times 100,$$

где С_{пбп} и С_{пнп} - себестоимости единицы продукции в базовом и новом вариантах (в рублях), приведенные к месяцу реализации.

Изменение уровня рентабельности производства продукции исчисляется по формуле:

$$U_{рн} (\%) = [(В_{пн} - С_{пн}) / С_{пн} - В_{пб} \times С_{пб} / С_{пб}] / 100.$$

ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕРОПРИЯТИЙ ПО ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Н.Р.Гончаров, О.П.Каширский

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Переход к рыночным отношениям в АПК России сопровождается рядом отрицательных процессов, в том числе диспаритетом цен на продукцию сельского хозяйства и промышленности, обострением топливно-энергетической проблемы. В этих условиях наряду с традиционными расчетами экономической эффективности защитных мероприятий важное значение приобретает оценка защиты растений с точки зрения ее энергетической эффективности.

Энергетический анализ в защите растений позволяет с помощью энергетических эквивалентов определить эффективность защитных мероприятий во взаимосвязи с уровнем использования энергетических ресурсов. Он выполняется одновременно с экономическим анализом, дополняет его и дает возможность получить более объективные результаты, поскольку стоимостные оценки в отличие от энергетических во многом зависят от конъюнктурных цен на средства производства и продукцию.

В настоящей работе излагаются общие принципы и расчетные формулы оценки региональной энергетической эффективности защитных мероприятий. Такая оценка необходима, прежде всего, для энергетического обоснования потребности АПК в средствах защиты растений для разработки и внедрения ресурсосберегающих технологий взамен энергоемких.

Оценку энергетической эффективности мероприятий по защите растений в масштабе региона (страны, природно-экономического района, республики, края, области и т.д.) проводят на основе региональных нормативов, важнейшими из которых являются:

- нормативы энергетической ценности сохраненного урожая от применения средств защиты растений,
- нормативы энергетических затрат на производство пестицидов,
- нормативы энергетических затрат на энергоносители, используемые при защитных обработках наземными машинами,
- нормативы энергетических затрат труда на защитные обработки,
- нормативы энергетических затрат на технические средства для внесения средств защиты растений.

ВИЗР разрабатывает данные виды энергетических нормативов по природно-экономическим регионам России.

Методические основы разработки нормативов изложены в "Методических указаниях по разработке нормативов для планирования потребности сельского хозяйства в химических средствах защиты растений" (1985). При оценке нормативов по защите растений в

энергетических эквивалентах используются методические подходы по определению энергетической ценности дополнительного урожая и энергетических затрат на защитные мероприятия, изложенные в "Методике оценки энергетической эффективности применения средств защиты растений" (1991) и во "Временной методике энергетического анализа в сельском хозяйстве" (1991), а также справочные материалы, прилагаемые к этим методикам.

Например, нормативы энергетической ценности сохраняемого за счет защиты растений урожая определяются на основе нормативов сохраняемого урожая в ц/га с использованием коэффициентов, выражающих калорийную ценность сельскохозяйственной продукции.

Нормативы энергетических затрат на пестициды разрабатываются на основе нормативов расхода пестицидов в кг/га однократно обработанной площади и удельных показателей расхода энергии на синтез действующего вещества и изготовление его препаративной формы.

Нормативы энергетических затрат на энергоносители разрабатываются на основе данного вида нормативов в кг/га и коэффициентов теплотворной способности единицы массы топлива.

Нормативы энергетических затрат на технические средства, задействованные в проведении защитных мероприятий, включают в себя энергетические затраты на добычу руд, выплавку металла, на изготовление материала, а также на производство машин, участвующих в работах по защите растений, с учетом затрат на текущий ремонт и техническое обслуживание.

Оценка энергетической эффективности мероприятий по защите растений в масштабе региона проводится в дополнение к определению региональной экономической эффективности. Принципы расчетов в обоих случаях тождественны.

Основным показателем энергетической эффективности является общий годовой энергетический эффект, исчисляемый по формуле:

$$Эгэ = (Эгнэ - Эгбэ) Q,$$

где: Эгнэ - годовой энергетический эффект в новом варианте, мдж/га;

Эгбэ - годовой энергетический эффект в базовом варианте, мдж/га;

Q - объем (физическая площадь) применения нового мероприятия, га.

Годовой энергетический эффект в новом и базовом вариантах рассчитывают по формулам:

$$Эгнэ = Нунэ - (Нпнэ + Нэнэ + Нчнэ + Нтнэ) \times 0.15 \times h_n,$$

$$Эгбэ = Нубэ - (Нпбэ + Нэбэ + Нубэ + Нтбэ) \times 0.15 \times h_b,$$

где: Эгнэ и Эгбэ - годовой энергетический эффект соответственно в

новом и базовом вариантах, мдж/га;

Нунэ и Нубэ - нормативы энергетической ценности сохраненного урожая в новом и базовом вариантах, мдж/га;

Нпнэ и Нпбэ - нормативы энергетических затрат на пестициды, мдж/га;

Нэнэ и Нэбэ - нормативы энергетических затрат на энергоносители, мдж/га;

Нчнэ и Нчбэ - нормативы энергетических затрат труда, мдж/га;

Нтнэ и Нтбэ - нормативы энергетических затрат на технические средства, мдж/га;

0.15 - обобщенный коэффициент энергетических затрат на накладные расходы;

hn и hb - кратность обработок в новом и базовом вариантах.

Рассчитывают и другие показатели энергетической эффективности использования средств защиты растений, а именно:

- изменение энергетической ценности валовых сборов сельскохозяйственных культур:

$$\Delta V_{уэ} = (N_{унэ} - N_{убэ}) Q,$$

- изменение энергетических затрат на пестициды:

$$\Delta Пэ = (N_{пбэ} \times h_b - N_{пнэ} \times h_n) Q,$$

- изменение энергетических затрат на энергоносители:

$$\Delta Ээ = (N_{эбэ} \times h_b - N_{энэ} \times h_n) Q,$$

- изменение энергетических затрат труда:

$$\Delta Чэ = (N_{чбэ} \times h_b - N_{чнэ} \times h_n) Q,$$

- изменение энергетических затрат на технические средства:

$$\Delta Тэ = (N_{тбэ} \times h_b - N_{тнэ} \times h_n) Q,$$

- изменение совокупных энергетических затрат на защитные мероприятия:

$$\Delta Зэ = \Delta Пэ + \Delta Ээ + \Delta Чэ + \Delta Тэ.$$

Литература

Методические указания по разработке нормативов для планирования потребности сельского хозяйства в химических средствах защиты растений. М., 1985, 60 с.

Методика оценки энергетической эффективности применения средств защиты растений. М., 1991, 50 с.

Временная методика энергетического анализа в сельском хозяйстве. Минск, 1991, 126 с.

Гончаров Н.Р., Кольчев Н.Г., Черкасов В.А. Оценка мероприятий в масштабе региона. Организация защиты растений. М., 1985, 176 с.

Методика экономической оценки эффективности мероприятий по защите растений в регионе. Л., 1983, 10 с.

НОВЫЙ МЕТОД АЗУР-ЭОЗИНОВОЙ ОКРАСКИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЭНТОМОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (МСЭЛ-МЕТОД)

Е.В.Логинов, В.А.Павлюшин

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Микроскопия в энтомопатологической диагностике имеет часто решающее значение. Необходимость серийной обработки больших объемов патологического материала требует подбора соответствующих целям анализа экспресс-методов. В развитие наших исследований в этом направлении (Логинов, Павлюшин, 1990; Логинов и др., 1997) предлагается ускоренная методика окраски препаратом-мазков и отпечатков азур-эозином с широким спектром возможностей применения.

Со времени описания в 1889 г. Ч.И.Хендинским метода окраски гематологических препаратов метиленовым синим - эозином - и введения нового метода Д.Л.Романовским в 1890-1891 гг. (Лабораторные методы, 1957) предложена целая серия - свыше 30 наиболее употребляемых методов модификаций (Златогоров, 1916; Вайль, 1947; Лабораторные методы, 1953, 1957; Ромейс, 1954; Лилли, 1969; Справочник, 1975). При множестве красящих составов, комбинаций процедур окраски, фиксации (их более 15), корректировки pH и забуферивания воды (более 10 способов) вариабельность использования метода с метиленовым синим - азуром-эозином - весьма велика. Большинство модификаций этого метода для ускоренного массового анализа микропрепаративного материала неудобно. Методики либо длительны - от 15 до 60 минут и более на одну партию препаратов, либо очень капризны - результаты окраски изменчивы из-за чувствительности красящих агентов к pH используемой воды. Наилучшим фиксатором признается чистый метанол (Лабораторные методы, 1953, 1957; Ромейс, 1954; Лилли, 1969;) - сильный токсикант. Фиксация должна быть проведена на свежем материале, иначе последующая качественная окраска удается с трудом, что отмечено как для мазков крови человека (Ромейс, 1954), так и для мазков гемолимфы насекомых. Существующие инвертированные методики, когда обработка эозином предшествует воздействию метиленовым синим (Вайль, 1947), редко себя оправдывают из-за нестабильности результатов и блеклости оттенков.

Наиболее быстрыми из многочисленных вариаций оказались методы Мансона и Мошковского (Лабораторные методы, 1953, 1957). Достоинство их заключается в получении полихромного эффекта в цитоструктурах при незначительной длительности процедуры окрашивания. Применение танина для дифференцировки усиливает

полихромный эффект (Логоинов, Павлюшин, 1990). Однако водные растворы таннина не могут длительно храниться. Все метиленблау-азур-эозиновые методы прогрессивного окрашивания можно разделить на однорастворные и двухрастворные. Особо выделяется группа методик с дифференцировкой. Многоступенчатые методы лишь на первый взгляд кажутся сложными, хотя при четкой работе они часто дают существенный выигрыш во времени.

Предлагаемая нами методика двухрастворной азур-эозиновой окраски с возможной дифференцировкой может быть применена для окраски мазков нормальной и патологической гемолимфы насекомых, отпечатков из трупов, где отлично выявляются структурированные клетки насекомого и клетки энтомопатогенов (бактерий, грибов и др.). Последнее особенно ценно для исследования сопряженных бактериально-грибных инфекций. Метод дает также отличный эффект при анализе прорастания конидий дейтеромицетов на стеклах, а также при подсчете ядер в бластоспорах и гифальных грибных клетках.

Предлагаемая методика построена на трех прототипах, ранее в энтомопатологии не используемых:

- фиксации препаратов по Е.Л.Яхонтовой (1959) без применения метанола, но с отличным результатом в отношении гемоцитов различных насекомых, бактерий и грибных клеток,
- применении раствора полихромного метиленового синего по Мансону-Мошковскому (Лабораторные методы, 1953, 1957),
- найденной нами удачной комбинации полихромного метиленового синего с эозином по аналогии со смесью Шиллинга (Златогоров, 1916; Лабораторные методы, 1957).

В отличие от последней предлагаемой нами красящий раствор стабилен на протяжении не менее 1.5 лет. При этом красящая способность его со временем возрастает, что связано с оптимальным соотношением ингредиентов.

Рабочие растворы и метод изготовления препаратов

Фиксатор и фиксация. Состав и приготовление фиксатора полностью соответствуют прописи Е.Л.Яхонтовой (1959). На кипящий водяной бане в 1.5 мл дистиллированной воды растворяют 1.5 г трехзамещенного цитрата натрия. Затем доливают раствор этанолом до 100 мл и тщательно размешивают. Второй раствор готовят аналогично, но вместо цитрата вносят 1.5 г двузамещенного оксалата натрия. Через сутки равные объемы совершенно прозрачных декантатов соединяют. Для смешивания с растворами цитрата и оксалата натрия лучше использовать абсолютный этанол. В этом случае фиксатор работает дольше, при обработке сухих мазков он годен к употреблению не менее 3 лет (максимальный срок наблюдения).

Фиксированные в течение 1-5 минут мазки или отпечатки, не промывая, высушивают на воздухе. Окрашивать можно и не совсем просушенные мазки.

Первый окрашивающий раствор - основной. Рекомендуем его готовить путем растворения 2.5 (Мошковский) или 5 г (Мансон) десятиводного тетрабората натрия в 30 мл горячей дистиллированной или водопроводной воды. Метиленовый синий (1 г по Мошковскому или 2 г по Мансону) растворяют в 60 мл горячей воды. Затем соответствующие растворы красителя и буры смешивают, доводят объем до 100 мл и прогревают на кипящей водяной бане 2 часа, после чего фильтруют и доводят водой до 100 мл. Основной раствор может быть заготовлен впрок, он стабилен, хранится неограниченно долго (лучше в холодильнике). При кипячении в растворе метиленового синего с бурой появляются метилен-азур (азур-1) и метиленовый фиолетовый. Этот процесс, по нашим наблюдениям, видимо, продолжается и при хранении.

Рабочий раствор (МСЭЛ-1). Основной раствор полихромного метиленового синего разводят водой в соотношении 1:10 (по Мошковскому) или 1:20 (по Мансону), что по колориметрической оценке (при просмотре на белом фоне раствора, взятого в объеме двух капель, распределенных на предметном стекле пятном с диаметром 1.5 см) должно соответствовать полям 24, 25, 26 таблицы 36 цветовых порогов (Рабкин, 1956). Окраска препаратов производится в течение 2-5 минут в рабочем растворе в широкогорлой банке, где он может храниться неограниченно долго. Затем мазки быстро ополаскивают проточной водой и тотчас же помещают во второй окрашивающий раствор. Можно и не ополаскивать мазок, но тогда при погружении его во второй раствор на стекле могут возникнуть азуровые осадки, которые, однако, удаляются при последующей дифференцировке. Как мы установили, важным условием нормального окрашивания является $pH=8-9$, который создается добавлением на каждые 100 мл рабочего раствора МСЭЛ-1 0.5-1 г трехзамещенного фосфата натрия. Щелочи и карбонаты калия и натрия для этого непригодны, так как осаждают красители.

Второй окрашивающий раствор (МСЭЛ-2) - рабочий. За сутки до применения смешивают в соотношении 5:3 МСЭЛ-1 (без фосфата натрия) и 0.2% водный раствор эозина БА. При этом выпадает незначительный мелкодисперсный осадок, а раствор приобретает розово-фиолетовый оттенок с эозиновой зеленой флюоресценцией, которая в процессе хранения исчезает. Цветовые показатели раствора соответствуют полям 19, 20, 21 таблицы 37 цветовых порогов (Рабкин, 1956). Качество приготовления раствора МСЭЛ-2 контролируется простейшей хроматографией на бумаге (Лабораторные методы, 1957). При нанесении капли раствора на фильтровальную бумагу появляется пятно с сиреневым центром, мелким осадком и периферическим розовым эозиновым кольцом. Мазок находится во втором

растворе не менее 5 минут. При этом в цитоструктурах возникает азур-эозиновый эффект Романовского. После ванны МСЭЛ-2 препарат ополаскивают водой (длительно не промывать!), полностью высушивают на воздухе или промокают фильтровальной бумагой. Затем мгновенно (не более 2 секунд) подвергают воздействию дифференцирующего агента, после чего отжимают фильтровальной бумагой, высушивают и сразу микрофотографируют, либо сначала заключают в среду.

Дифференцирующие агенты. Ими обрабатывают только высохшие мазки и отпечатки. Дифференцирующие агенты могут использоваться многократно: этанол 90-96°, водный 50% (по объему) раствор ацетона, этанол 96° в смеси с абсолютным ацетоном (1:1). Различные элементы мазка дифференцируются с разной скоростью. Первыми дифференцировке подвергаются гемодциты, затем - бактериальные клетки, позднее - грибные.

Истощение второго раствора может наступить при погружении в него непромытых после МСЭЛ-1 препаратов. Тогда необходимо на каждые 100 мл МСЭЛ-2 добавить 3-5 капель 0.2% водного раствора эозина БА и провести хроматографический текст.

Индикация качества окраски. После ванны МСЭЛ-1 влажный мазок становится сиренево-синим, сухой приобретает фиолетовый металлический отлив. После ванны МСЭЛ-2 влажный мазок имеет розовый оттенок, сухой - розово-фиолетовый с зеленым металлическим отливом. После дифференцировки мазок становится розово-лиловым. При высыхании - бледно-сиреневым, редко с розовым оттенком.

Хранение препаратов. Окраска длительно не выцветает как в незаклученных мазках, так и помещенных в пихтовый бальзам, а также в полистерол с пластификатором (Логинов, Павлюшин, 1990). В качестве растворителя рекомендуем применять о-ксилол. Препараты необходимо сохранять в темноте.

Особые требования к материалу и свойства окраски. 1) Мазки должны быть свежеприготовленными и свежefиксированными. Допускается окраска хранившихся фиксированных мазков. 2) Окраска не удастся после фиксации в парах формальдегида и формалинсо-держажих фиксажах, в том числе в жидкости Буэна. 3) Окраска удается после фиксации препаратов в классическом растворе Карнуа (Ромейс, 1954), но лишь после прополаскивания фиксированного высушенного мазка в 0.5%-ном водном растворе аммиака. 4) Качество окраски ядер азуром и эффект Романовского снижается как от длительного промывания в воде, так и при передержке в дифференцирующей среде, особенно спиртсодержащей. 5) Передержанные в дифференцирующем растворе мазки могут быть вновь качественно окрашены.

Апробация метода. Окраска с положительным результатом

применена на обширном препаративном материале нормальной и патологической гемолимфы гусениц *Ephestia kuhniella*, *Galleria mellonella*, *Barathra brassicae*, *Laspeyresia pomonella*, *L.nigricana*, *Pieris brassicae*, *Yponomeuta padellus*, *Operophtera brumata*, личинок и имаго *Leptinotarsa decemlineata*, *Coccinella septempuncta*, *Grylotalpa grylotalpa*, *Myzus persicae*. По предлагаемой методике успешно окрашиваются бластоспоры, филаменты и мицелий энтомопатогенных дейтеромицетов *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, вегетативные клетки и спорангии *Bacillus thuringiensis* как из пораженных насекомых, так и развивающихся *in vitro*. Наконец, данная методика позволяет выявлять ядра в дрожжевых клетках и эффективно окрашивать мазки теплокровных и человека.

Результаты окраски. Цветовая гамма окрашенных цитоструктур соответствует насыщенным тонам качественной окраски по Романовскому-Гимза (Ромейс, 1954).

1. В тонких мазках гемолимфы ядра гемоцитов от пурпурно-красных до красно-фиолетовых (поля 23-27 таблицы 26 (Рабкин, 1956)), имеют четкие границы. Хроматин красный, глыбистый, кариоплазма розовая, светлая (поля 15-18, табл. 26). Полиморфизм ядер в ряду от пролейкоцитов к эноцитоидам четко выражен и соответствует описанным в литературе типам (Jones, 1962). В цитоплазме выявляются как кристаллоидные (у эноцитов и эноцитойдов), так и азурофильные включения. Для гемоцитов гусениц *E.kuhniella* цитоплазма пролейкоцитов темно-синяя (поля 28-30, табл. 34), плазмочитов - насыщенно-синяя (поля 23-26, табл. 34), сферулоцитов - голубая (поля 19-22, табл. 34) или сиреневая с бесцветными шаровидными включениями. У адипогемоцитов цитоплазма темно-синяя с крупными розовыми глыбистыми включениями, у сферулоцитов и редких эозинофилов гранулы от фиолетовых до пурпурных (поля 24-27, табл. 26).

2. Цитоплазма бактериальных клеток, бластоспор, филаментов грибов структурирована. В спорангиях *B.thuringiensis* выделяются бесцветные овалы эндоспор и бледно-голубые или розовые кристаллы δ -эндотоксина, пурпурные мезосомы и нуклеоиды. Бластоспоры *M.anisoplia* и *B.bassiana* темно-синие (молодые) или голубые (зрелые), ядра грибов пурпурные или красные (поля 24-28, табл. 26).

3. В изготовленных с применением муцина слюны для фиксации к предметному стеклу (Пешков, 1966; Логинов, Павлюшин, 1990) препаратах прорастающих *in vitro* конидий дейтеромицетов отчетливо выявляются многоядерность, сегментированность гиф, морфологические различия покоящихся и прорастающих конидий. Обращает на себя внимание относительная несложность выявления ядер у дейтеромицетов, а также в мазках дрожжей, что обычно сопряжено с более длительными процедурами.

Общий эффект от применения описанного ускоренного метода

состоит в существенном сокращении времени на обработку 1 партии мазков и отпечатков с 20-60 до 10 минут при получении яркой насыщенной многоцветной гаммы в цитоструктурах микропрепаратов. С другой стороны, упрощается состав рабочих растворов, они становятся транспортабельными, нетоксичными и длительно сохраняемыми, что дает существенный экономический выигрыш в расходовании дорогостоящих соединений. Кроме того, для приготовления красящих растворов и промывания совсем не обязательна дистиллированная вода. Может быть использована даже некипяченая водопроводная, так как общий эффект окраски от рН воды в диапазоне 6.5-7.8 не зависит. В экспедиционных условиях для работы целесообразно иметь легкие пластиковые герметически закрывающиеся банки с рабочими растворами.

Литература

Вайль С.С. Руководство по патолого-гистологической технике. Л., 1947, 264 с.

Златогоров С.И. Учение о микроорганизмах. Основные методы бактериологических и биологических исследований. /Петроград, Практическая медицина, 2, 1916, 402 с.

Лабораторные методы исследования в ветеринарии, т.1. М., 1953, 588 с.

Лабораторные методы исследования патогенных простейших. М., 1957, 264 с.

Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., 1969, 646 с.

Логинов Е.В., Павлюшин В.А. К микроскопическим методам исследований инфекционных процессов насекомых. /Микроорганизмы в защите растений. Иркутск, 1990, с.109-115.

Логинов Е.В., Соколова Ю.Я., Громов А.Я. Ускоренный метод окраски полутонких срезов тканей, залитых в аралдит. /Цитология, 29, 11, 1987, с.1314-1317.

Пешков М.А. Сравнительная цитология синезеленых водорослей, бактерий и актиномицетов. М., 1966, 246 с.

Рабкин Е.В. Атлас цветов. М., 1956, 53 с.

Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1954, 719 с.

Справочник по клиническим лабораторным методам исследований. М., 1975, 384 с.

Яхонтова Е.Л. Фиксация мазков крови. /Лабораторное дело, 4, 1959, с.32-33.

Jones J.C. Current concepts concerning insect hemocytes. /Amer. Zool., 2, 1962, p.209-246.

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

И.И.Косенков, В.Б.Митрофанов

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Введение

Скорость обработки экспериментальных данных и выполнения исследований в целом тесно связаны с проблемой рационального планирования эксперимента. Затруднения в интерпретации и статистической обработке экспериментальных данных также могут быть значительно уменьшены при соответствующем планировании опытов.

Математические методы планирования эксперимента - область, широко разрабатываемая в последние годы. Однако и здесь нередко упускают из виду простые, но эффективные принципы планирования опытов, а относительно сложные и более трудоемкие приемы используют там, где они в сущности дают лишь иллюзорную выгоду. В связи с этим мы предлагаем один из простейших, но эффективных методов планирования биологического эксперимента. Данная разработка вызвана также и тем, что традиционные и быстрые способы планирования эксперимента в защите растений представлены в настоящее время немногочисленными публикациями, как правило практически недоступными для исследователей.

Описание метода и иллюстрация на примере решения задачи

Использование методов и приемов планирования эксперимента дают возможность при минимальном объеме экспериментальной работы избрать рациональный путь поиска оптимума для решения поставленной экспериментальной задачи. В самом общем виде такое планирование включает определение необходимого и достаточного числа повторностей в вариантах, выбор сочетания и схемы изменения контролируемых условий экспериментов с последующей математической обработкой полученных результатов, что дает возможность составить представление о роли факторов, направлении движения к оптимуму, а также сформулировать критерии его достижения.

Существуют, кроме того, экспрессные методы проведения поиска, в которых не только число экспериментов, но и все расчеты доведены до минимума. В нашем случае речь пойдет о симплекс-планировании эксперимента.

Планирование экстремальных экспериментов, как правило, проводится в два этапа:

- отыскание экстремальной-максимальной "почти стационарной области" изменения основных факторов, влияющих на процесс,
- математическое описание процесса в данной области.

На первом этапе вместо крутого восхождения к оптимуму можно пользоваться симплекс-планированием, предложенным Спедлей, Хекстом и Химсуорзом в 1962 г. Начиная восхождение, планируют исходную серию опытов так, чтобы точки, соответствующие условиям опыта, образовали правильный симплекс в многомерном факторном пространстве. Правильным симплексом является множество $(n+1)$ равноудаленных друг от друга точек в n -мерном пространстве. В одномерном пространстве ($n=1$) симплексом является отрезок прямой. При $n=2$ симплекс представляет собой равносторонний треугольник, при $n=3$ - тетраэдр и т.д. После проведения первой серии опытов выявляется точка (опыт), давшая наихудшие результаты. Эта точка заменяется новой, представляющей собой ее "зеркальное отражение" относительно противоположной грани симплекса (гранью называют совокупность n точек n -мерного симплекса). Эта точка вместе с оставшимися снова образует правильный симплекс, центр тяжести которого смещен по сравнению с исходным в направлении худшая точка - центр тяжести остальных точек. Это направление не является наиболее крутым восхождением, однако оно обращено в сторону повышения качества процесса. После реализации опыта в дополнительной точке снова выявляется наихудшая точка, которая также заменяется ее "зеркальным отражением", и т.д. Эта процедура пошагового восхождения повторяется до тех пор, пока не достигается "почти стационарная область". Идея движения к области оптимума иллюстрируется рисунком 1.

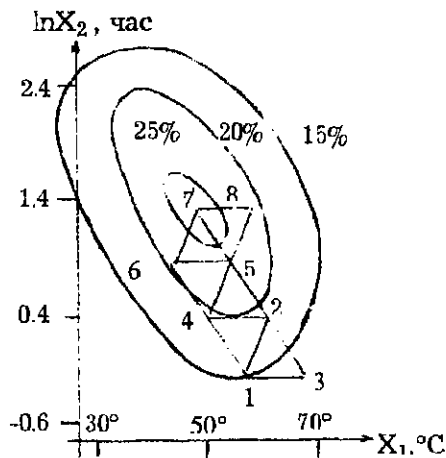


Рис.1. Движение к "почти стационарной области" температуры X_1 и времени экспозиции X_2 для получения максимальной экстенсивности проявления латентной вирусной инфекции гранулеза у гусениц яблонной плодожорки 1 возраста.

Переходим к построению матрицы А исходного симплекса:

$$A = \sqrt{2(n+1)/n} \begin{pmatrix} l_1 & l_2 & \dots & l_{n-1} & l_n \\ -P_1 & l_2 & \dots & l_{n-1} & l_n \\ 0 & -P_2 & \dots & l_{n-1} & l_n \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & \dots & l_{n-1} & l_n \\ 0 & 0 & \dots & -P_{n-1} & l_n \\ 0 & 0 & \dots & 0 & -P_n \end{pmatrix} \quad (1)$$

где $P_i = \sqrt{(i/2(i+1))}$, (2)
 $l_i = \sqrt{(1/2i(i+1))}$, $i = 1, 2, \dots, n$. (3)

Строки матрицы А образуют правильный симплекс в n-мерном пространстве с центром в начале координат и с радиусом сферы, описанной вокруг симплекса, равным единице. Следовательно, (n+1) строки матрицы А можно понимать, как план исходной серии опытов, составляющих n-мерный симплекс. В столбцах указаны соответствующие значения варьируемых факторов. Для практического использования этой матрицы подсчитывают числовые значения ее элементов для разных n. Ниже приводятся матрицы исходных симплексов для $n = 2 + 7$ (табл.1).

Таблица 1. Матрицы исходных симплексов для разных n

n=2			n=3			
Вершины симплекса	X ₁	X ₂	Вершины симплекса	X ₁	X ₂	X ₃
1	0.8660	0.5000	1	0.8165	0.4714	0.3333
2	-0.8660	0.5000	2	-0.8165	0.4714	0.3333
3	0	-1.0000	3	0	-0.9428	0.3333
			4	0	0	-1.0000
n=4						
Вершины симплекса	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		
1	0.7906	0.4564	0.3228	0.2500		
2	-0.7906	0.4564	0.3228	0.2500		
3	0	-0.9129	0.3228	0.2500		
4	0	0	-0.9683	0.2500		
5	0	0	0	-1.0000		
n=5						
Вершины симплекса	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
1	0.7746	0.4472	0.3162	0.2449	0.2000	
2	-0.7746	0.4472	0.3162	0.2449	0.2000	
3	0	-0.8945	0.3162	0.2449	0.2000	
4	0	0	-0.9487	0.2449	0.2000	
5	0	0	0	-0.9798	0.2000	
6	0	0	0	0	-1.0000	

n=6

Вершины симплекса	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	0.7638	0.4410	0.3118	0.2415	0.1972	0.1667
2	-0.7638	0.4410	0.3118	0.2415	0.1972	0.1667
3	0	-0.8819	0.3118	0.2415	0.1972	0.1667
4	0	0	-0.9354	0.2415	0.1972	0.1667
5	0	0	0	-0.9660	0.1972	0.1667
6	0	0	0	0	-0.9860	0.1667
7	0	0	0	0	0	-1.0000

n=7

Вершины симплекса	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	0.7559	0.4365	0.3086	0.2390	0.1952	0.1650	0.1429
2	-0.7559	0.4365	0.3086	0.2390	0.1952	0.1650	0.1429
3	0	-0.8729	0.3086	0.2390	0.1952	0.1650	0.1429
4	0	0	-0.9258	0.2390	0.1952	0.1650	0.1429
5	0	0	0	-0.9562	0.1952	0.1650	0.1429
6	0	0	0	0	-0.9759	0.1650	0.1429
7	0	0	0	0	0	-0.9898	0.1429
8	0	0	0	0	0	0	-1.0000

Движение к "почти стационарной области"
(области максимума)

После реализации исходного симплекса выявляется наихудшая точка. Последняя "отражается" относительно центра противоположной грани симплекса и, таким образом, находится точка для проведения нового опыта. Положение "отраженной" точки находится по формулам, которые представлены ниже при иллюстрации на конкретном примере.

Шаговое восхождение методом отражения заканчивается тогда, когда исследователь достигает "почти стационарной" области. Для оценки подобной ситуации проверяют значимость квадратных членов в уравнении поверхности, которые характеризуют степень ее кривизны. В центре симплекса ставят несколько опытов и находят среднее арифметическое \bar{Y}_0 - несмещенную оценку свободного члена в уравнении регрессии $\beta_0(\bar{Y}_0 \rightarrow \beta_0)$. Далее находят среднее арифметическое для точек симплекса без центральных точек Y_c , которые являются совместной оценкой для β_0 и $\sum \beta_i$. Если разность $(\bar{Y}_c - \bar{Y}_0)$ мала по сравнению с ошибкой эксперимента, то кривизна поверхности отклика мала, в противном случае необходимо перейти к планированию второго порядка. При шаговом восхождении возможны следующие случаи:

1) симплекс вращается вокруг некоторой точки, отвечающей наибольшему значению Y ; после проведения $(n+1)$ опытов необхо-

димо прекратить движение и повторить точку (опыт), вокруг которого происходило вращение; если значение в этой точке подтверждается, то достигнута область оптимума;

2) в результате отражения некоторой наихудшей точки симплекса A_m получена новая точка, которая в симплексе A_{m+1} также оказывается наихудшей; в этом случае следует вернуться к симплексу A_m и двигаться из него, отбросив точку, показавшую второе наименьшее значение Y , которое одновременно является и вторым наименьшим значением для симплекса A_{m+1} .

Необходимо отметить, что ориентация исходного симплекса в пространстве практически не сказывается на эффективности движения. Нет надобности и в численной оценке параметра оптимизации Y - достаточно иметь возможность ранжировать положение. Благоприятные особенности метода симплекс-планирования позволяют использовать его в целях полной автоматизации управления сложными технологическими процессами.

Пример применения метода симплекс-планирования

Проводились исследования динамики активации латентной вирусной инфекции гранулеза (*Baculovirus, Granulosis gr. B*) в различных фазах развития яблонной плодовой гнили *Laspeyresia pomonella* (яйца, гусеницы 1-5 возраста) в лабораторной популяции насекомого.

Из комплекса факторов для дальнейшего исследования были отобраны: X_1 - температура воздуха в °C и X_2 - время воздействия, экспозиция в условных единицах (логарифмическая шкала, ln часов). Оптимизацию в лабораторных экспериментах проводили методом симплекс-планирования. Параметром оптимизации для данного примера является процент яиц яблонной плодовой гнили, в которых обнаружено развитие вируса гранулеза в результате воздействия измененных температур.

Для каждого фактора, исследуемого в данном эксперименте, выбирается условный основной (нулевой) уровень O_{λ} , то есть такие значения переменных, в области которых начинается изучение процесса с целью получить направление движения от выбранного условного нулевого уровня к оптимальным значениям факторов. Если выбор условного нулевого уровня не диктуется какими-либо теоретическими или практическими соображениями, то он может быть совершенно произвольным.

Для тех же факторов выбираются единицы варьирования λ_1 . Это те величины, на которые в данном опыте меняют условия по каждому фактору в сторону увеличения или уменьшения его от нулевого уровня. Выбор единиц варьирования (интервалов варьирования) - один из самых ответственных вопросов. Если для каких-либо факторов выбраны слишком малые интервалы варьирования, то можно

получить эффект данных факторов незначимым не потому, что они не оказывают существенного влияния на процесс, а потому, что этот эффект будет ниже ошибки метода измерения выхода. С другой стороны, при выборе слишком больших единиц варьирования возникает опасность, что исследуемая поверхность отклика не может быть описана уравнением, не содержащим членов второй, третьей и выше степеней. В каждом конкретном случае единицы варьирования задаются, исходя из опыта и интуиции исследователя.

В таблице 2 указаны основной уровень и интервалы варьирования переменных.

Таблица 2. Выбор основного уровня и интервала варьирования переменных X_1 и X_2

Признаки	X_1	X_2
Основной уровень, O_{X_i}	35	0.5
Интервал варьирования, λ_i ($i = 1, 2$)	5	1

Произведем преобразование координат, приводящее "натуральные" переменные к "безразмерным":

$$X_1 = (X_1 - 35)/5; \quad X_2 = (X_2 - 0.5)/1.$$

Используя данные таблицы 1 для $n=2$, получим матрицу исходного симплекса в натуральных переменных. Номер вершины симплекса обозначается 2-й подстрочной цифрой у X_1 и X_2 . Для X_1 :

$$0.8660 = (X_{1-1} - 35)/5, \quad 4.33 = X_{1-1} - 35, \quad X_{1-1} = 39.33; \quad -0.8660 = (X_{1-2} - 35)/5, \quad X_{1-2} = 30.67;$$

$$0 = (X_{1-3} - 35)/5, \quad X_{1-3} = 35;$$

Для X_2 :

$$0.5 = (X_{2-1} - 0.5)/1, \quad X_{2-1} = 1; \quad X_{2-2} = 1; \quad -1 = (X_{2-3} - 0.5)/1, \quad X_{2-3} = 0.5.$$

Матрица планирования и результаты нескольких шагов движения приводятся в таблице 3.

Таблица 3. Матрица планирования эксперимента

№№ опытов	X_1	X_2	$Y, \%$
1	39.33	1.0	5.1
2	30.70	1.0	2.6
3	35.00	0.5	2.7
4	43.66	0.5	15.0
5	47.99	1.0	23.3
6	52.32	0.5	23.5
7	56.65	1.0	22.0
8	52.32	1.5	24.0
9	60.98	1.5	20.0
10	43.66	1.5	15.0

Таблица 4. Перечень худших точек в исследуемых симплексах

№№ сп.	Точки симплекса			Худшая точка	№№ сп.	Точки симплекса			Худшая точка
1	1	2	3	2	5	6	7	7	
2	1	3	4	3	6	5	7	8	
3	1	4	5	1	7	7	8	9	
4	4	5	6	4	8	5	8	10	

Первый симплекс - точки 1, 2, 3. Координаты первой точки: $t = 39^\circ\text{C}$, время экспозиции 2.72 часа. Процент активации вируса гранулеза (Y_1) будет равен 5.1. Координаты второй точки: $t = 30.7^\circ\text{C}$, время экспозиции 2.72 часа. Процент активации вируса (Y_2) равен 2.6. Координаты третьей точки: $t = 35^\circ\text{C}$, время экспозиции 1.6 часа. Процент активации вируса (Y_3) равен 2.7. Эти данные занесены в таблицу 3.

Худшая точка первого симплекса (1, 2, 3) - вторая. Для определения координаты точки следующего шага в поиске оптимума метод симплекс-планирования предусматривает простой прием, заключающийся в построении на грани предшествующего симплекса, которая противостоит точке наихудшего выхода, нового симплекса. В нем точка постановки нового эксперимента является зеркальным отражением точки минимального выхода (точка 4 симплекса 1, 4, 5 рис.2).

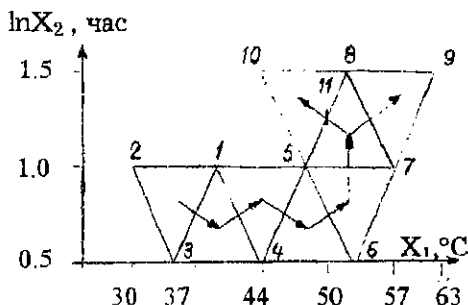


Рис.2. Движение к "почти стационарной области" температуры X_1 и экспозиции X_2 для получения максимальной интенсивности активации латентной вирусной инфекции гранулеза в яйцах яблонной плодовой жоржки

Для определения координаты точки 4 можно ограничиться графическим методом построения равносторонних треугольников, имеющих общую сторону. В более сложном случае или при желании можно воспользоваться аналитическими, расчетными приемами в соответствии с правилами векторного исчисления. Тогда координату точки 4 находят как удвоенную среднюю координат старого симплекса без точки наихудшего выхода, координаты которой вычитаются из нижеследующего значения:

$$\vec{V}_j = 2(\vec{V}_1 + \vec{V}_2 + \dots + \vec{V}_{j-1} + \vec{V}_j + \dots + \vec{V}_n) / n - \vec{V}_j.$$

В нашем случае

$$\vec{V}_4 = 2/2(\vec{V}_1 + \vec{V}_3) - \vec{V}_2,$$

где $\vec{V}_1, \vec{V}_2, \vec{V}_3$ - координаты соответствующих точек в векторной форме.

В числовых значениях координаты точки 4 (рис.2) определяются так: а) определяются координаты центра грани, образованной точками 1 и 3:

$$X_{1c} = (39.33 + 35)/2 = 37.165, \quad X_{2c} = (1 + 0.5)/2 = 0.75;$$

б) тогда координатами четвертой точки будут:

$$X_{1-4} = 2 \times 37.165 - 30.67 = 43.66 = 44^\circ\text{C},$$

$$X_{2-4} = 2 \times 0.75 - 1 = 0.5; \text{ antiln } 0.5 = 1.65 \text{ часа.}$$

Активация латентной вирусной инфекции в данных условиях составляет $Y_4 = 15\%$.

Первый шаг оказался удачным. Точка 4 во втором симплексе (1, 3, 4) оказалась лучшей, следовательно можно переходить к построению третьего симплекса. Поскольку во втором симплексе худшей по уровню активации вируса была точка 3 (табл.3), построение проводим на грани, образованной точками 1, 4, противоположной точке наилучшего выхода.

Координаты отраженной точки 5 находим аналогичным образом как и для точки 4:

а) определяем координаты центра грани, образованной точками 1 и 4:

$$X_{1c} = (39.33 - 43.66)/2 = 41.495,$$

$$X_{2c} = (1 + 0.5)/2 = 0.75;$$

б) тогда координаты точки 5 будут:

$$X_{1-5} = 2 \times 41.495 - 35 = 47.99 = 48^\circ\text{C},$$

$$X_{2-5} = 2 \times 0.75 - 0.5 = 1.0; \text{ antiln } 1.0 = 2.72 \text{ часа.}$$

При данных условиях активация вирусной инфекции гранулеза составила $Y_5 = 23.3\%$. Следовательно и данный шаг был удачен, можно переходить к построению нового симплекса.

Худшей точкой третьего симплекса (1, 4, 5) была точка 1. Координаты отраженной точки 6 находим аналогичным образом:

а) координаты центра грани, образованной точками 4 и 5:

$$X_{1c} = (47.99 + 43.60)/2 = 45.82,$$

$$X_{2c} = (1 + 0.5)/2 = 0.75;$$

б) координаты точки 6 будут:

$$X_{1-6} = 2 \times 45.82 - 39.33 = 52.32 = 52^\circ\text{C},$$

$$X_{2-6} = 2 \times 0.75 - 1 = 0.5; \text{ antiln } 0.5 = 1.65 \text{ часа.}$$

При данных условиях активация вирусной инфекции гранулеза составила $Y_6 = 23.5\%$. Следовательно и данный шаг был удачен, можно переходить к построению нового симплекса.

Худшей точкой четвертого симплекса (4, 5, 6) является четвертая. Координаты точки 7:

а) координаты центра грани:

$$X_{1c} = (47.99 + 52.32)/2 = 50.155,$$

$$X_{2c} = (1 + 0.5)/2 = 0.75;$$

б) координаты точки 7:

$$X_{1-7} = 2 \times 50.155 - 43.60 = 56.65 = 57^\circ\text{C},$$

$$X_{2-7} = 2 \times 0.75 - 0.5 = 1.0; \text{ antiln } 1.0 = 2.72 \text{ часа.}$$

При данных условиях активация вирусной инфекции гранулеза составила $Y_7 = 22\%$. Данный шаг был неудачен, в точках 5 и 6 пятого симплекса (5, 6, 7) проценты активации вируса практически одинаковы, имеет смысл построить еще один симплекс, зеркальный относительно точки 6, путем вращения вокруг грани 5, 7.

Координаты точки 8 в симплексе (5, 7, 8) будут следующими:

$$X_{1-8} = 52.32 - 52^\circ\text{C},$$

$$X_{2-8} = 4.5 \text{ часа.}$$

При данных условиях активация вирусной инфекции гранулеза составила $Y_8 = 24\%$. Таким образом, данный шаг оказался удачным.

Для того чтобы удостовериться в нахождении области максимума, сделаем еще два шага в сторону от последнего симплекса.

Координаты отраженной точки 9 находим аналогично предыдущим случаям:

а) определяем координаты центра грани, образованной точками 7 и 8:

$$X_{1c} = (56.65 + 52.32)/2 = 54.485,$$

$$X_{2c} = (1 + 1.5)/2 = 1.25;$$

б) тогда координаты девятой точки:

$$X_{1-9} = 2 \times 54.485 - 47.99 = 60.98^\circ\text{C},$$

$$X_{2-9} = 2 \times 1.25 - 1 = 1.5; \text{ antiln } 1.5 = 4.8 \text{ часа.}$$

Активация латентной вирусной инфекции гранулеза у яблонной плодовой гни при данных условиях эксперимента составляет $Y_9 = 20\%$. Данный шаг не был удачным. Возвращаемся к предыдущему симплексу (точки 5, 7 и 8).

Строим новый симплекс. Находим точку 10, являющуюся отражением точки 7. Координаты отраженной точки 10:

а) координаты центра грани, образованной точками 5 и 8:

$$X_{1c} = (47.99 + 52.32)/2 = 50.155,$$

$$X_{2c} = (1 + 1.5)/2 = 1.25;$$

б) тогда координаты точки 10 будут:

$$X_{1-10} = 2 \times 50.155 - 56.31 = 43.66 = 44^\circ\text{C},$$

$$X_{2-10} = 2 \times 1.25 - 1 = 1.5; \text{ antiln } 1.5 = 4.8 \text{ часа.}$$

При данных условиях активация латентной вирусной инфекции гранулеза у яблонной плодовой гни составила $Y_{10} = 15\%$. Следовательно и данный шаг был неудачным.

Становится ясным, что "почти стационарная область" находится между 5 и 8 точками шестого симплекса (5, 7, 8). Проводим дополнительный эксперимент в точке с координатами:

$$X_{1-9} = (47.99 + 52.32)/2 = 50.155 = 50^{\circ}\text{C},$$

$$X_{2-9} = (1.5 + 1)/2 = 1.25; \text{ antiln } 1.25 = 3.5 \text{ часа.}$$

При данных условиях активация вирусной инфекции гранулеза составила $Y_9 = 24.5\%$. Результаты опыта свидетельствуют о том, что "почти стационарная область" активации латентной вирусной инфекции гранулеза у яблонной плодовой гнили находится в непосредственной близости к данной точке, поскольку активация вируса здесь максимальна. Повторная проверка результата активации вируса при данных параметрах воздействия повышенной температуры позволяет остановиться на данном режиме, как оптимальном.

Заключение

Использование симплекс-планирования дает возможность существенно сократить количество экспериментов, проводимых при поиске оптимальных условий проведения биологических процессов. По сравнению с методикой полного факторного эксперимента, где добавление каждого нового фактора требует автоматического удвоения всего числа экспериментов, симплекс-планирование при правильно выбранном направлении поиска требует проведения только одного нового опыта, или еще одного, если направление выбрано неправильно. Результаты, получаемые методом симплекс-планирования, не зависят от формы поверхности отклика, поскольку из всех данных нас интересуют худшие результаты, и при отрицательных результатах экспериментатор возвращается на шаг назад и повторяет процедуру построения симплекса. Как было продемонстрировано, метод не требует проведения сложных расчетов и может применяться даже при изучении таких процессов, в которых функцию выхода нельзя измерить количественно, а можно только оценить полуколичественно или даже чисто качественно. При этом правила движения к оптимуму не теряют своей строгости.

Вместе с тем, использование метода симплекс-планирования не позволяет оценить роль отдельных факторов и, что особенно важно при исследовании сложных процессов, не позволяет получить информацию о взаимодействии факторов. К тому же экспрессность метода симплекс-планирования эксперимента проявляется в полной мере лишь в тех случаях, когда затраты времени на проведение самого эксперимента незначительны и существенное время у экспериментатора уходило бы на расчеты, как, например, в случае постановки полного факторного эксперимента. В тех случаях, когда эксперимент по своей природе является длительным (недели, месяцы), применение метода симплекс-планирования нерационально, поскольку получение точек (например, результаты изучения урожайности сельскохозяйственных культур, плодовитости насекомых и т.п.) может растянуться на неопределенно долгий срок, ибо построение нового симплекса невозможно, прежде чем не будет реализован

предыдущий. В микробиологических же исследованиях, где продолжительность отдельного эксперимента чаще всего исчисляется несколькими сутками, данный подход уместен и рационален. В случае длительных по времени опытов целесообразно использовать метод полного факторного эксперимента, позволяющего одновременно поставить большое число вариантов и в результате получить более полное представление о влиянии факторов и условиях движения к нужному оптимуму.

Несмотря на существенную простоту метода симплекс-планирования по сравнению с полным факторным экспериментом, при его использовании необходимо комплексирование усилий биологов и математиков, поскольку его продуктивное применение и приспособление к конкретным задачам требует освоения определенных логических приемов.

Литература

Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М., 1971, 283 с.

Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование эксперимента. Л., 1975, 78 с.

Литтл Т., Хиллз Ф. Сельскохозяйственное опытное дело. Планирование и анализ. М., 1981, 319 с.

Менчер Э.М. Лекции по статистическим методам оптимизации технологических процессов. Лекция седьмая. Красноярск, 1968, 200 с.

Налимов В.В., Чернова Н.А. Статистические методы планирования экстремальных экспериментов. М., 1965, 340 с.

Налимов В.В., Голикова Т.И. Логические основания планирования эксперимента. М., 1981, 151 с.

Горский В.Г., Бродский В.З. Симплексный метод планирования экстремальных экспериментов. /Завод. лаборатория, 7, 1965, с.27-39.

Хартман К., Лецкой Э.К., Шефер В. Планирование эксперимента в исследовании технологических процессов. М., 1977, 552 с.

Boas A.H. How search methods locate optimum in univariable problems. /Chemic. Engineering, 11, 1963, p.16-23.

МЕТОДИКА АНАЛИТИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ В МАЛЫХ КОЛИЧЕСТВАХ БИОМАТЕРИАЛА

А.Б.Верещагина

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Питание насекомых фитофагов, особенно с сосущим типом ротового аппарата, а также паразитических видов тесно связано с их вмешательством в метаболизм хозяина. Изучение тонких механизмов, регулирующих взаимоотношения в зонах взаимодействия сочленов в системах "производитель-консумент", часто требует анализа таких малых количеств ткани, которых недостаточно для выявления активности пищеварительных ферментов или анализа содержания основных групп веществ в обычном макромасштабе. Для разработки методик анализа малых количеств материала была использована техника работы, описанная в руководстве по микроанализу (Кирк, 1952) и некоторых статьях (Собецкий, Державина, 1973; Собецкий и др., 1980; Верещагина, 1986, 1988), модифицированная в соответствии с необходимостью определения содержания низкомолекулярных углеводов, крахмала и гликогена в малых количествах растительного и животного материала. В разработке использован принцип, основанный на колориметрическом определении интенсивности цветной реакции углеводов с антроном (производное антрахинона) (Morris, 1948; Асатиани, 1957). В результате взаимодействия с антроновым реактивом гексозы, дегидратируясь в присутствии концентрированной серной кислоты, дают соединение, окрашивающее раствор в синий цвет.

Достоинством метода является возможность проводить измерения в присутствии белков, применяя светофильтр на 620 нм. Ниже дано подробное описание хода исследований растительного материала методика 1 и животного материала - методика 2.

Оборудование: спектрофотометр, аналитические весы ВЛР-20, центрифуга ЦЛК-1, водяная баня, газовая горелка, штатив для кипячения пробирок. Для центрифугирования ампулок можно использовать держатели из корковых пробок с отверстиями соответствующего диаметра.

Посуда для методики 1 (растительный материал): мерные колбы емкостью 25 мл (1) и 100 мл (2); градуированные пипетки на 2 мл (2) и на 10 мл (1); стеклянная палочка для размешивания содержимого пробирок, стеклянные пробирки, ступка с пестиком для растирания ткани.

Посуда для методики 2 (животный материал): мерные пипетки на 10, 20 и 40 мкл, некалиброванная пипетка, капиллярные ампулки, микроцилиндры, капиллярная воронка, микрокувета. Техника изготовления микропосуды описана ниже.

1. Мерные пипетки на 10, 20 и 40 мкл с самоустанавливающимся

мениском. Изготавливают из толстостенной барометрической трубки на газовой горелке. Сначала вытягивают толстостенный капилляр, внутренний диаметр которого соответствует предполагаемому объему пипетки. Затем оттягивают носик пипетки. Пипетку заполняют заданным объемом ртути, делают метку, оттягивают конец, противоположный носику, лишнее стекло обрезают. Пипетку вновь заполняют ртутью, ртуть взвешивают и определяют точный объем пипетки. Слегка раздувая или осаживая стенки пипетки, можно точно подогнать ее объем под заданный. Пипетку вставляют в стеклянный держатель подходящего размера, на его конец одевают резиновую трубку, другой конец которой берут в рот для легкого втягивания и выдувания растворов при работе с пипеткой.

2. Некалиброванная пипетка типа пастеровской. Изготавливают из тонкостенного стеклянного капилляра. Используют для переноса малых количеств жидкостей без измерения их объема.

3. Капиллярные ампулки диаметром 2-2,5 мм и высотой 50 мм. Вытягивают из легкоплавких трубок. Они служат для разового использования, однако имеют преимущества: поскольку их можно легко запаять, то 1) содержимое можно легко перемешать встряхиванием и 2) их можно нагревать, не опасаясь испарения содержимого.

4. Микроцилиндры с плоским дном емкостью 20-30 мкл. Изготавливают путем впаивания стеклянной палочки в толстостенный капилляр. Стеклянные палочки с шариком на конце подгоняют ко дну и стенкам соответствующих микроцилиндров путем шлифовки на абразивном круте. Используют для гомогенизации материала.

5. Капиллярная воронка для фильтрации жидкостей. Изготавливают также, как и пастеровскую пипетку.

6. Микрокувета для спектрофотометрирования емкостью 30 мкл с толщиной поглощающего слоя 2 мм аналогична по устройству кювете Лоури и Бесси (Кирк, 1952).

Реактивы: антроновый реактив, SiO_2 (порошок), 80% этанол, 1% H_2SO_4 (0,54 мл концентрированной кислоты на 100 мл раствора), Al_2O_3 (порошок), бидистиллированная вода, стандартные растворы глюкозы.

Приготовление антронового реактива. Приготовление антрона проводят по В.С.Асатиани (1957). Для получения антронового реактива смешивают 20 мл концентрированной H_2SO_4 , 40 мг подготовленного антрона и 5 мл H_2O . Тщательно перемешивают. Реактив хранят в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой не более двух недель.

Приготовление стандартных растворов глюкозы. Стандарт 1: 10 мг глюкозы растворяют в 100 мл воды. Стандарт 2: стандарт 1 разбавляют в 2 раза. Растворы необходимо готовить в день анализа. Каждая серия определений должна включать следующие пробы: 1) холостую (контроль на реактивы), 2) с известными концентрациями

глюкозы (стандарты), 3) с исследуемым материалом. Анализ каждой пробы проводят в двух повторностях, каждую повторность анализируют дважды.

Методика 1 (растительный материал)

Ход анализа

Ткани растения взвешивают на аналитических весах и переносят в фарфоровую ступку. К навеске (100-200 мг) добавляют небольшое количество SiO_2 и 2 мл 80% этанола, тщательно растирают пестиком. Затем обмывают пестик еще 2 мл этанола. Весь этанол по стеклянной палочке количественно переносят в пробирку. Пробирку центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают в колбу емкостью 25 мл. Повторяют операции: дважды промывают спиртом гомогенат в ступке, сливают спирт в ту же пробирку, размешивают осадок, центрифугируют и сливают надосадочную жидкость в ту же колбу емкостью 25 мл. Повторяют операции в третий раз. Жидкость в колбочке доводят до метки спиртом, перемешивают и затем фильтруют через стеклянную воронку, заполненную сухой Al_2O_3 . Фильтровать можно с помощью центрифугирования. Фильтрат предназначен для определения содержания низкомолекулярных углеводов.

В пробирку с осадком добавляют 4 мл 1% H_2SO_4 , содержимое перемешивают и ставят на водяную баню на 20 минут для гидролиза полисахаридов (крахмала). Пробирку не закрывают. После кипячения пробирку центрифугируют и количественно переносят жидкий гидролизат в мерную колбу (25 мл). Осадок в пробирке дважды промывают водой, которую вносят в ту же колбу. Затем объем жидкости в колбе доводят до метки. При необходимости жидкость рекомендуется профильтровать через окись алюминия.

Состав пробы: 0,7 мл анализируемого раствора (или воды), 1,4 мл антронового реактива. Антроновый реактив добавляют вторым. Сразу после добавления реактива пробирки ставят в холодную воду и перемешивают их содержимое стеклянной палочкой. Затем все пробирки нагревают на водяной бане 15 минут. Через 15 минут пробирки охлаждают, перемешивают их содержимое и фотометрируют растворы в кварцевых кюветках при длине волны 620 нм.

Пример использования методики 1. Масса листовых галлов *Viteus vitifolii* составила 136,1 мг. Первичные результаты определений представлены в таблице 1.

На основании первичных данных рассчитывают средние значения экстинкции (E) и используют при определении содержания углеводов по формуле:

$$A\% = (E_{\text{оп.}} - E_{\text{к.}})250 / (E_{\text{ст.}} - E_{\text{к.}})P,$$

где A - процентное содержание низкомолекулярных углеводов или крахмала, $E_{\text{оп.}}$ - средняя экстинкция опытного образца, $E_{\text{к.}}$ - средняя экстинкция контроля, $E_{\text{ст.}}$ - средняя экстинкция стандартного

раствора, Р - масса образца в мг, 250 - коэффициент, полученный на основе расчета содержания глюкозы в анализируемой пробе (0.7 мл) с учетом начального объема пробы (25 мл).

Таблица 1. Показания спектрофотометра (Е) в опыте по определению содержания углеводов в листовых галлах *V.vitifolii*

Повторности	Контроль	Стандарт-1	Стандарт-2	Низкомолекулярные углеводы	Гидролизат крахмала
1	0.020	0.420	0.210	0.220	0.360
2	0.020	0.425	0.220	0.228	0.380
3	0.019	0.450	0.215	0.250	0.395
4	0.021	0.460	0.230	0.240	0.390

Таким образом, содержание низкомолекулярных углеводов в галлах составляет:

$$A = (0.234 - 0.020)250 / (0.438 - 0.020) 136.1 = 0.94\%$$

Содержание крахмала в галлах (в пересчете на глюкозу) составляет:

$$A = (0.381 - 0.020)250 / (0.438 - 0.020) 136.1 = 1.58\%$$

Методика 2 (животный материал)

Ход анализа

Взвешивают материал (400-800 мкг), переносят его в микроцилиндр, добавляют 10 мкл 80% этанола и тщательно растирают палочкой с шариком на конце. Затем у входа в цилиндр создают пробочку из спирта и промывают в ней палочку. Микроцилиндр центрифугируют и пастеровской пипеткой переносят надосадочную жидкость в ампулку, осадок в цилиндре промывают еще дважды спиртом, вновь центрифугируют и, добавляя воду, доводят мерной пипеткой объем надосадочной жидкости до 40 мкл. Переносят жидкость в ампулку, перемешивают, центрифугируют. Центрифугат фильтруют. Для этого в капиллярную воронку с Al_2O_3 переносят весь объем (40 мкл) жидкости, вставляют воронку в чистую ампулку и вновь центрифугируют.

В микроцилиндр с осадком добавляют 10 мкл 2н H_2SO_4 , перемешивают содержимое и помещают его в герметичную водяную баню на 2 часа для гидролиза полисахаридов (гликогена). Далее проводят те же операции, что и для низкомолекулярных углеводов. Конечный объем гидролизата 40 мкл.

Состав аналитической пробы: 10 мкл исследуемого раствора и 20 мкл аятронового реактива. После внесения растворов ампулки центрифугируют, запаивают, перемешивают их содержимое встряхиванием, центрифугируют и помещают в водяную баню на 15 минут. Затем их охлаждают, перемешивают их содержимое встряхиванием, центрифугируют и колориметрируют.

Пример использования методики 2. Масса 100 самцов *Trichog-*

gamma evanescens составила 740 мкг. Первичные результаты определений представлены в таблице 2.*

Таблица 2. Показания спектрофотометра (Е) в опыте по определению содержания углеводов в гомогенате тела самцов *T. evanescens*

Повторность	Низкомолекулярные углеводы	Гидролизат гликогена
1	0.375	0.230
2	0.360	0.244
3	0.356	0.250
4	0.360	0.260

*Примечание: Ек. и Ест., как и в предыдущей методике.

Содержание углеводов рассчитывают по следующей формуле:

$$A\% = (Еоп. - Ек.)400 / (Ест. - Ек.)P,$$

где обозначения те же, что и в предыдущей методике, но P - масса образца в мкг.

Подставляя полученные результаты в формулу, получим: содержание низкомолекулярных углеводов в теле самцов трихограммы составит 0.46%, а содержание гликогена - 0.29%.

При использовании этих методик максимальное отклонение от закона Бэра не превышало 6%. Прямая зависимость между содержанием глюкозы и интенсивностью окраски сохраняется в пределах от 5 до 300 мг. Значение отклонений параллельных проб от среднего арифметического не превышало 6.8% при среднем значении 1.4%.

Предложенные методики позволяют исследовать изменения и нарушения углеводного обмена в малых количествах как растительной, так и животной ткани, они пригодны для использования в различных областях биологии.

Литература

- Асатиани В.С. Биохимическая фотометрия. М., АН СССР, 1957, 836 с.
- Верещагина А.Б. Микрометод определения суммарной протеолитической активности в пищеварительных органах насекомых /Сб. тр. ВИЗР "Биохим. методы иссл. в энтомол". Л., ВИЗР, 1986, с.41-46.
- Верещагина А.Б. Анализ адаптивных изменений в уровне амилолитической активности кишечника у *Aphis fabae* Scop. в зависимости от кормового растения. /Сб. тр. ВИЗР "Изменчивость насекомых-вредит. в усл. научно-техн. прогр. в сельском х-ве". Л., ВИЗР, 1988, с.92-97.
- Кирк П. Количественный ультрамикрoанализ. М., ИЛ, 1952, 376 с.
- Собецкий Л.А., Державина М.А. К изучению физиологии питания виноградной филлоксеры *Viteus vitifolii* Fitch. (Homoptera, Phylloxeridae). /Энтомол. обозрение, 52, 3, 1973, с.542-548.
- Собецкий Л.А., Верещагина А.Б., Ермичева Ф.М. Микрометоды определения азота и фосфора в биоматериале. /Сб. тр. "Трихограмма", ч.1. Клинше-нев, 1980, с.43-54.
- Morris D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's antrone reagent. /Science, 107, 1948, p.254-255.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие. В.А.Захаренко, К.В.Новожилов	3
Танский В.И., Левитин М.М., Ишкова Т.И., <u>Кондратенко В.И.</u> Фитосанитарная диагностика в интегрированной защите зерновых культур (Методические рекомендации)	5
Сорокина А.П. Рекомендации по выявлению, определению и подбору видов рода <i>Trichogramma</i> Westw. (Hym. <i>Trichogrammatidae</i>) для использования в практике защиты растений	56
Мокроусова Е.П., Глазунова И.Н. Рекомендации по опытно- производственному испытанию ингибиторов синтеза хитина в защите шампиньонов от вредителей	75
Мешков Ю.И. Рекомендации по разведению и применению хищного клеща <i>Neoseiulus cucumeris</i> в борьбе с прозрачным земляничным клещом	87
Сазонов А.П., Шамшев И.В., Селицкая О.Г., Глазунова И.Н., Карегникова И.Н., Иванова Т.В., Арнольди Е.Л., Бузов В.Н. Технология применения феромонных ловушек на предприятиях хлебопродуктов	93
Гричанов И.Я., Ажбенев В.К. Рекомендации по практическо- му применению феромонных ловушек для серой зерновой совки на яровой пшенице	98
Михайлова Л.А., Гулятьева Е.И., Мироненко Н.В. Методы исследования структуры популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы <i>Puccinia recondita</i> Rob.ex Desm. f.sp. <i>tritici</i>	105
Афанасенко О.С. Методы анализа популяций возбудителей пятнистостей листьев ячменя	127
Гусева Н.Н., Градобоева Т.П. Изучение рас возбудителей темнопятнистого и бледнопятнистого аскохитоза гороха	135
Коновалова Г.С. Методы изучения механизмов изменчивости несовершенных грибов - патогенов растений	138
Макаров А.А., Соломатин Д.А., Стрижекозин Ю.А. Лабораторный метод выявления частичной (расо- неспецифической) устойчивости пшеницы к бурой ржавчине	148
Колобаев В.А. Использование конвергентных скрещиваний при создании доноров горизонтальной устойчивости картофеля к фитофторозу	153
Якушева А.С., Самошкина А.И. Методика лабораторной оценки люпина на устойчивость к антракнозу	157
Кунгурцева О.В. Экспресс-метод определения устойчивости люпина к антракнозу	162
Макаров А.А., Коваленко Е.Д., Наскидашвили Ж.Г., Горбуно- ва Ю.В., Ногайдели Д.Э., Коломиец Т.М., Чернова Н.А. Методические указания по оценке расо-неспецифической	

- устойчивости риса к возбудителю пирикулярриоза
(*Pyricularia grisea*) 164
- Аверьянов А.А., Коломиец Т.М., Лапикова В.Ц., Пасечник Т.Д.
Рекомендации по досимптомной оценке частичной
устойчивости риса к пирикулярриозу 176
- Якуткин В.И. Методы выявления и учета фомопсиса
подсолнечника 191
- Шпилова Н.П., Нефедова Л.И., Иващенко В.Г. Диагностика
фузариозного поражения колоса и заражения зерна на
северо-западе России 208
- Берестецкая Л.И., Вахрушева Т.Е. Методы обнаружения и
изучения фомозной инфекции в перикарпии семян
сафлора красильного *Carthamus tinctorius* L. 221
- Якушева А.С., Самопкина А.И. Методика определения
зараженности семян люпина антракнозом 230
- Власов Ю.И., Фоминых Т.С., Цыпленков А.Е., Якуткина Т.А.
Метод растений-индикаторов в фитовирусологии 232
- Васильева Т.Я., Ерохина Т.Н., Кастальева Т.Б., Можяева К.А.
Определение вируса желтой карликовости ячменя при
помощи иммуноферментного анализа на основе
моноклональных антител 242
- Семенова Н.Н., Новожилов К.В., Петрова Т.М. Применение
имитационной системы PESTINS для решения задач
рационального использования химических средств
защиты растений 246
- Сундуков О.В., Парнова Р.Г. Физиологическая тест-модель
для изучения действия биологически активных веществ
и инсектицидов на мембранный транспорт воды и ионов
у насекомых 263
- Дорофеева Т.Б. Методика испытания фунгицидов и
химических активаторов болезнеустойчивости растений
на биологическую активность против мучнистой росы
томатов, вызываемой *Erysiphe orontii* 268
- Гончаров Н.Р., Каширский О.П. Экономическая оценка
мероприятий по защите растений в условиях
переходного периода 272
- Гончаров Н.Р., Каширский О.П. Энергетическая оценка
мероприятий по защите растений 279
- Логинов Е.В., Павлюшин В.Л. Новый метод азур-эозиновой
окраски микроскопических препаратов для энтомо-
логических исследований (мсэл-метод) 282
- Косенков И.И., Митрофанов В.Б. Экспресс-метод планиро-
вания экстремального эксперимента в микробио-
логических исследованиях 288
- Верещагина А.Б. Методика аналитического определения
углеводов в малых количествах биоматериала 299