

Гордеева Е.И., Крюкова А.В., Курбатова З.И.

# ИММУНИТЕТ РАСТЕНИЙ

учебное пособие

Великие Луки

2011

Настоящее учебное пособие «Иммунитет растений» выполнено сотрудниками ФГОУ ВПО «Великолукская ГСХА»: кандидатом сельскохозяйственных наук, доцентом **Е.И. Гордеевой**, кандидатом биологических наук, доцентом **А.В. Крюковой**, кандидатом сельскохозяйственных наук, профессором **З.И. Курбатовой**.

Учебное пособие предназначено для студентов, аспирантов и специалистов по защите растений.

В учебном пособии освещаются современные представления и достижения в области иммунитета растений к паразитарным организмам, содержатся сведения о механизмах патогенности и изменчивости, рассматриваются категории иммунитета растений. Особое внимание уделяется изучению методов оценки различных проявлений иммунитета на устойчивость к болезням и вредителям.

Рецензенты: профессор института географии РАН, доктор географических наук **Г.В. Сдасюк**; профессор ФГОУ ВПО «Великолукская ГСХА», доктор сельскохозяйственных наук **И.Ф. Устименко**.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	4
Теории иммунитета растений. Роль устойчивых сортов в защите растений.....	5
Категории и факторы растительного иммунитета.....	9
Методы учета устойчивости растений.....	11
Групповая и комплексная устойчивость растений к вредным организмам.....	15
Система иммуногенетических барьеров растений.....	18
Особенности взаимоотношений вредных членистоногих с растениями-хозяевами.....	23
Принципы использования метода морфофизиологического анализа растений в изучении устойчивости сельскохозяйственных культур к вредителям.....	27
Лабораторный практикум.....	36
Тема 1 Методы учета результатов заражения.....	36
Лабораторная работа № 1. Оценка зерновых культур на устойчивость к болезням.....	42
Лабораторная работа № 2. Оценка устойчивости зерновых культур к вредителям.....	46
Лабораторная работа № 3. Методы оценки картофеля на устойчивость к болезням.....	68
Лабораторная работа № 4. Оценка картофеля и овощных пасленовых культур на устойчивость к жесткокрылым вредителям	78
Тема 2 Механизмы устойчивости растений.....	97
Лабораторная работа № 5. Защитные свойства растений.....	99
Тема 3 Оценка растений на инфекционных фонах и методы их организации.....	101
Лабораторная работа № 6. Инфекционная нагрузка, условия ее реализации и методы определения.....	118
Тема 4 Физиологические расы и методы их определения.....	119
Лабораторная работа № 7. Избирательность (специализация) возбудителей заболеваний и вредителей.....	121
Список используемой литературы.....	125

## ВВЕДЕНИЕ

Создание и широкое использование устойчивых сортов сельскохозяйственных культур в настоящее время стало важнейшей проблемой не только народно-хозяйственного значения, но и крупной экологической и социальной задачей.

Важнейшим элементом совершенствования земледелия является использование высокопродуктивных сортов сельскохозяйственных культур, характеризующихся ценными пищевыми, технологическими и товарными качествами, устойчивостью к абиотическим и биотическим стрессам, обладающих высокой средообразующей производительностью. Широкое использование стресс-устойчивых сортов сельскохозяйственных культур является одним из важнейших рычагов регулирования численности популяций вредных организмов в агроэкосистемах и снижения потерь урожая. При расширении посевов устойчивых сортов создаются реальные предпосылки для перехода к управлению внутривидовыми и межвидовыми взаимоотношениями в пределах агробиоценоза. С позиции защиты растений стресс-устойчивые сорта наиболее полно решают задачи защиты посевов от повреждения вредными организмами, энерго- и ресурсосбережения, охраны биосферы от загрязнения пестицидами и задачи управления функционированием агроэкосистем, что может рассматриваться как новый этап фитосанитарии.

Успешность создания устойчивых генотипов сельскохозяйственных культур, составляющих основу конструирования высокопродуктивных агроэкосистем, зависит от разработки теоретических, методологических и методических основ фитоиммунологии, интеграции селекционных и иммунологических подходов к этой проблеме.

На основе современных фундаментальных и прикладных исследований по иммунитету растений научно обоснованы принципы создания генотипов растений с групповой и комплексной устойчивостью к различным видам вредных организмов, оптимизирующих биоценологические взаимодействия в агроэкосистемах, принципы совершенствования

экологизированных систем защиты растений, конструирование агроэкосистем и обоснование путей управления ими.

## **ТЕОРИИ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ. РОЛЬ УСТОЙЧИВЫХ СОРТОВ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ**

Основатель учения об иммунитете растений Н. И. Вавилов, положивший начало изучению его генетической природы, считал, что устойчивость растений к возбудителям болезней выработалась в процессе тысячелетней эволюции в центрах происхождения. В случае приобретения растениями генов устойчивости возбудители могли поражать растения благодаря появлению новых физиологических рас, возникающих в результате гибридизации, мутации, гетерокариозиса и других процессов. Внутри популяции микроорганизма возможны сдвиги численности рас в связи с изменением сортового состава растений того или иного района. Появление новых рас возбудителя может быть связано с потерей устойчивости сорта, некогда устойчивого к данному патогену.

Иммунитет растений контролируется сравнительно небольшим числом генов, поддающихся учету при гибридологическом анализе. Известно, что устойчивость или восприимчивость растений представляют собой результат взаимодействия двух геномов (растения и паразита), что объясняет многообразие как генов устойчивости растений к одному и тому же виду возбудителя, так и физиологических рас патогена, способных преодолевать действие этих генов. Подобное многообразие является следствием параллельной эволюции паразита и растения-хозяина.

В соответствии с теорией Вандерпланка все гены устойчивого растения (R-гены) неизбежно должны быть преодолены генами вирулентности паразита, поскольку темп его размножения намного выше, чем у растения. В то же время в природе постоянно можно встретить растения, устойчивые ко всем известным расам патогенов, в силу наличия у этих растений так называемой полевой устойчивости, контролируемой полигенами, каждый из которых не дает видимого эффекта устойчивости, однако их различные сочетания определяют ту или

иную ее степень. В связи с большим разнообразием патогенов и защитных реакций растений единой теории иммунитета растений нет.

Еще Н. И. Вавилов подразделял иммунитет растений на структурный и химический. Так, в одних случаях иммунитет растений может определяться недостатком в них каких-либо необходимых для фитопатогена веществ, в других — биосинтезом фитоалексинов — веществ, вредных для паразита, причем их образование может вызвать большое число элиситоров. Так, известно более 200 соединений, которые могут вызывать накопление пизатина в горохе, фазеоллина в фасоли, глицеоллина в сое. Кроме того, накопление таких веществ может происходить под действием микроорганизмов и физиологических стрессов. Возможно, что эти соединения вызывают временное нарушение метаболизма растений, что химически выражается как возникновение сигналов тревоги. Такие сигналы могут инициировать каскад событий, приводящих к синтезу и накоплению в растениях фитоалексинов.

По данным Д. Т. Страхова, в тканях, устойчивых к болезням растений, происходят регрессивные изменения патогенных микроорганизмов, связанные с действием ферментов растений, его обменными реакциями.

Б.А. Рубин с сотрудниками связывал реакцию растений, направленную на инактивацию возбудителя болезни и его токсинов, с деятельностью окислительных систем и энергетическим обменом клетки. Разнообразные ферменты растений характеризуются разной устойчивостью к продуктам жизнедеятельности патогенных микроорганизмов. У иммунных форм растений доля участия ферментов, устойчивых к метаболитам патогенов, выше, чем у неиммунных. Наиболее устойчивы к воздействию метаболитов окислительные системы (пероксидазы и полифенолоксидазы), а также ряд флавоновых ферментов.

У растений, как и у беспозвоночных животных, не доказана способность вырабатывать антитела в ответ на появление в организме антигенов. Только у позвоночных имеются специальные органы, клетки которых вырабатывают антитела. В инфицированных тканях иммунных растений образуются

полноценные в функциональном отношении органоиды, обуславливающие присущую иммунным формам растений способность повышать при инфекции энергетическую эффективность дыхания. Нарушение дыхания, вызываемое болезнетворными агентами, сопровождается образованием различных соединений, выполняющих роль своеобразных химических барьеров, препятствующих распространению инфекции.

Характер ответных реакций растений на повреждения вредителями (образование химических, механических и ростовых барьеров, способность к регенерации поврежденных тканей, замена утраченных органов) играет важную роль в иммунитете растений к насекомым-вредителям. Так, ряд метаболитов (алкалоиды, гликозиды, терпены, сапонины и др.) оказывают токсическое действие на пищеварительный аппарат, эндокринную и другие системы насекомых и прочих вредителей растений.

В селекции растений на устойчивость к заболеваниям и вредителям большое значение имеет гибридизация (внутривидовая, межвидовая и даже межродовая). На основе автополиплоидов получают гибриды между разнохромосомными видами. Подобные полиплоиды созданы, например, М.Ф. Терновским при выведении сортов табака, устойчивых к мучнистой росе. Для создания устойчивых сортов можно использовать искусственный мутагенез, а у перекрестноопыляемых растений — отбор среди гетерозиготных популяций. Так Л.А. Ждановым и В.С. Пустовойтом были получены сорта подсолнечника, устойчивые к заразихе.

Для длительного сохранения устойчивости сортов предложены следующие способы:

- создание многолинейных сортов путем скрещивания хозяйственно ценных форм с сортами, несущими разные гены устойчивости, благодаря чему у полученных гибридов не могут накопиться в достаточном количестве новые расы патогенов;
- сочетание в одном сорте R-генов с генами полевой устойчивости;
- периодическая смена сортового состава в хозяйстве, что приводит к повышению устойчивости.

В последние годы развитие растениеводства в нашей стране было сопряжено с рядом негативных процессов, связанных с загрязнением окружающей среды и растениеводческой продукции ксенобиотиками, высокими экономическими и энергетическими затратами. Максимальное использование биологического потенциала сельскохозяйственных культур может стать одним из альтернативных путей развития агрономического сектора сельскохозяйственного производства. Определенные надежды в этом отношении связывают с генной инженерией — комплексом методологических подходов, позволяющих изменять конструкцию генома растения путем переноса в него чужеродных генов, что дает возможность получать новые формы растений, значительно расширить процесс манипуляции с геномом растения и сократить временные затраты на получение новых сортов сельскохозяйственных культур. В последнее время методы создания трансгенных растений начинают использовать для получения растений, устойчивых к вирусным, грибным и бактериальным болезням, а также к некоторым вредителям (колорадскому жуку, кукурузному стеблевому мотыльку, хлопковым моли и совке, табачной листовёртке и др.). По своим методам и объектам данное направление резко отличается от традиционной селекции на иммунитет растений, но преследует ту же цель — создание форм, обладающих высокой устойчивостью к вредным организмам.

Блестящее обоснование роли устойчивых сортов в защите растений дано Н. И. Вавиловым, который писал, что среди мер защиты растений от разнообразных заболеваний, вызываемых паразитическими грибами, бактериями, вирусами, а также различными насекомыми, наиболее радикальным средством борьбы является введение в культуру иммунных сортов или создание таковых путем скрещивания. В отношении хлебных злаков, занимающих три четверти всей посевной территории, замена восприимчивых сортов устойчивыми формами, по существу, является наиболее доступным способом в борьбе с такими инфекциями, как ржавчина.

## КАТЕГОРИИ И ФАКТОРЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

В процессе эволюции между растениями и вредными организмами сложились определенные взаимоотношения. При заболеваниях или повреждениях, вызываемых ими, растения или погибают, или приобретают способность противостоять паразиту (иммунитет). Подобная невосприимчивость имеет разнообразные формы. У растений различают два основных типа иммунитета: врожденный, или естественный, и приобретенный, или искусственный.

**Врожденный, или естественный, иммунитет** — это свойство растений не поражаться (не повреждаться) той или иной болезнью (вредителем). Врожденный иммунитет передается по наследству из поколения в поколение.

Все случаи врожденного иммунитета делятся на две категории: пассивную и активную.

*Пассивный иммунитет* представляет собой свойство растений препятствовать внедрению патогена и развитию его в тканях растения-хозяина. Он существует независимо от наличия паразита и определяется генотипом растения, его структурно-морфологическими, физиологическими и биохимическими особенностями.

*Активным иммунитетом* называют свойство растений активно реагировать на внедрение в него паразита и воздействие патогена, проявлять ответные защитные реакции. Сопротивление растений проявляется в виде активации деятельности ферментных систем, проявления фагоцитоза, образования нейтрализующих соединений, формирования барьеров из отмерших клеток и тканей (реакция сверхчувствительности).

Повышение устойчивости растений под влиянием внешних факторов, протекающее без изменения генома, получило название приобретенной, или индуцированной, устойчивости. Факторы, воздействие которых на семена или растения приводит к повышению устойчивости растений, называются индукторами.

**Приобретенный иммунитет** — это свойство растений не поражаться тем или иным возбудителем болезни, возникшее у растений после перенесения заболевания или под влиянием

внешних воздействий, особенно условий возделывания растений.

Устойчивость растений можно повысить различными приемами: внесением микроудобрений, изменением сроков посадки (посева), глубины заделки семян и т.д. Методы обретения устойчивости зависят от вида индукторов, которые могут быть биотической или абиотической природы. Приемы, способствующие проявлению приобретенной устойчивости, широко используют в практике сельского хозяйства. Так, устойчивость зерновых культур к корневым гнилям можно повысить, высевая яровые зерновые в оптимально ранние, а озимые зерновые культуры в оптимально поздние сроки; устойчивость пшеницы к твердой головне, поражающей растения при прорастании семян, можно повысить, соблюдая оптимальные сроки посева.

Иммунитет растений может быть обусловлен неспособностью возбудителя вызывать заражение растений данного вида. Так, зерновые культуры не поражаются фитофторозом и паршой картофеля, капуста — головневыми болезнями, картофель — ржавчинными болезнями зерновых культур и т.д. В данном случае иммунитет проявляется видом растений в целом. Иммунитет, основанный на неспособности возбудителей вызывать заражение растений определенного вида, называется *неспецифическим*.

*Естественный неспецифический иммунитет* защищает растение от большого числа окружающих его сапротрофных видов, которые в процессе эволюции не приобрели свойств, обеспечивающих способность паразитировать на растениях этого вида.

В некоторых случаях иммунитет может проявляться не видом растений в целом, а лишь отдельным сортом в пределах этого вида. В таком случае одни сорта иммунны и не поражаются болезнью, другие — восприимчивы и поражаются ею в сильной степени. Так, возбудитель рака картофеля *Synchytrium endobioticum* поражает вид *Solarium*, однако внутри него есть сорта, которые не поражаются этой болезнью. Такой иммунитет называют *сортовым специфическим*. Он имеет большое значение при выведении устойчивых сортов сельскохозяйственных растений.

В ряде случаев растения могут обладать иммунитетом к возбудителям разных болезней. Например, сорт озимой пшеницы может быть иммунным к возбудителю и мучнистой росы, и бурой стеблевой ржавчины. Устойчивость сорта или вида растений к нескольким возбудителям называется *комплексным, или групповым, иммунитетом*.

Создание сортов с комплексным иммунитетом — наиболее перспективный путь снижения потерь сельскохозяйственных культур от болезней. Например, пшеница *Triticum timopheevi* обладает иммунитетом к головне, ржавчине, мучнистой росе. Известны сорта табака, устойчивые к вирусу табачной мозаики и возбудителю ложной мучнистой росы. Районированием таких сортов в производстве удается решить проблему защиты той или иной культуры от основных болезней.

## **МЕТОДЫ УЧЕТА УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ**

Устойчивость сортов определяется по трем основным показателям: а) внешним признакам проявления реакции растения на заражение патогеном; б) интенсивности проявления; в) потерям урожая от болезни. В качестве контроля при проведении оценки используются восприимчивые растения. По проявляющимся на них признакам судят о состоянии инфекционного фона и условиях для развития патологического процесса.

При выявлении иммунных форм растений применяется только один качественный показатель — наличие или отсутствие поражений (или повреждений). Иммунность может проявляться в отношении отдельных рас патогена.

Устойчивость характеризуется количественными показателями. Ее степень выявляют разными методами.

**Методы учета пораженности растений по типу реакции.** Распространение заболеваний общего типа (увядания, вирозы, микоплазмозы, виды головни) учитывается по проценту поражений растений, его отдельных частей (колосьев, листьев, корней, плодов и т. д.). Анализ проводят путем взятия проб в определенные фазы развития растения в период максимального проявления симптомов поражений. Пробы составляют из

образцов, взятых на участке в соответствии с нормативами. Расчет числа пораженных растений или их органов (в %) проводится на единицу площади.

**Методы учета степени поражения (или повреждения).** Для заболеваний и повреждений местного характера (виды ржавчины, парша, объедание листьев и др.) учет проводится путем определения занятой ими поверхности растения. Для унификации получаемых результатов используют специальные шкалы-эталонные, построенные на основе интенсивности проявления признаков. Пораженность анализируемых частей растений сравнивают с данными шкалы и определяют ее степень (в баллах и процентах). Для создания шкал, отражающих проявление защитных реакций, применяют показатели, характеризующие степень восприимчивости растения. Например, оценку устойчивости злаков к ржавчине проводят по шкале, группирующей типы реакций на заражение; при учетах заражихоустойчивости кроме процента пораженных растений определяют среднее количество приходящихся на них стеблей паразита.

**Методы учета степени вредоносности.** Сохранение урожая в условиях массового развития патогена — наиболее ценное качество устойчивости сортов. Поэтому важным показателем степени их выносливости к болезням и вредителям является определение его потерь от них, т. е. их вредоносности. Так, величина потерь урожая на гибридах сахарной свеклы служит показателем их толерантности или чувствительности к мучнистой росе.

Особенно большое значение установление вредоносности имеет при оценке устойчивости растений к вирусным, микоплазменным, нематодным заболеваниям и многим вредителям. Для выявления этого показателя учитывают урожай испытуемых сортов с единицы площади на фоне их заражения (естественного или искусственного) и без него. Так, оценка поражаемости яровых тритикале вирусом желтой карликовости ячменя показала, что устойчивость его линии коррелировала с полученным с них урожаем зерна и уборочным индексом. Показателем толерантности пшеницы к бурой листовой ржавчине также берется урожай и масса 1000 зерен.

При статистическом учете по результатам оценки каждого растения рассчитывают средний показатель развития болезни:

$$P = \frac{(r \cdot b) \cdot 100}{n \cdot e} \quad (1)$$

или

$$P = \frac{(r \cdot b)}{n \cdot e} \quad (2)$$

где:  $P$  — развитие болезни;

$r \cdot b$  — сумма произведений числа растений на соответствующий им балл;

$n$  — общее число учтенных растений;

$e$  — высший балл применяемой шкалы.

**Методы учета устойчивости растений по физиолого-биохимическим изменениям в их тканях.** С помощью газовой хроматографии у сортов ячменя, различных по устойчивости к желтой и карликовой ржавчине, выявлены существенные различия в содержании многоатомных спиртов арабитола и маннитола. Найденная корреляция дает возможность проводить оценку сортовой устойчивости по показателю, характеризующему процентное содержание сахаров в тканях грибов от общего количества сахаров в клетках растений. Широко используются в селекционной практике методы, позволяющие выделять устойчивые формы по уровню фунгистатистического действия соединений из их тканей. В частности, разработаны ускоренные лабораторные методы оценки устойчивости винограда к серой гнили по прорастанию спор гриба в чашках Петри в присутствии кожицы с плодов испытуемых форм. Подобные иммунологические реакции, проявляющиеся при контакте с патогенами, можно также оценивать по прорастанию спор в инфекционных каплях на поверхности листьев, в вытяжках из тканей, мезге. Для инфекции, проникающей через цветки, показателем устойчивости является количество проросших спор на рыльцах цветков.

Ускоренный метод оценки нематодоустойчивости томатов по содержанию в образцах томата спирторастворимых фенолов и активности полифенолоксидазы в корнях 25-дневных сеянцев.

Устойчивые формы по этим показателям должны содержать менее 15,9 мг/г сухого вещества фенольных соединений, и активность при этом составляет не менее 19,4 условных единиц/г ткани. При этом создается инфекционная нагрузка от 7,5 до 25 тыс. личинок нематоды на сосуд (7,5 см), или 2500 цист/сосуд.

**Другие косвенные методы оценки устойчивости.** При отборе устойчивых родительских и гибридных форм их реакция на заражение может определяться также с помощью ряда специальных диагностических методов (серологический, метод включений, электронная, люминисцентная и световая микроскопия, индикаторный метод и др.) и косвенных показателей, находящихся в коррелятивной зависимости с признаком устойчивости. Так, отбор гибридных семей яровой пшеницы, устойчивых к головне, проводят по косвенному коррелятивному признаку — высокой всхожести. Этот же показатель используется при выделении растений сахарной свеклы, устойчивых к корнееду *Rhoma betae*.

При отборах на устойчивость применяются и другие признаки, в частности, характеризующие повышенную жизненность растений: более мощное развитие корневой системы, выносливость к повышенным температурам (+45°C) и способность прорасти в более концентрированных растворах солей и др. Например, анализ восприимчивости клубней картофеля к возбудителю черной ножки (мокрой бактериальной гнили) *Erwinia caratovora* проводили путем инкубации 30 высечек из клубней диаметром 10 мм и толщиной 2 мм в течение 16 ч в суспензии бактерий (10 бактерий/мл) на фильтре в чашках Петри при 20°C. Устойчивость клубней к заболеванию оценивали по уровню мацерации высечек, т.е. степени расслизнения тканей, определяемой колориметрически с помощью нейтрального красного. Однако в случаях, когда устойчивость обуславливается несколькими признаками, отбор по какому-либо одному косвенному показателю не является достаточно эффективным.

Известно, что питание вредителей на разных по устойчивости к ним формах отражается на их общем развитии. Так, на устойчивых к совке (*Spodoptera trugiperda*) формах бермудской травы изменялись такие показатели вредителя, как выживаемость, продолжительность развития гусениц и масса их

тела. В частности, масса гусениц (через 10 дней после скормливания им листьев устойчивых форм) была почти в 17 раз меньше, чем при питании на восприимчивом клоне. Соответственно снижается выживаемость и продолжительность развития. Предложен индекс пригодности растений для питания, коррелирующий с устойчивостью и рассчитываемый по формуле:

$$In = \frac{M_k}{Pl} \cdot Pr \cdot V \quad (3)$$

где:  $In$  - индекс пригодности растений для питания;

$M_k$  – масса куколки, мг;

$Pl$  – потребление листьев, г;

$Pr$  – продолжительность развития, дни;

$V$  – выживаемость, %

Степень устойчивости можно определить с помощью микроскопического анализа по изменению ядер в клетках растений, наличию грибницы (например, при заражениях головневыми грибами).

Известно, что белки хозяина и патогена часто обнаруживают сродство. Это указывает на возможную эволюционную связь между ними. На их сравнительном анализе основан серологический метод определения сортоустойчивости. Восприимчивость растений устанавливают по наличию реакции преципитации между белками хозяина и антивозбудительной сывороткой. Белки устойчивых форм такой реакции не дают.

Таким образом, иммунологическая оценка — это сравнительное испытание селекционного материала и получаемых сортов в условиях заражения. Она проводится на всех этапах селекционного процесса (при изучении исходного материала, выделении родительских пар, оценки гибридов, при производственных испытаниях новых сортов).

## **ГРУППОВАЯ И КОМПЛЕКСНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ВРЕДНЫМ ОРГАНИЗМАМ**

Развиваемые представления о структурной и функциональной организации иммуногенетической системы растений послужили основой для разработки концепции

группового и комплексного иммунитета растений к вредным организмам, служащей основой для развития селекционных программ по конструированию генотипов с заданными свойствами.

Групповая устойчивость - это устойчивость растений к вредителям или же к возбудителям заболеваний нескольких видов, а комплексная устойчивость - устойчивость как к вредителям, так и к возбудителям заболеваний и др. стресс-факторам биотической и абиотической природы (Шапиро, 1985).

Мировой опыт показывает, что для решения задачи стабилизации фитосанитарного состояния в агробиоценозах насыщенность устойчивыми формами растений должна составлять около 70-80% от посевной площади данной сельскохозяйственной культуры.

Устойчивость растений к одному патогену не всегда может обеспечить требуемый уровень защиты культуры от потерь урожая, вызываемого группой, или комплексом, патогенов. Это связано с тем, что патогены, объединенные в рамки консортных систем, характеризуются значениями вредоносности, отличными от таковых, взятых по отдельности. При этом следует учитывать, что видовой состав экологических комплексов вредных организмов существенно изменяется в зональном плане, а также в онтогенезе поражаемого растения.

Иммунологические барьеры растений непрерывно совершенствовались в направлении усиления устойчивости не столько к конкретному патогену, сколько к комплексу патогенов, естественно сложившимся природным сообществам. В связи с этим создание так называемых абсолютно устойчивых генотипов растений противоречит основным принципам формирования и функционирования консортных систем и биогеоценозов в целом. Селекция на устойчивость должна быть направлена на создание форм сельскохозяйственных культур, снижающих вредоносность вредных организмов и комплексов патогенов, естественно сложившихся в природных сообществах.

Изучение функционирования иммуногенетических систем при воздействии консументов в агробиоценозах позволило сделать вывод о том, что направление селекционных преобразований сельскохозяйственных культур сформировало

специфику структурной организации иммунитета у внутривидовых форм (сортов) и определило характер воздействия ее механизмов на консументов. Преобладание в растениях тех или иных механизмов устойчивости определяет направление и темпы эволюционного адаптациогенеза биотрофов в агробиоценозах и формирует специфику их онтогенетической реактивности.

Анализ специфики аутоэкологических и популяционно-динамических реакций консументов в агробиоценозах на воздействие различных механизмов иммуногенетической системы растений позволил установить, что наибольшее значение в качестве факторов группового и комплексного иммунитета имеют механизмы морфологического, атрептического, физиологического, оксидативного и ингибиторного барьеров.

В числе механизмов морфологического барьера большое значение в качестве защиты при проникновении вредных организмов в растение и при питании имеют покровные ткани растений (кутикула, эпидермис), воска, опушение (особенно железистое), включения кремния в эпидермальных клетках листьев и стебля. Выявлена иммунологическая значимость в устойчивости растений особенностей морфологического строения анатомических структур вегетативных и репродуктивных органов (листьев, стеблей, корней, плодов).

Механизмы физиологического и оксидативного барьеров связаны с уровнем содержания в растениях физиологически активных соединений (в т.ч. веществ вторичного обмена), обладающих широким спектром действия. В соответствии с представлениями о питании биотрофов обязательным условием ассимиляции является разборка сложных биологических структур пищи. Изучение различных сторон ферментсубстратных взаимодействий при пищеварении у различных вредителей и их моделирование показало значение атрептического барьера как одного из наиболее древних по происхождению и перспективных для практической селекции при создании форм растений с групповой и комплексной устойчивостью. Наибольший интерес с практических позиций имеют оксидативный и ингибиторные барьеры, ингибиторы гидролитических ферментов.

## СИСТЕМА ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ БАРЬЕРОВ РАСТЕНИЙ

Иммунитет в настоящее время рассматривается как основа развития и функционирования как индивидуализированных систем, т.е. видов, так и многокомпонентных экологических систем, выступая в качестве основного механизма стабильности взаимодействия всех компонентов экосистем. Известно, что состояние иммунности в организме создается наличием соответствующих структур и функций.

Классификация на основе системного анализа известных в настоящее время факторов иммунитета растений по происхождению, структурной организации и особенностям функционирования позволила выделить и обосновать у растений систему иммуногенетических барьеров (Вилкова, 1980).

В силу специфики организации и жизнедеятельности растений их иммунитет представлен двумя возникшими эволюционно в разное время и взаимозависимыми системами - более древней "конституциональный иммунитет" и эволюционно молодой формой "индуцированный иммунитет", формирование механизмов которого связывают со становлением и развитием паразит - хозяинных отношений в эволюции органического мира. Каждая из этих систем несет некоторые черты специфичности, однако основу иммунитета растений составляет неспецифический иммунитет.

Согласно общей теории иммунитета большинство основных средств самозащиты растений от вредных организмов - неспецифические (Щербаков, 1981). Неспецифические защитные механизмы довольно сильны, действуют комплексно и незамедлительно. Система наследственной устойчивости имеет общебиологическое значение. С.М. Румянцев (1984) рассматривает конституциональный иммунитет как универсальный механизм, защищающий любой организм от экстремальных экологических факторов, в т.ч. и от поражения (повреждения) растений вредными организмами.

**Атрептический барьер** обусловлен специфическими особенностями атакуемости основных биополимеров растений (белков, углеводов, липидов) ферментами вредных организмов.

Возможность приспособления вредных организмов к использованию биополимеров растений крайне низка, поскольку стереохимическое соответствие (конформация) ферментных систем вредных организмов химическим структурам пищи эволюционно закреплено как элемент охраны структурной и функциональной целостности организмов (Покровский, 1974; Черников, 1975). Для фитофагов особое значение устойчивости биополимеров к ферментативному разрушению обусловлено специфическим характером процесса переваривания пищевых субстратов (Вилкова, 1978, 1980). Питание на растениях, характеризующихся низкой атакуемостью белков, углеводов и липидов, вызывает у фитофагов гетерохронию в функционировании физиологических систем, что способствует снижению их биотического потенциала.

**Ростовой барьер** связан с характером роста различных органов растений и отдельных их частей во времени и пространстве. Во многих случаях рост растений выступает в качестве барьера при выборе насекомым растения в целом или его органов для откладки яиц. В других случаях рост листьев, стеблей, а также количественные и качественные преобразования в тканях репродуктивной сферы обуславливают самоочищение растений от вредителя (Шапиро, 1993).

**Физиологический барьер** обусловлен различиями содержания в растениях физиологически активных веществ. Многочисленные исследования свидетельствуют о важном иммунологическом значении содержащихся в растениях физиологически активных веществ, относящихся к разным классам химических соединений, в т.ч. веществ вторичного обмена. Эти вещества могут вызвать у насекомых разнообразные по характеру и глубине физиологические воздействия. Многие из них служат сигналами в поисковых реакциях фитофагов, определяя пространственную ориентацию. Летучие вещества, выделяемые в окружающую среду, во многих случаях могут быть как аттрактантами, так и репеллентами. У высших растений также обнаружены вещества, обладающие антифидантной, инсектицидной и регулирующей рост фитофагов функцией, которые могут служить для насекомых источником гормонов, феромонов или их предшественников. Питание на видах и сортах

растений, содержащих высокие концентрации веществ вторичного обмена, приводит к угнетению физиологического состояния, и даже гибели насекомых. Однако селекция на повышенное их содержание в растениях проблематична. Создание устойчивых форм растений с повышенной концентрацией этих соединений возможно, если содержание их значительно снижается к моменту уборки урожая.

**Органогенетический барьер** связан с дифференциацией органов растений и определяется особенностями их морфофизиологического состояния в различные периоды онтогенеза. Онтогенетическая специфичность насекомых и клещей выражается в относительно строгой избираемости вредителями кормовых растений, находящихся на определенных этапах органогенеза. Несовпадение питающей фазы вредителя с предпочитаемыми этапами органогенеза растений затрудняет развитие фитофагов.

С факторами конституциональной устойчивости растений тесно взаимодействует **индуцированный иммунитет**. Его формирование связано со становлением и развитием отношений в биоценозах паразит - хозяин. В силу специфики организации эта форма защиты у растений не играет столь важной роли, как у высших животных.

Выделяют несколько форм проявления индуцированной устойчивости растений при повреждении фитофагами: реакцию сверхчувствительности, повышение уровня обмена веществ, структурную регенерацию, появление новых гомологичных органов взамен утраченных, необычное разрастание отдельных тканей, органов и растения в целом и др.

Пути реализации этих закономерностей различны и зависят от характера и меры нанесенного растениям повреждения (поражения), особенностей ростовых и органообразовательных процессов и, как результат взаимодействий между повреждающим агентом, защитно-восстановительными реакциями растений и абиотическими условиями (обеспеченность минеральным питанием и т.д.).

Основные формы иммунного ответа растений на повреждение проявляются путем формирования в них индуцированных барьеров: некротического, репарационного,

галло- и тератогенетического, оксидативного и ингибиторного.

**Некротический барьер** представляет собой совокупность процессов отмирания клеток и клеточных комплексов тканей вокруг зоны повреждения. Это затрудняет питание вредных организмов и приводит к пространственной их изоляции от неповрежденных частей растений.

Для насекомых и клещей в общей системе иммунитета некротический барьер имеет ограниченное значение в связи с особенностями их взаимоотношений с кормовыми растениями. Питание подавляющего большинства вредителей, как правило, не ограничивается повреждением одной клетки растений, а охватывает сразу значительную часть их. Повреждение растительных тканей грызущими насекомыми активизирует меристематическую деятельность клеток, прилегающих к раневой зоне, что приводит к образованию раневой перидермы, или каллюса, выполняющих защитную функцию. Для сосущих вредителей в качестве механизма этого барьера выступает групповая реакция сверхчувствительности поврежденных клеток. Об этом свидетельствует формирование раневой перидермы на поврежденных участках корней винограда при повреждении корневой филлоксерой; картофеля - картофельной молью. От скорости образования раневой перидермы и изоляции насекомых от здоровой ткани зависит степень устойчивости различных сортов винограда к корневой филлоксере; картофеля - к картофельной моли.

Описанные восстановительные реакции растений в большинстве случаев локализованы в месте повреждения. Лишь при значительном повреждении ткани они могут охватить растение целиком.

**Репарационный барьер** включает процессы заместительного возобновления утраченных органов. В зависимости от характера нанесенного вреда и возраста растений репарационные реакции проявляются в различной форме: в отращивании листовой поверхности или формировании новых органов (побегов, стеблей или репродуктивных органов) взамен утраченных. В основе этих процессов лежит активация обмена веществ и повышение эффективности фотосинтеза в уцелевших органах, а также усиление притока ассимилятов в зоны

формирования новых органов. При этом регулирующую роль выполняют фитогормоны.

**Галло- и тератогенетический барьеры** представляют собой процессы формирования галлов и тератоморф. В тех случаях, когда возбудители новообразований при питании, наряду с гидролитическими ферментами, выделяют в ткань некоторые физиологически активные вещества (триптофан, бетаиндолилуксусную кислоту и др.), растения отвечают своеобразной реакцией - пролиферацией поврежденных тканей. При этом в месте повреждения нарушается соотношение ростовых веществ, а также рост и метаболизм растений. Длительное присутствие в поврежденном органе значительных количеств ростовых веществ усиливает приток ассимилятов, что способствует ускоренному делению клеток и формированию галлов и терат. Образование галлов - результат локального повреждения определенной части растений, а паразитарные тератоморфы возникают при повреждении целого органа в начале его формирования. Среди вредителей сельскохозяйственных растений, вызывающих новообразования, можно выделить гессенскую муху, зеленоглазку, капустного скрытнохоботника, филлоксеру, а также некоторые виды клещей, тлей и нематод.

**Оксидативный барьер** основан на процессах окисления продуктов обмена веществ, повышающих защитную функцию физиологически активных соединений. Данный барьер возникает при механическом повреждении растений насекомыми с грызущим ротовым аппаратом, а также сосущими вредителями с внеполостным пищеварением. Окисление веществ вторичного обмена при повреждении клеток и тканей повышает их токсичность и усиливает антибиотическое воздействие на вредителей и др. вредные организмы. Причиной антибиотического действия оксидативного барьера могут быть и количественные изменения токсических веществ в онтогенезе растений. Оксидативный барьер исследован еще недостаточно, но на основании полученных данных очевидна его большая роль в устойчивости растений.

**Ингибиторный барьер.** В системе взаимодействия вредителей с кормовыми растениями участвуют многие физиологические механизмы, в частности, специфические белки,

включая ингибиторы пищеварительных ферментов. Вопрос о биологических функциях белков-ингибиторов еще не решен. Они могут служить регуляторами ферментативной активности самих растений, например, в процессах накопления или мобилизации запасов крахмала и клейковинных белков в онтогенезе злаков. Большинство ингибиторов растений активны лишь по отношению к экзогенным ферментам, что позволяет рассматривать их в качестве защитных факторов по отношению к вредителям, возбудителям заболеваний и другим вредным организмам. Белки, способные подавлять различные гидролазы животных, вредителей, возбудителей заболеваний, содержатся в вегетативных и репродуктивных органах высших растений различных таксономических групп (Конарев, 1984, 1987).

## **ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ВРЕДНЫХ ЧЛЕНИСТОНОГИХ С РАСТЕНИЯМИ-ХОЗЯЕВАМИ**

Круг явлений, определяющий выбор или отвергание вредителями растений для питания и откладки яиц, степень благоприятности корма и его усвояемость дает представление, с одной стороны, об особенностях пищевой специализации фитофагов, с другой - об основных факторах иммунитета растений.

В сопряженной эволюции с консументами в биоценозах основным направлением приспособительной изменчивости у растений-хозяев было развитие защитных механизмов от многочисленных биотрофов, что связано с проявляющейся их устойчивостью ко многим вредителям и возбудителям заболеваний.

Эволюция приспособления насекомых и клещей к кормовым растениям в первую очередь подчинена преодолению защитных механизмов растений - механизмов их иммуногенетических систем. Главным образом адаптация насекомых была направлена на приспособления, позволяющие наиболее рационально использовать для своей жизнедеятельности энергетические и пластические вещества кормовых растений. Это обеспечивает повышение эффективности питания

при одновременном уменьшении энергетических и вещественных затрат на поиск, добычу, захват и переваривание пищи.

Таким образом, приспособительные черты фитофагов формировались в сопряженной эволюции с растением-хозяином на фоне сложных изменений, происходящих в онтогенезе растений, в основе которых лежат физико-химические превращения энергетических и пластических веществ. В связи с этим приспособительная эволюция фитофагов была подчинена особенностям морфоанатомической конституции, характеру и темпам формирования и дифференциации различных органов и тканей растений в онтогенезе, особенностям специфики синтеза транспорта и резервирования веществ основного и вторичного обмена, т.е. своеобразию их иммуногенетических систем. В результате фитофаги приспособились потреблять определенные органы и ткани на разных этапах онтогенеза растений, что нашло свое выражение в разнообразии типов питания фитофагов и их пищевой специализации.

Применительно к фитофагам различают несколько категорий пищевой специализации (специфичности): гостальную, топическую и онтогенетическую.

Гостальная специфичность выступает как основная категория, две другие взаимосвязанные категории - как производные от нее.

**Гостальная специализация** характеризует способность фитофагов нормально существовать и развиваться лишь на хозяевах, относящихся к особым систематическим группам. Гостальная специфичность фитофагов подразделяется на три уровня специализации:

1) специализация, ограничивающая круг растений, возможных для питания, в пределах крупных таксономических групп;

2) специализация, выражающаяся в предпочтении определенных форм растений - семейств, подсемейств, триб, родов;

3) специализация, выражающаяся в предпочтении внутривидовых форм полиморфных видов растений.

Последний уровень специализации определяется факторами сортовой устойчивости растений, Следует отметить,

что общепринятое деление фитофагов на полифагов (многоядных), олигофагов (ограниченноядных) и монофагов (однойядных) по сути не отражает существования в каждой группе предпочтения определенного круга хозяев, в т.ч. внутривидовых форм. Характерно, что именно для полифагов большое значение имеют факторы, определяющие внутривидовую (сортовую) устойчивость. Так саранчовые, несмотря на многоядность, проявляют ярко выраженную избирательность относительно определенных сортов сорго и кукурузы; хлопковая тля - относительно отдельных линий дыни-кантолуны и хлопчатника.

**Топическая специализация** характеризует способность фитофагов развиваться при питании на определенных органах растений, тканях и их клеточных комплексах. В связи с этим топическую специализацию насекомых подразделяют на три уровня: органнй (оргапотропность) - приуроченность к определенным органам и их системам; тканевой уровень (гистотропность) - приуроченность к определенным тканям и их структурам и клеточный (цитотропность).

**Оргапотропность.** Из огромного количества фитофагов лишь ограниченное число видов способно питаться на всех органах растений. Большинство видов насекомых строго специализированы к определенным органам растений. Среди них выделяют следующие группы:

- 1) филлофаги - виды, питающиеся на листьях (красногрудая пъявица, картофельная и капустная совки, капустная моль и др.);
- 2) ксилофаги - виды, использующие в пищу стебли растений (стеблевые пилильщики, стеблевые совки, стеблевые долгоносики и др.);
- 3) ризофаги - виды, обитающие на корнях (проволочники, капустные мухи и др.);
- 4) антофаги - виды, использующие в пищу генеративные органы цветков (цветочный трипс и др.);
- 5) карпофаги - виды, использующие в пищу плоды и семена растений (подсолнечная огневка, гороховая зерновка, серая зерновая совка, некоторые виды клопов).

Группы видов фитофагов, повреждающих вегетативные и репродуктивные органы, вызывают изменения физиолого-

биохимических реакций растений - изменение интенсивности фотосинтеза, транспорта ассимилятов по проводящей системе, дыхания, минерального питания и других жизненно важных функций растений, в конечном итоге приводящих к снижению их продуктивности, а часто и к гибели растений.

**Гистотропность** - приуроченность фитофагов к питанию определенными тканями растений. Так, личинки злаковых мух, гусеницы капустной и картофельной моли предпочитают питаться меристематическими тканями зоны конуса нарастания растений; паутиный клещ, красногалловая тля, вязово-злаковая тля питаются столбчатой паренхимой мезофилла листа; многие виды тлей (обыкновенная злаковая, черемухово-злаковая, черная бобовая, капустная) являются флоэмососущими вредителями; личинки капустных мух используют для питания паренхимные ткани вторичной коры гипокотилия и первичной коры первого междоузлия стебля капусты; для личинок и имаго вредной черепашки и других видов хлебных клопов основным наиболее привлекательным источником питания становятся крахмалоносные ткани эндосперма зерновок злаков.

**Онтогенетическая специализация** - приуроченность фитофагов к питанию на органах растений, находящихся в определенном возрасте и морфофизиологическом состоянии. Надежность и устойчивость взаимосвязей фитофагов с кормовыми растениями обеспечиваются согласованностью в пространстве и времени определенных морфофизиологических изменений тех и других, наличием у насекомых особых типов сопряженности циклов развития с циклами развития растений-хозяев. Онтогенетическая специализация тесно связана с топической специализацией фитофагов. Приуроченность к определенным периодам развития растений, основанная на топической специализации, свойственна всем видам фитофагов; наиболее четко она выражена у специализированных вредителей. Так, например, вредная черепашка, злаковые тли связаны с кормовым растением на протяжении всего периода вегетации. Синхронизация циклов развития вредителя и кормового растения имеет большое значение для внутрестеблевых вредителей - шведских мух, гессенской мухи, зеленоглазки и др. Нарушение синхронизации развития этих вредителей с циклами развития

злаков является одним из основных механизмов устойчивости органогенетического барьера.

Приобретению фитофагами в процессе эволюции приуроченности к определенным кормовым растениям, их органам и тканям, находящимся на тех или иных этапах формирования и функционирования, способствовала необходимость преодоления барьеров иммуногенетической системы растений - морфологического (особенности строения тканей вегетативных и репродуктивных органов); ростового и органогенетического (высокая интенсивность ростовых и органогенетических процессов); атрептического (особенности атакуемости биополимеров гидролазами фитофагов); физиологического и оксидативного (наличие токсических соединений) и других барьеров.

## **ПРИНЦИПЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РАСТЕНИЙ В ИЗУЧЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР К ВРЕДИТЕЛЯМ**

При разработке методов изучения устойчивости сельскохозяйственных культур к вредителям важной составной частью является исследование сложных взаимодействий в биологической системе насекомое-фитофаг - кормовое растение. Всем видам фитофагов свойственна особая приуроченность к определенным возрастным периодам развития растений, определяемая спецификой пищевой специализации насекомых. Становление разных типов сопряженности циклов развития вредителей с циклами развития растений выражается в строгой приуроченности насекомых к использованию для питания и откладки яиц определенных видов и сортов растений, их вегетативных и репродуктивных органов и различных типов тканей - меристематических, покровных, проводящих, ассимиляционных, запасующих и др.

Для более глубокого понимания взаимодействий вредителей функциональных изменений необходимо применение особых методов исследований, в т.ч. метода биологического

контроля, онтогенеза сельскохозяйственных культур (Куперман, 1977; Шапиро, 1985; Шапиро и др., 1989). Анализ этапов органогенеза растений позволяет выявить особенности поведенческих реакций насекомых, типы повреждения ими растений, особенности патогенеза в растительных тканях, влияние абиотических условий на органообразовательные и иммунологические процессы в онтогенезе.

Жизненный цикл высших покрытосеменных растений, или онтогенез состоит из двух периодов и 12 преемственных этапов органогенеза. Первый этап онтогенеза характеризуется формированием вегетативных органов - корней, стеблей, листьев, выполняющих важнейшие функции питания, дыхания, водообмена, синтеза и передвижения веществ в организме. Второй период характеризуется формированием репродуктивных органов - соцветий, цветков, плодов и семян, т.е. выполняет функции размножения растений. По продолжительности и кратности смены вегетативного и репродуктивного периодов растения делят на две обширные группы:

1 - растения монокарпические, однократно плодоносящие в течение жизненного цикла;

2 - растения поликарпические, многократно плодоносящие в течение своей жизни.

При всем многообразии жизненного цикла различных видов, разновидностей, экологических групп, сортов и морфофизиологических типов установлен ряд общих морфологических и физиологических признаков, характеризующих онтогенез различных сельскохозяйственных культур. К их числу относятся:

1) основные фенологические фазы развития и роста растений;

2) возрастные периоды;

3) стадии развития;

4) этапы органогенеза.

Все они тесно взаимосвязаны. Наиболее полно переход от вегетативного развития к репродуктивному отражают фенологические фазы роста и развития растений и этапы органогенеза.

Фенологические фазы в жизненном цикле растений

характеризуются появлением новых органов и рядом внешних проявлений их морфофизиологических признаков. А каждый этап органогенеза характеризуется формированием определенных для данного этапа органо-генетических процессов.

Зерновые колосовые культуры (пшеница, рожь, ячмень, овес), кукуруза, сорго и другие злаки относятся к однолетним растениям. Для характеристики роста и развития злаков принято отмечать следующие фенологические фазы: 1) набухание семян; 2) прорастание семян; 3) всходы; 4) появление третьего листа; 5) кущение; 6) выход в трубку; 7) стеблевание; 8) колошение; 9) цветение; 10) молочная спелость; 11) восковая спелость; 12) полная спелость. Первая, вторая, шестая и седьмая фазы не всегда отмечаются.

### **Характеристика этапов органогенеза злаков и овощных культур**

I этап органогенеза у злаков проходит в морфологически недифференцированном конусе нарастания. При прорастании семян конус нарастания несколько увеличивается и имеет вид небольшой округлой выпуклости. Это меристематический бугорок, закрытый зачаточными листьями, число которых определяется видовыми и сортовыми признаками.

II этап органогенеза характеризуется дифференциацией конуса нарастания на зачаточные узлы и междоузлия стебля, а также образованием зачаточных стеблевых листьев. В пазухах листовых зачатков (примордиев) формируются конусы нарастания осей второго и последующих порядков, т.е. определяется степень и характер ветвления главной оси и боковых побегов. В зависимости от скороспелости сорта зерновые культуры этот этап органогенеза проходят в период IV и V фенологических фаз (появление третьего листа - кущение).

На I и II этапах органогенеза идет активный рост корневой системы растений, требующий хорошей обработки почвы и обеспеченности сбалансированными минеральными подкормками. В этот период в силу замедленного роста стебля злаки уязвимы для многих вредителей, главным образом для внутрестеблевых (злаковые мухи, в т.ч. шведские, стеблевые блохи и др.), вред могут наносить перезимовавшие поколения разных видов тлей, вредная черепашка в начале периода

"питания-созревания", из почвообитающих вредителей - проволочники и др. Обеспечение дружных, одновременно и быстро развивающихся всходов является одним из наиболее эффективных приемов повышения устойчивости к этим вредителям.

III этап органогенеза характеризуется вытягиванием и сегментацией конуса нарастания. В этот период идет закладка и дифференциация оси соцветия - колоса у пшеницы, ржи, ячменя; метелки у овса, проса, риса; початка у кукурузы. Чем благоприятнее условия для органообразовательных процессов на этом этапе, тем больше формируется сегментов на оси соцветия (зачаточных члеников колоса, метелки и початка), тем длиннее и крупнее будут репродуктивные органы растений. Определение степени развития этих параметров имеет важное значение для оценки устойчивости растений к вредителям.

IV этап органогенеза связан с формированием боковых осей соцветия - колосковых бугорков и зачаточных веточек метелок. Из каждой лопасти соцветия в последующем может развиваться один колосок у пшеницы, ржи; два - у кукурузы; три колоска у ячменя. У овса, проса, риса лопасти соцветия могут многократно ветвиться, образуя веточки разных порядков.

Растения на III и IV этапах органогенеза проходят фазы кущение-выход в трубку и начало стеблевания. Если этот период проходит в неблагоприятных условиях (недостаточная влагообеспеченность, недостаток элементов питания, высокие или низкие температуры), то число осей соцветия резко сокращается и происходит частичное их отмирание. При благоприятных условиях у пшеницы, ржи, ячменя закладывается длинный колос с большим количеством колосков; у овса, проса, риса - многократно разветвленные метелки. В этот период для злаков необходимы сбалансированные подкормки минеральными удобрениями и полив в условиях засухи. Запоздалое проведение данных мероприятий неэффективно и не способствует реализации потенциальной продуктивности растений. В этот период также можно диагностировать отличия в размерах и особенности строения 1-3 междоузлия у длинностеблевых и короткостеблевых форм пшеницы, ячменя, ржи, овса, а также прогнозировать уровень вредоносности

внутристеблевых вредителей.

V этап органогенеза характеризуется началом формирования генеративных элементов колосков - пыльцы в пыльниках; яйцеклетки в зародышевом мешке. Это начало процессов микро- и макроспорогенеза. На этом этапе определяется число цветковых бугорков в соцветии, которые дифференцируются вначале на покровные органы цветка, а затем на зачаточные бугорки тычинок и пестика. Из каждого цветкового бугорка формируется цветок (у пшеницы закладывается 3-5 цветков). Темпы роста цветков неравнозначны. Наиболее быстро зачатки покровных органов, тычинки и пестик формируются в 3 и 4 цветках. При неблагоприятных условиях прохождения этапа наблюдается "сброс" элементов продуктивности, особенно это касается верхних цветков. Наличие в соцветиях разных по степени развития плодоеlementов способствует возможности использования их в пищу вредителями (разные виды тлей - обыкновенная злаковая, розанно-злаковая, ячменная, клопы, серая зерновая совка, второе поколение зеленоглазки и др.), а иногда возможно развитие нескольких поколений поливольтинных видов вредителей за счет одного соплодия - колоса, метелки. Обеспечение сбалансированных подкормок минеральными удобрениями в условиях хорошей влагообеспеченности в этот период создает предпосылки для формирования плотного колоса и снижает вредоносность питающихся на нем насекомых - тлей, клопов, зерновой совки и др.

VI этап органогенеза. Этот этап проходит в трубке, внутри стебля. Он характеризуется формированием пыльников, тычинок и завязи пестика. Наряду с процессами микро- и макроспорогенеза происходит усиленный рост средних междоузлий побега. Для формирования фертильной пыльцы в этот период большое значение имеет хорошая обеспеченность растений влагой и интенсивное солнечное освещение.

VII этап органогенеза характеризуется завершением формирования генеративных элементов цветка. На этом этапе начинается интенсивный рост члеников соцветия, покровных органов цветка и верхнего междоузлия стебля. В этот период могут наносить вред такие фитофаги как шведская муха, личинки

второго поколения зеленоглазки, тли, ячменный минер, кукурузный мотылек и др.

VIII этап органогенеза фенологически отмечается как фаза колошения.

IX этап органогенеза - период цветения, оплодотворения, образование зиготы.

Сортовые особенности прохождения V-IX этапов органогенеза во многом определяют возможности питания хлебного клопика, личинок младших возрастов вредной черепашки, пустоцветного трипса на зерновых культурах: гусениц младших возрастов кукурузного мотылька и кукурузной тли на кукурузе и сорго.

X этап органогенеза характеризуется формированием плодов, типичных для разных видов и сортов злаков. На этом этапе определяется возможность повышения урожая за счет увеличения размеров зерновки.

XI этап органогенеза характеризуется накоплением питательных веществ в зерновках. Фенологически этот период отмечается как фаза молочной спелости.

XII этап органогенеза - превращение накопленных питательных веществ в зерновках в запасные, специфические для каждого вида (сорта) злаков. Фенологически этот этап совпадает с фазой восковой спелости и завершается полной спелостью семян.

В период прохождения X-XII этапов органогенеза наиболее опасными для зерновых культур видами фитофагов являются хлебные клопы. Особенность их взаимодействия с этими культурами определяется онтогенетической специфичностью, органо- и гистотропностью, которые обусловлены организацией пищеварительно-транспортного конвейера клопов. Так, клопы-слепняки и хлебный клопик приурочены к питанию на X-XI этапах органогенеза, их питание преимущественно осуществляется на колосовых, цветочных чешуях и формирующейся зерновке до наступления молочно-восковой спелости. Вредная черепашка питается на колосе вплоть до наступления полной спелости. При этом личинки младших возрастов появляются на X этапе органогенеза, питаются на колосовых чешуях, а личинки старших возрастов и молодые

клопы активно используют для питания зерновки от молочно-восковой до полной спелости. Сорты зерновых культур, характеризующиеся ускоренным прохождением наиболее критических этапов органогенеза, менее повреждаются хлебными клопами. В этот период вред посевам зерновых культур может наносить большая злаковая тля; посевам кукурузы и сорго - черемухово-злаковая и бересклетовая тли, в некоторые годы - кукурузная, большая злаковая, обыкновенная злаковая виды тлей.

Огурец. Для этой культуры принято отмечать следующие фенологические фазы: 1) прорастание семян; 2) всходы; 3) ветвление; 4) цветение; 5) завязывание плодов; 6) рост и созревание плодов. Огурец характеризуется интенсивным побегообразованием. Исходя из этого, следует отметить, что при усиленном ветвлении главного и боковых побегов конусы нарастания могут находиться в пазухе каждого листа и на верхушке каждой ветви. В пазухе листьев разных ярусов конусы нарастания побега могут быть в разном состоянии развития. При этом этапы органогенеза растений определяются следующим образом:

I-VIII этапы в верхушечной почке главного побега;

IX-XII - в конусе нарастания побегов среднего яруса.

Капуста. Это двулетняя культура. На первом году жизни растения формируют вегетативные органы и проходят лишь I и II этапы органогенеза. Полный жизненный цикл характеризуется следующими фенологическими фазами: 1) прорастание семян и появление всходов; 2) начальный рост розетки и корней; 3) накопление листовой массы и дальнейшее развитие корневой системы; 4) образование используемых органов; 5) образование соцветий; 6) цветение; 7) плодообразование и созревание семян (Лизгунова, 1965). Для выявления особенностей взаимодействий капусты с основными вредителями и определения типов сопряженности циклов развития фитофагов с циклами развития растений проведено более детальное изучение первого периода онтогенеза – второй, третьей и четвертой фенологических фаз. В пределах четырех фенологических фаз выделены подфазы: 5-6 листьев; 7-11 листьев; розетка из 11-14 листьев, образование кочана; уплотнение кочана; техническая спелость.

Последовательность прохождения этапов органогенеза

капусты на первом году жизни следующая.

I этап органогенеза - жизнь семян до их прорастания; конус нарастания не дифференцирован.

II этап органогенеза - период после всходов и до начала дифференциации верхушечного конуса нарастания при переходе растений от вегетативного в репродуктивное состояние. Этот этап длительный. Конус нарастания дифференцируется на листовые зачатки, укороченные междоузлия стебля и пазушные почки. В стеблях и в специальных для разных видов капусты органах запаса накапливаются питательные вещества. Этот этап органогенеза определяется по состоянию конуса нарастания в центре розетки листьев.

Наиболее вредоносными экономически значимыми видами вредителей капусты являются капустные мухи, приуроченные к питанию в период от появления 5-6 листьев до образования розетки листьев; из чешуекрылых вредителей - капустная моль, капустная и репная белянки, гусеницы которых питаются на растениях от фазы 7-9 листьев до фазы уплотнения кочана, а на раннеспелых сортах - даже в фазу технической спелости кочана.

Морковь. Эта культура также относится к двулетним растениям. В течение первого года жизни формируется корнеплод, растения в этот период находятся на I этапе органогенеза; на второй год образуются сложные соцветия и семена, растения проходят II-XII этапы органогенеза. В связи с такими особенностями жизненного цикла моркови в первый год жизни гистогенез конуса нарастания отличается интенсивностью темпов и ритма деления клеток различных меристематических зон. При этом наиболее интенсивной органообразовательной деятельностью характеризуются клетки периферийной зоны конуса нарастания, участвующие в образовании проводящих тканей, и клетки центральной стержневой меристемы, дающие начало основной паренхиме и центральному цилиндру корнеплода. В первый год жизни у моркови различают следующие фенологические фазы: 1) всходы (вилочка); 2) 1-2 настоящих листа; 3) 3-4 настоящих листа; 4) 5-6 настоящих листьев; 5) начало образования корнеплода; 6) интенсивное нарастание корнеплода; 7) техническая спелость корнеплода (Асякин; 2002). Для моркови в этот период наиболее опасными

вредителями являются морковная листоблошка, проявляющая наибольшую вредоносность в фазу 1-2 настоящих листьев, и морковная муха, приуроченная к питанию в фазу от 5-6 листьев до интенсивного нарастания корнеплода.

# ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

## Тема 1 МЕТОДЫ УЧЕТА РЕЗУЛЬТАТОВ ЗАРАЖЕНИЯ

Оценка устойчивости растений проводится по учетам результатов заражения растений, о котором судят по следующим трем показателям: а) внешним признакам проявления реакции растения на заражение патогеном; б) интенсивности проявления болезни; в) потерям урожая от болезни.

**Тип реакции на заражение.** Это качественный показатель, характеризующий реакцию растительной ткани на внедрение в нее патогена и дальнейшее его развитие. Обычно отмечают два типа реакции: наличие симптомов нормального патологического процесса, присущих конкретному заболеванию культуры; отсутствие таких симптомов. Но существуют болезни, симптомы которых проявляются не двумя альтернативными признаками, а более разнообразно. Это наглядно демонстрируют разработанные исследователями шкалы иммунности по отношению к ряду заболеваний. Так, Стэкмен и Левин для установления типов устойчивости пшеницы к стеблевой ржавчине предложили следующую шкалу (таб. 1).

Аналогичная шкала для оценки иммунности пшеницы к бурой листовой ржавчине была предложена Т.Д. Страховым, только число градаций в его шкале не 7, а 5. Аналогичные группировки на типы реакции имеются в отношении многих заболеваний, вызываемых чаще облигатными паразитами (мучнистая роса, милдью винограда, рак картофеля, кила капусты и др.).

### **Интенсивность поражения**

Это количественные показатели, которые характеризуют степень восприимчивости сортов и гибридов, о которой судят по числу пораженных растений или их органов, а также по интенсивности проявления заболевания у каждого учтенного растения.

Болезни, поражающие все растение или значительную его часть (черная ножка картофеля, головневые болезни злаковых, кила капусты, трахеомикозы и др.), оценивают по числу пораженных растений без определения интенсивности развития

заболевания. При этих болезнях поражение растений носит системный характер.

Таблица 1 - Шкала Стэкмена и Левина для оценки типа иммунности

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

Для учета устойчивости к локальным заболеваниям, при которых каждое пятно, язва, пустула, загнивающая область и т. п. возникают в результате индивидуального заражения, применяют шкалы или эталоны. Поражаемость обычно оценивают по 5-балльной шкале, причем каждому баллу соответствует определенная степень развития данных болезней. Эталон, характеризующие интенсивность поражения, составляют в виде гербарных образцов или рисунков, отражающих различную степень поражения. Учет поражаемости при помощи эталонов часто проводят на основе установления интенсивности поражения не всего растения, а отдельных его органов или их части. У растений много листьев, и анализ всех требует больших затрат времени и труда. Поэтому ограничиваются анализом среднего образца, а в методике учета обязательно указывают, какие листья

подлежат учету. Например, при оценке устойчивости пшеницы к бурой листовой ржавчине учет интенсивности поражения проводят в фазе молочной спелости, а для среднего образца отбирают 1-й и 2-й лист каждого учтенного стебля.

Зерновые на устойчивость к корневым гнилям оценивают по 5-балльной шкале. В таблице 2 приведены признаки поражения зерновых четырьмя видами корневых гнилей, соответствующие каждому баллу шкалы.

Таблица 2 - Шкала интенсивности поражения зерновых корневыми гнилями

Балл	Виды гнили			
	фузариоз	гельминтоспориоз	церкоспореллез	офиоблез
0	Признаки поражения отсутствуют			
1	На первичных и вторичных корнях видны отдельные участки бурого цвета	На основании стебля или его подземной части видны бурые штрихи или узкие полосы	На основании стебля или первом междоузлии видны отдельные белесоватые или светло-коричневые пятна	На основании стебля и корнях видны темные одиночные штрихи
2	Основание стебля белесое или слегка бурое, отдельные корни или значительные участки их бурые	На основании стебля и его подземной части видны коричневые полосы, охватывающие более половины поверхности пораженного органа	Темные желтовато-коричневые пятна с ярко выраженной темной каймой охватывают до половины стебля	Основание стебля буроватое с многочисленными черными полосами и пятнами, корни частично отмерли
3	Основание стебля темное с перехватом, большая часть корней отмерла	Сплошное побурение первого стеблевого и подземного междоузлий	Пятна окольцовывают стебель, в середине пятна ткань частично разрушена, стебель переламывается	Основание стебля бурое, покрытое углистым налетом, корни наполовину отмерли
4	Отсутствие продуктивных стеблей при наличии симптомов соответствующих баллу 3			

На рисунке 1 дана шкала оценки степени поражения растений разными видами грибов, вызывающих корневые гнили, а на рисунках 2-3 — шкалы для оценки степени поражения злаковых зерновых мучнистой росой, ржавчиной и септориозом.

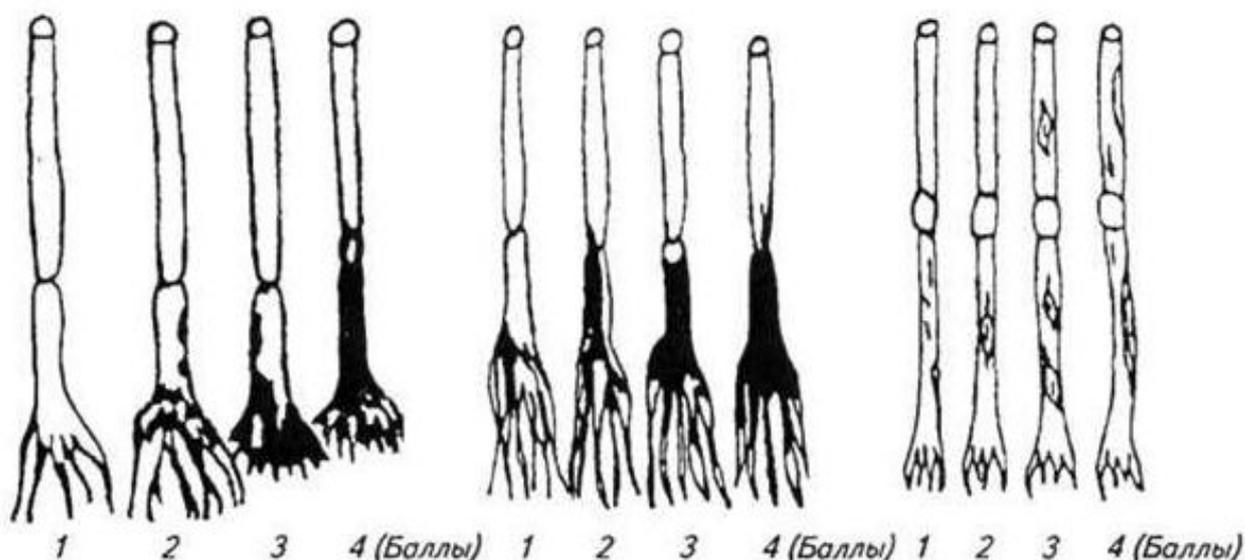


Рисунок 1 – Типы проявления и шкалы оценки степени поражения растений разными видами грибов, вызывающих корневые гнили

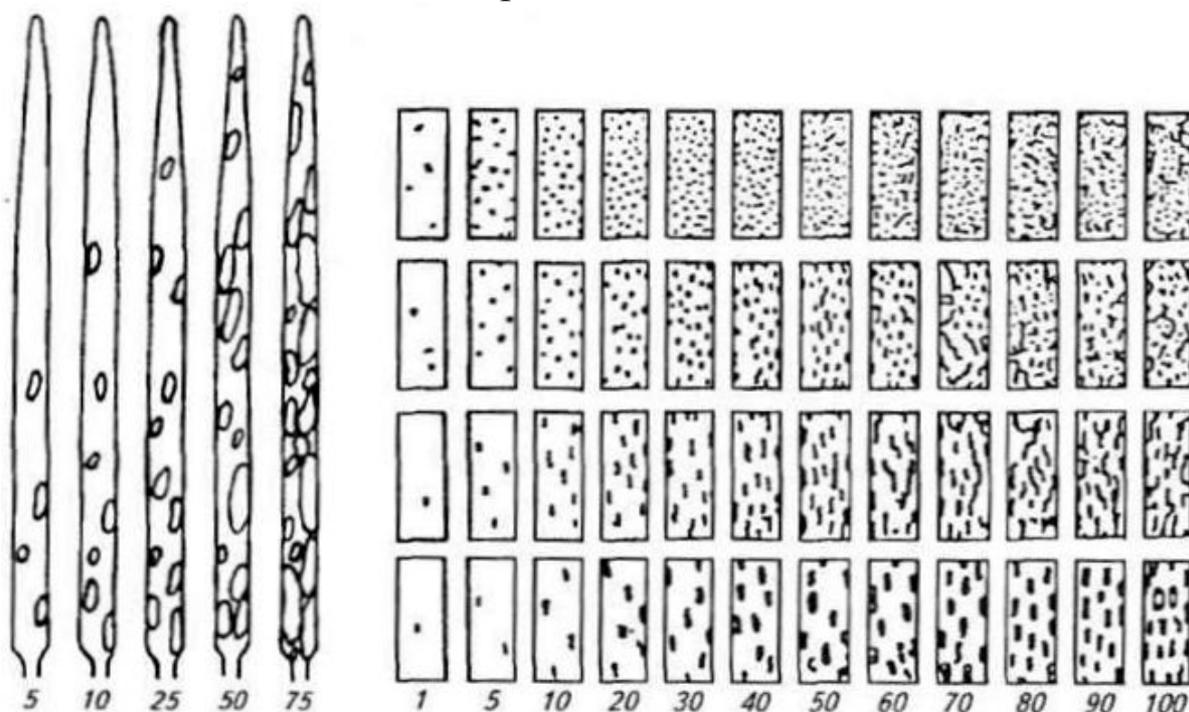


Рисунок 2 - Шкала оценки степени поражения листьев и листовых влагалищ злаков мучнистой росой, %

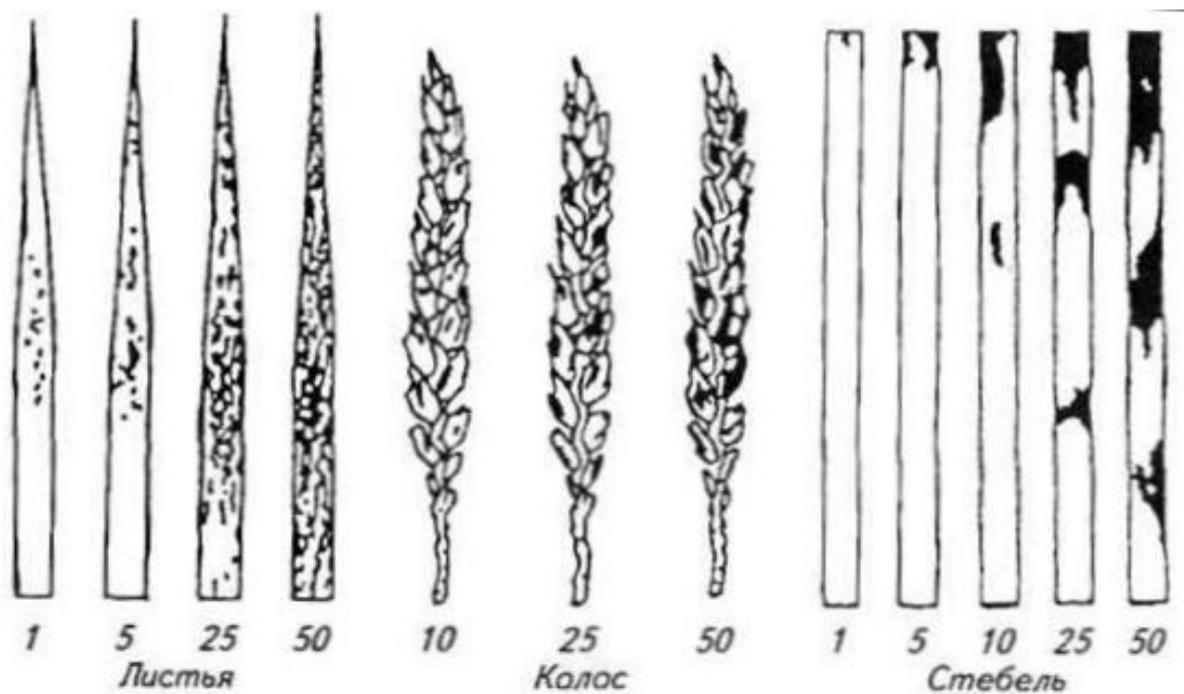


Рисунок 3 – Шкалы для оценки поражения зерновых культур септориозом, %

Учет поражения растений болезнями осуществляют визуально и обрабатывают статистически. При визуальном учете исследователь осматривает оцениваемые растения и сразу проставляет процент поражения или балл ( $r$ ).

При статистическом учете оценивают по баллам каждое учтенное растение или его орган, а затем по формуле (1) рассчитывают средний показатель развития болезни:

$$P = \frac{(r \cdot b) \cdot 100}{n \cdot e} \quad (1)$$

где:  $P$  — развитие болезни;  
 $r \cdot b$  — сумма произведений числа растений на соответствующий им балл;  
 $n$  — общее число учтенных растений;  
 $e$  — высший балл применяемой шкалы.

### **Выносливость**

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

показателем устойчивости растений. Для выявления выносливости необходимо подсчитать урожайность изучаемого сорта на искусственном инфекционном фоне и без него при прочих одинаковых условиях окружающей среды. Часто выносливость приходится учитывать при отсутствии на растениях четких симптомов заболевания, которое впоследствии сказывается на его урожайности, например, щуплость зерновок и отсутствие их в некоторых колосках при головневых заболеваниях, корневых гнилях, частичное увядание или усыхание ветвей и т. п.

### **Методы учета устойчивости к вирусным и бактериальным болезням**

При оценке устойчивости растений к вирусным и бактериальным болезням часто приходится прибегать не только к визуальному, но и к более тонким и сложным методам оценки поражаемости. Это связано с особенностями патологического процесса при вириозах и бактериозах: визуально наблюдаемые симптомы появляются далеко не на начальных этапах процесса заражения.

Однако визуальную оценку необходимо проводить только при наличии четко проявляющихся симптомов, присущих определенному заболеванию. Кроме того, исследователь должен предвидеть их возможные изменения под влиянием меняющихся условий внешней среды. Визуально наблюдаемые симптомы некоторых вирусных заболеваний очень сходны с признаками неинфекционных болезней, связанных с нарушениями минерального питания растений. Все это вынуждает прибегать к другим методам диагностики заболевания, которые детально описаны в курсах «Общая фитопатология», «Вирусология» и «Микробиология».

Метод вирусных включений основан на способности ряда вирусов образовывать в растительных тканях кристаллы, которые можно наблюдать с помощью светового микроскопа.

Метод электронной микроскопии позволяет увидеть в зараженном растении вирусные частицы и по их форме и размерам диагностировать наличие конкретного вирусного заболевания.

Метод индикаторных растений основан на свойстве

некоторых растений реагировать на заражение определенными вирусами комплексом патологических процессов, приводящих к появлению строго специфичных некротических пятен.

Метод питательных сред используют для идентификации именно тех видов бактерий, которые вызвали заражение. На стерильные агаризованные среды высевают бактерии, выделенные из пораженных растительных тканей и после появления колоний фиксируют многочисленные признаки, присущие конкретному бактериальному патогену (характер роста колоний, их цвет, консистенцию, биохимические особенности).

Серологический метод — наиболее точный и быстрый способ определения вирусных и бактериальных болезней, протекающих в скрытой форме. Он основан на антигенных свойствах возбудителей болезней: при введении в кровь животного белков вирусов или чистых культур бактерий в ней появляются (как ответная реакция) специфичные антитела.

Серологический метод имеет несколько модификаций: капельный метод; метод двойной диффузии в агаровом геле; иммуноферментный анализ (ИФА).

## **Лабораторная работа № 1**

### **ОЦЕНКА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ**

**Задание 1.** Провести оценку различных сортов пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине по степени поражения и степени иммунности с использованием соответствующей комбинированной шкалы Т.Д. Страхова.

*Материалы и оборудование.* Гербарный материал или свежий сбор листьев различных сортов пшеницы, шкала иммунности Страхова.

#### *Методика выполнения работы*

Для одновременного определения степени устойчивости и интенсивности поражения Т.Д. Страховым предложена комбинированная шкала, которая состоит из двух частей: описания признаков, характеризующих цифровые показатели типов иммунности и балла иммунности (таб. 3).

Таблица 3 – Комбинированная шкала определения степени устойчивости и интенсивности поражения по Т.Д. Страхову

Обозначение иммунности	Описание признаков, характеризующих цифровые показатели типов иммунности (по Т.Д. Страхову)
0	Отсутствие признаков иммунности. Пустулы ржавчины крупные, бархатистые, легко порошачиесь, хорошо раскрываются при созревании. Эпидермис листа при созревании пустул легко разрывается и обычно хорошо заметен по краям пустул в виде прозрачных пленок. Обесцвечивание ткани вокруг пустул обычно отсутствует.
1	Восприимчивые сорта. Пустулы мельче, чем в предыдущем типе, нередко собраны группами. Большинство пустул обычно вскрывается, а часть пустул не в состоянии прорвать эпидермис. В местах скопления пустул ткань листа обесцвечивается (хлоротические зоны в местах скопления пустул).
2	Сорта ниже средней устойчивости Пустулы мелкие, рассеянные по поверхности листа. Некоторые пустулы вскрываются, другие же (большинство) не могут прорвать эпидермис. Вокруг пустул хорошо заметны обычно округлые зоны обесцвеченной части листа.
3	Сорта средней устойчивости. Пустулы очень мелкие, рассеянные по поверхности листа (как в предыдущем типе), но, как правило, даже не вскрываются и уредоспоры в них часто недоразвиты. Наряду с недоразвитыми пустулами, скрытыми в ткани листа, имеются разной формы и величины светлые пятна (места внедрения гриба). Вокруг недоразвитых пустул в местах заражения хорошо заметны зоны светлой или светло-желтой ткани листа (некрозы).
4	Устойчивые сорта. Полное отсутствие пустул гриба. Места заражения обнаруживаются лишь по мелким обесцвеченным участкам листа (мелкая точечность, явление хлорозов и некрозов). Высший тип иммунности. Некрозы могут вовсе отсутствовать. Высокоустойчивые (иммунные) сорта.

Полное отсутствие иммунитета к бурой ржавчине

обозначается цифрой 0. Высшая степень иммунитета проявляется в виде мелких светлых пятен или некрозов, рассеянных по листовой пластинке. Такая степень иммунности обозначается цифрой 4. Между этими двумя вариантами располагаются листья с различной градацией иммунитета, обозначаемые цифрами 1,2,3. При этом, чем выше иммунитет, тем больше цифра, отражающая это свойство. Шкала иммунности может быть использована при оценке сортов пшеницы на устойчивость к ржавчине, для учета изменений сортового иммунитета при селекционной работе, а также при оценке влияния природных условий и агротехнических факторов на изменение характера поражаемости растений ржавчиной. Эта шкала основана на качественных различиях, поэтому в ней не учитывается число пустул на листе. Для этой цели служит шкала поражения по степени пораженности и по степени иммунности (таб. 4).

Первый ряд цифр под шкалой обозначает условную степень поражения листьев ржавчиной в процентах, а второй – действительную площадь, покрытую пустулами. Принимая максимальное поражение за 100% (при фактической занятости пустулами ржавчины 40% площади листа), можно условными цифрами выразить и остальные показатели степени покрытия пустулами листовой пластинки. Эти цифры стоят в первом ряду под шкалой. Степень поражения определяют не путем подсчета пустул, а путем сравнения поражения листа с тем или иным, более подходящим для данного случая, показателем шкалы.

Степень пораженности и иммунности обозначается в виде дроби: в числителе пишется показатель иммунности, в знаменателе - пораженность. Так, например, при анализе 100 листьев сорта пшеницы получены следующие результаты (таб. 4).

Расчет ведется по формуле (А х В),

где А - балл или % повреждения;

В - число больных листьев с соответствующей им степенью.

Средний балл иммунности ( $B_{и}$ ):

$$B_{и} = (0 \times 0) + (1 \times 10) + (2 \times 10) + (3 \times 30) + (4 \times 50) : 10 = 3,2.$$

Аналогично рассчитывается средняя степень пораженности.

Характеристика образца по степени иммунности и пораженности равна 3,2, что соответствует устойчивому сорту.

Таблица 4 - Учет поражения пшеницы бурой листовой ржавчиной по степени пораженности и по степени иммунности

Сорт, образец	Кол-во анализируемых листьев (шт)	В том числе больных листьев											Характеристика образца
		Со степенью иммунности, балл					Со степенью пораженности, %						
		0	1	2	3	4	5	10	25	45	65	100	
№ 15	100	0	10	10	30	50	70	20	10	0	0	0	$\frac{3,2}{9}$

**Задание 2.** Изучить влияние нагрузки спор на одно зерно на количество зараженных головней проростков различных сортов овса.

#### *Материалы и оборудование*

Микроскопы, предметные и покровные стекла. Окулярные микрометры. Пробирки простые и центрифужные, чашки Петри с увлажненным песком. Центрифуга. Колба с водой, колбы с заспоренными семенами (0,1; 0,01), пипетки. Разборные доски, шпатели. Красители: метиленовая синь, родамин С8. Бюксы с 70%-ным спиртом.

#### *Методика выполнения работы*

Для заспорения семян различных по устойчивости сортов головни овса в количестве 1% и 0,1% от веса семян заливают водой из расчета 200 см<sup>3</sup> на 1 кг семян. Этой суспензией замачивают семена на 24 часа. Вода впитывается семенами при их набухании, и споры попадают под пленки в большом количестве, чем при заспорении сухими спорами. После этого семена высевают в чашки Петри во влажный песок (по 50 семян). Чашки Петри помещают в термостате при температуре 17-18°C. Когда всходы достигают 0,5-1,0 см снять coleoptile с каждого варианта в отдельные бюксы с 70%-ным спиртом. Для определения зараженных возбудителем coleoptile закрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом. В

зараженных колеоптите видны гифы интенсивной синей или розовой окраски. Результаты подсчета заносятся в таблицу 5.

Таблица 5 - Влияние величины инфекционной нагрузки на зараженность семян овса хламидоспорами головни

Степень заsporения семян в процентах от их веса	Количество просматриваемых сортов овса	Из них с мицелием головни по сортам	Процент зараженности по сортам
0,01			
0,1			
1,0			

Таким же методом можно провести оценку сортов проса на устойчивость к головне.

## **Лабораторная работа № 2** **ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К** **ВРЕДИТЕЛЯМ**

У зерновых культур в ходе длительной, естественной, а затем целенаправленной селекции сформировалась специфическая функциональная организация иммуногенетической системы, в которой в качестве главных механизмов, ограничивающих жизнедеятельность вредных организмов, наибольшее значение имеют архитектура растений и их морфофизиологические свойства. Эти свойства растений в основном определяются морфологическим, атрептическим, ростовым, органогенетическим и ингибиторным барьерами иммуногенетической системы злаков. Меньшее значение имеют механизмы физиологического и оксидативного барьеров, поскольку их иммунологические функции чаще всего реализуются у злаков на ранних этапах органогенеза. Среди физиологически активных веществ наибольшее

иммунологическое значение имеют флавоноиды, в т.ч. бензоксазолиноны - МБОА и его агликон ДИМБОА, неспецифические функции которых направлены против неблагоприятных биотических и абиотических факторов.

Среди вредителей зерновых культур наиболее вредоносны сосущие, скрытностеблевые фитофаги, из которых можно выделить основные группы, отличающиеся специфической органотропностью. Это виды, питающиеся меристематическими тканями (шведские мухи, гессенская муха и другие виды злаковых мух, тлей); виды, питающиеся сформировавшимися репродуктивными органами (вредная черепашка и другие виды хлебных клопов); наименьшую по численности группу составляют виды, питающиеся на сформировавшихся вегетативных органах (пьявица, пилильщики).

Методы изучения и оценки устойчивости основываются на знании биологических особенностей и поведенческих реакций того или иного вредителя; особенностей роста и развития растений и их реактивности на повреждение; взаимосвязей растений и фитофагов в определенных экологических условиях.

### **Шведские мухи**

Зерновые культуры повреждают два вида шведских мух - овсяная (*Oscivvlla frit* L.) и ячменная (*Oscinclln pusilla* Meig.). Овсяная муха гигрофильна и более вредоносна в районах возделывания хлебных злаков с влажным климатом. Она развивается на овсе, ржи, пшенице, ячмене и кукурузе. Ячменная муха более теплолюбива, поэтому зона ее распространения находится южнее, в районах с засушливым климатом.

Она является более узким олигафагом, предпочитает ячмень, но живет и на других зерновых культурах, кроме овса. Вместе с тем, в некоторых районах страны, в т.ч. на Северо-Западе РФ, оба вида мух встречаются совместно.

Зимуют взрослые личинки в стеблях озимых культур и диких злаков. Малоснежный покров и температура ниже минус 30°C – факторы снижения численности зимующих насекомых. Весной личинки, не приступая к питанию, окукливаются.

Начало вылета первой генерации шведских мух в Ленинградской области 12-13 июня, в Московской области - 3-18

мая, в Краснодарском крае – во второй половине апреля – начале мая. Мухи дополнительно питаются 10-14 дней нектаром и пылью цветов, пасокой трав. Шведские мухи преимущественно откладывают яйца на молодые растения, имеющие не более 2-3 листьев. Наиболее предпочитаемые места откладки яиц – части растений, близко расположенные к конусу нарастания – колеоптиле и влагалище первого листа. В дождливую и прохладную погоду мухи откладывают яйца в более защищенных местах - на стебли у поверхности почвы или на почву. Эволюционно сложилась довольно строгая приуроченность личинок к питанию тканями зоны конуса нарастания побега в центрах формирования апикальной (верхушечной) меристемы. Условия для завершения цикла питающейся фазы вредителя создаются только при строгой синхронизации в развитии личинок и повреждаемых ими органов растений. Личинки должны проникнуть в побег на ранних этапах органогенеза, когда ростовые и органообразовательные процессы замедлены, а питательные вещества в них преимущественно находятся в простых формах. Личинка, внедряясь в растение, проходит через влагалища 2-х и более листьев и через слабо сформировавшиеся листья, облегающие конус нарастания. Потребление личинкой собственно апикальной меристемы отмечается только в начале питания. Все остальное время личинка питается несколько выше конуса нарастания и использует в пищу зачаточные листья. Освоение растительных тканей как среды обитания стало возможным с развитием у личинок внекишечного пищеварения при помощи ферментов, выделяемых слюнными железами. Выделение пищеварительных ферментов приводит к обширному лизису клеток и тканей в зоне питания, в результате формируется так называемая физиологическая капсула, которая стабилизирует условия жизни личинки внутри стебля. Пищеварительные ферменты приостанавливают рост и развитие растения, что способствует нормальному завершению развития личинки и ее окукливанию в отмирающем стебле. В случае совпадения уязвимой фазы растения и агрессивной фазы вредителя происходит полное разрушение конуса нарастания внутри стебля. Внешнее проявление повреждения - усыхание центрального листа. При более позднем проникновении личинки шведской

мухи к конусу нарастания, когда он уже разросся и прошел первые этапы дифференциации, наблюдается частичное уничтожение точки роста. Поврежденные растения в данном случае формируют неполный, часто деформированный колос или метелку.

Реакция растений на повреждение стеблей шведской мухой зависит от их возраста. Чем моложе растение, тем оно более чувствительно к повреждению. При повреждении главного стебля молодое растение погибает или снижает урожай более чем на 50%, уменьшая количество зерен в колосе на 36-66,9%. Повреждение боковых стеблей не вызывает резких потерь урожая. Считают, что гибель до 40% подгона (непродуктивных стеблей) не причиняет вреда. Чем раньше погибает подгон, тем больше питательных веществ и влаги будет использовано оставшимися стеблями. Личинки летнего поколения *O. pusilla* развиваются в стеблях подгона культурных растений и диких злаков, а *O. frit* - в колосках овса и ячменя, где личинки питаются эндоспермом и зародышем зерна, становясь щуплым к моменту окукливания вредителя. В зависимости от зоны шведские мухи дают от 2 до 5 поколений в год.

Ведущими факторами устойчивости колосовых зерновых культур к шведским мухам являются разная способность выбора ими кормовых растений в период откладки яиц, неблагоприятное воздействие растений на вредителей, которое ограничивает выживаемость личинок, снижает их размеры, массу и другие показатели физиологического состояния особей, а также способность отдельных образцов к быстрому формированию новых продуктивных побегов взамен погибших.

### **Механизмы устойчивости**

**Органогенетический барьер.** Ускоренное прохождение сопряженных с видами вредителей этапов органогенеза растений. При раннем посеве яровых зерновых культур всходы успевают пройти критическую фазу (2-3 листа) до начала массового лета мух. Поскольку самки откладывают яйца не на главный стебель, а на боковые, вредоносность мух в этом случае значительно снижается, что в меньшей степени сказывается на общем состоянии растений.

Ростовой барьер. Быстрый рост растений с интенсивным разворачиванием листьев. Самки предпочитают откладывать яйца на медленно растущие части растений. При откладке яиц на быстрорастущие части растений они за период инкубации оттесняются от зоны конуса нарастания на значительное расстояние, при этом отродившиеся личинки вынуждены питаться дифференцированными тканями (неблагоприятный корм) уже развернувшихся листьев, что отрицательно сказывается на их физиологическом состоянии. Часть личинок при этом погибает, часть не проходит полного цикла развития.

Морфологический барьер. Сомкнутая прямостоячая форма куста с продуктивной кустистостью не более 3,2. Плотные прилегающие к стеблю листовые влагалища, создающие прямостоячую форму куста, не привлекают вредителей для откладки яиц. Развалистая форма куста с короткими листовыми влагалищами более предпочитаема мухам. Большое значение при этом имеют микроклиматические условия (освещенность, температура, влажность), создаваемые на посевах зерновых культур различными формами куста, что сказывается на их заселенности шведскими мухами. Узкий опушенный лист с плотно прилегающим к стеблю коротким влагалищем, плотным расположением в нем проводящих пучков и плотным расположением кремниевых включений между жилками. Совокупность действия этих механизмов создает неблагоприятные условия как при откладке яиц, так и при питании личинок.

Физиологический барьер. Наличие в растениях физиологически активных веществ - полифенолов, оказывающих неблагоприятное воздействие на физиологическое состояние личинок. Хемотаксисы шведских мух исследованы недостаточно.

Атрептический барьер. Структура основных биополимеров листа и их транспортных форм, стероохимически несоответствующая пищеварительным ферментам мух, затрудняет питание личинок.

### **Полевые методы**

При благоприятных условиях температуры и влажности воздуха шведские мухи могут размножиться в массе (часто наблюдается в Северо-Западном регионе). Это дает возможность

проводить оценку устойчивости на естественном фоне. В случаях недостаточной численности вредителей для оптимальной оценки устойчивости используют провокационный фон. Для его создания проводят ранний обсев опытного участка озимыми культурами - пшеницей или рожью, привлекающими имаго, и проводят их скашивание в период массового лета вредителей. Механизмом привлечения мух в этот период являются сладкие выделения скошенных культур - пасока. Каждый образец для оценки устойчивости высевают на 2-8-метровых рядах в 3-4-кратной повторности.

Избираемость растений шведскими мухами оценивают весной в период откладки яиц, когда растения находятся в фазе 3 листьев. Учеты яиц проводятся ежедневно в течение 10 суток в одно и то же время. Всего анализируют 100 растений по каждому образцу. Растения при этом вырывают с комом земли и помещают в пакеты. В условиях лаборатории вначале учитывают количество яиц, отложенных на растения, затем проводят учет количества яиц, отложенных на почву, методом флотации. Для этого почву помещают в насыщенный раствор сернокислого магния и проводят подсчет яиц, всплывших на поверхность раствора.

Степень устойчивости оцениваемых образцов определяют: 1) по количеству яиц, отложенных на растения; 2) показателями поврежденности растений на начальных этапах органогенеза в фазу кушения-выхода в трубку; 3) по наличию колосоносных стеблей или по соотношению продуктивных и непродуктивных стеблей в период выколашивания растений; 4) по численности вредителей в поврежденных стеблях; 5) по показателям их физиологического состояния - массе личинок, пупариев и их размерных характеристик.

Анализ на поврежденность шведскими мухами проводят по пробам (100 растений по каждому образцу). Учитывают процент поврежденных и погибших растений и стеблей. При обнаружении внутри стебля или за влагалищем листа вредителя или его повреждений, стебель или куст относят к числу поврежденных. Если стебель засох, то его относят к числу погибших. К числу погибших относят и те растения, у которых в результате повреждения погибли все стебли.

Степень поврежденности растений оцениваемых образцов определяют по 4-балльной шкале (таб. 6).

Таблица 6 – Шкала устойчивости зерновых по степени поврежденности растений оцениваемых образцов

Баллы	Поврежденность стеблей	Степень устойчивости
1 балл	поврежденных стеблей менее 10%	образец устойчив
2 балла	поврежденных стеблей 10-25%	образец среднеустойчив
3 балла	поврежденность стеблей 25-50%	образец слабоустойчив
4 балла	поврежденных стеблей более 50%	образец неустойчив

По наличию колосоносных стеблей на единице площади оцениваемые образцы также группируют по баллам, пользуясь той же шкалой. Иногда не ограничиваются визуальной оценкой и проводят подсчет колосоносных стеблей на пробных площадках.

В итоге вычисляется средний балл, характеризующий степень устойчивости оцениваемых образцов.

На ячмене, овсе и пшенице, особенно в южных районах их выращивания, в период молочной спелости проводят учет поврежденности зерен в колосьях или метелках. Повреждения колосьев или метелок шведскими мухами определяют двумя способами:

- помещением колосьев или метелок в садки с подсчетом количества вылетевших мух;

- подсчетом поврежденных зерновок в колосе или метелке.

Этот способ более трудоемкий, но не требует выведения мух. Для этого обмолачивают зерна из 16 колосьев или метелок каждого образца, взятых по одному с каждого рядка. Зерна вскрывают, подсчитывается число и процент поврежденных зерен от общего количества вскрытых.

**Лабораторные методы.** Определение устойчивости зерновых культур к шведским мухам по количеству листовых слоев в конусе нарастания.

Устойчивость зерновых культур к шведским мухам во многом определяется характером облепания листьями конуса нарастания. Быстрота проникновения личинок мух к конусу нарастания зависит от темпов роста растений и внутреннего строения побегов, мощности, количества листьев и листовых слоев, окружающих конус нарастания. Заложение и разрастание листьев происходит неодинаково, поэтому по внешнему виду растений нельзя судить о внутреннем строении. При равном количестве уже развернувшихся листьев число зачаточных листьев и листовых слоев, окружающих конус нарастания, оказывается различным. У наиболее устойчивых форм наблюдается большее количество, а также более плотное прилегание листовых слоев в конусе нарастания, чем у менее устойчивых образцов как по длинному, так и по короткому диаметру стебля. При большом количестве листовых слоев личинкам часто не удается попасть к конусу нарастания и в результате роста стебля, выдвижения и разворачивания листьев они оттесняются из зоны конуса нарастания и выбрасываются из растения.

**Задание 1.** Определение устойчивости зерновых культур к шведским мухам по количеству листовых слоев в конусе нарастания.

*Материал и оборудование.* Образцы зерновых культур с различной устойчивостью к шведским мухам, микроскопы, окуляр- и объектмикрометры, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, ножницы, пинцеты, полоски фильтровальной бумаги, марлевые салфетки, хлоралгидрат или жавелевая вода, глицерин, 5% раствор сафранина.

*Методика выполнения работы*

1. Из предварительно зафиксированного и хранящегося в 70%-м этиловом спирте материала лезвием безопасной бритвы делаются поперечные срезы одновозрастных проростков (фаза трех листьев) в нижней части через зону конуса нарастания.

2. Полученные срезы (не толще 30-35 мкм) переносятся на

предметное стекло в просветляющую жидкость (хлоралгидрат или жавелевую воду) на 15-20 минут. Просветляющее действие жидкости можно ускорить осторожным нагреванием препарата на пламени спиртовки.

3. Просветленные срезы промывают в дистиллированной воде и окрашивают 50%-м раствором сафранина. После окраски срезы переносятся на чистое предметное стекло в каплю раствора глицерина с водой (1:1) и просматривают под микроскопом.

4. В поле зрения микроскопа подсчитывают количество листовых слоев с измерением их по короткому и длинному диаметру.

По каждому варианту должно быть проанализировано 15-20 растений. Более устойчивые к шведским мухам образцы характеризуются большим количеством листовых слоев в конусе нарастания.

**Задание 2.** Определение физиологической (тканевой) устойчивости злаков к шведским мухам с использованием желудочного сока, моделирующего действие пищеварительных ферментов вредителей.

Метод основан на реакции растительных тканей в ответ на действие стандартного желудочного сока, моделирующего действие гидролаз личинок вредителей.

*Материалы и оборудование.* Проростки образцов злаков с различной устойчивостью к шведским мухам, бинокляры, ножницы, пинцеты, стандартный желудочный сок.

*Методика выполнения работы*

1. Изготовление отрезков стебля растений, находящихся в фазе 2-3 листьев, для определения физиологической устойчивости тканей. Отрезки стебля длиной 2 см вырезают в зоне нахождения конуса нарастания, несколько выше узла кущения. По каждому исследуемому образцу изготавливают не менее 10 отрезков стебля.

2. Изготовленные отрезки стебля помещают в стеклянные емкости с желудочным соком, которые для моделирования процесса гидролиза ставятся в термостат на 40 мин при температуре 37°C.

3. Измерение зоны действия желудочного сока проводят по величине некротической (побуревшей) части отрезка стебля с помощью окулярмикронметра под бинокляром.

4. Оценку степени устойчивости проводят путем сопоставления величины побуревшей зоны стебля у опытных растений со стандартным образцом или путем сопоставления ряда образцов между собой (рис. 4).

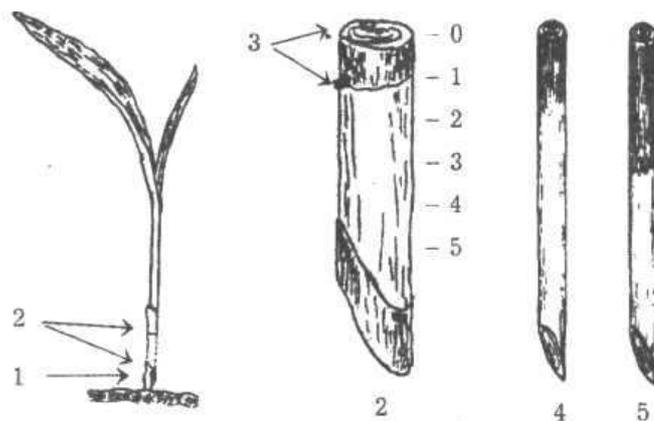


Рисунок 4 - Экспресс-метод определения устойчивости злаков к шведской мухе с помощью желудочного сока (1 - узел кущения, 2 - отрезок стебля для анализа, 3 - некротическая зона, 4 - сорт устойчивый, 5 - сорт неустойчивый)

Образцы, у которых величина зоны побурения выше, чем у контрольных или ряда других, относят к неустойчивым.

### **Злаковые тли**

Эти вредители наносят существенный вред пшенице, ячменю, ржи, овсу, рису, кукурузе, сорго и ряду других культур. Они опасны как переносчики вирусов.

Злаки повреждают как мигрирующие (двудомные), так и немигрирующие (однодомные) виды тлей. К мигрирующим, наиболее вредоносным видам тлей, относят черемухово-злаковую и розанно-злаковую. Среди немигрирующих видов наибольший вред наносят большая злаковая, обыкновенная злаковая, листовая сорговая или кукурузная и ячменная тли.

Жизненные циклы разных видов тлей разнообразны. Их основные отличия затрагивают пищевые связи - смену

первичного растения-хозяина (дерева или кустарника) на вторичные травянистые, а также способы размножения: половой и партеногенетический. Существуют виды тлей, у которых половое поколение не найдено. Виды, для которых характерно наличие полового размножения, при благоприятных условиях в течение многих лет могут существовать в виде партеногенетических популяций.

Все указанные виды тлей, за исключением кукурузной, зимуют в фазе яйца. У кукурузной тли зимуют личинки и партеногенетические самки.

Весной из яиц развиваются бескрылые самки-основательницы, которые партеногенетически отрождают живых личинок, дающих начало ряду летних поколений. Во 2-3-м поколениях, наряду с бескрылыми особями, появляются крылатые самки-расселительницы. Самки-расселительницы немигрирующих видов вначале питаются на зерновых культурах, затем поселяются на дикорастущих злаках, а после появления всходов озимых культур мигрируют на них. В сентябре - начале октября появляются обоополые особи - крылатые самцы и бескрылые самки. После спаривания самки откладывают яйца на листьях озимых культур. Самки-расселительницы мигрирующих видов тлей в летние месяцы питаются на промежуточных хозяевах - зерновых культурах и дикорастущих злаках. Осенью (в сентябре - начале октября) появляются крылатые самки, которые перелетают на первичного хозяина и отрождают личинок будущих половых самок. Приблизительно через неделю после их появления в потомстве бескрылых самок на вторичных хозяевах можно найти самцов, также перелетающих на первичного хозяина. Весной развитие одной генерации тлей длится около 3 недель, летом 8-15 дней.

В летний период самки-расселительницы обеих групп размножаются партеногенетически.

Характер заселения и повреждения растений тлями. Все рассматриваемые виды злаковых тлей питаются из сосудов проводящей системы растений низкомолекулярными транспортными формами веществ. Лишая растение больших количеств флоэмного сока, тли способны быстро увеличивать свою численность. Со слюной и содержимым кишечника тли

вводят в растительную ткань аминокислоты, амиды, гормоны, ферменты и другие биологически активные соединения. Эти вещества, передвигаясь по флоэме, могут вызывать генерализованное воздействие на растение, ослабляя его в целом, либо образуют в местах питания тлей на растении яркие светло-желтые, бурые или красные пятна, которые в результате разрыва клеточных оболочек, плазмолиза или лизиса клеток паренхимы и флоэмы превращаются в обширные некротические зоны. У поврежденных растений листья желтеют, скручиваются и засыхают. Иногда поврежденность тлями вызывает гибель главного стебля, что приводит к дополнительному кущению. В ряде случаев колос может не появиться, либо быть деформированным. Урожай зерна снижается, ухудшается качество семян. Для обыкновенной злаковой тли характерно массовое развитие на всходах сорго, что вызывает гибель растений. На обильно выделяемой тлями пади развиваются грибные заболевания, снижающие фотосинтез и транспирацию у растений. Тли также являются переносчиками вирусных болезней растений.

Для питания тли предпочитают участки листьев и стеблей, наиболее близко расположенных к конусу нарастания, постепенно перемещаясь на более высоко расположенные органы и части растения в процессе его органогенеза. Для разных видов тлей характерна приуроченность к определенным фазам развития растений. На колосовых злаках черемухово-злаковая тля заселяет посевы обычно в фазу кущения (II-III этапы органогенеза), обыкновенная злаковая и ячменная тли - в фазу выхода в трубку (IV этап органогенеза), предпочитая питаться на влагищах листьев. Для большой злаковой тли характерна сезонная смена мест обитания. В июне значительная часть ее популяции переселяется с мест зимовки – многолетних злаков и озимых культур на яровые - ячмень и овес, где питаются на вегетативных органах растений. В фазу колошения (VIII этап органогенеза) яровых зерновых большая злаковая тля предпочитает заселять флаговый лист и колосья.

По мере созревания зерновых культур и после их уборки все виды злаковых тлей заселяют дикорастущие злаковые травы и всходы падалицы. Далее они мигрируют на всходы озимых.

Знание особенностей сопряженности доминантных видов тлей с развитием хозяина позволяет определить периоды максимальной численности вредителей, приурочивая к ним сроки оценки устойчивости культуры к тлям в полевых условиях.

На юге России пик численности тлей отмечается во второй половине июня - начале июля, в средней полосе - в конце июля - начале августа.

Оценка устойчивости зерновых культур к черемухово-злаковой и обыкновенной злаковой тлям в северных районах их ареала проводится в фазах кущения и выхода в трубку (III-IV этапы органогенеза); в южных районах их ареала - в фазе колошения (VIII этап органогенеза); к большой злаковой тле - в фазе цветения (IX этап органогенеза).

### **Механизмы устойчивости**

В устойчивости зерновых культур к тлям установлена значимость механизмов морфологического, физиологического, оксидативного и некротического барьеров иммуногенетической системы растений. При питании на устойчивых сортах зерновых культур у тлей увеличивается время выбора кормового растения, поиска мест питания, затрудняется проникновение стилета к клеткам флоэмы, нарушаются процессы переваривания и усвоения пищи, что ведет к замедлению развития, снижению плодовитости, уменьшению массы тела, возникновению гипертрофии и гиперфункций различных отделов пищеварительной системы, появлению уродливых особей, нестабильности колоний, повышенному крылообразованию и смертности. В целом показатели жизнедеятельности тлей на устойчивых сортах в 2-3 раза ниже, чем на неустойчивых.

**Органогенетический барьер.** Большое значение в устойчивости злаков к тлям имеют нарушение сопряженности развития растений и насекомых и высокая скорость прохождения фаз онтогенеза растений, критических для заселения тлями. Устойчивые к тлям сорта характеризуются быстрым прохождением уязвимых фаз развития. Как правило, это фазы всходов, кущения, колошения и цветения.

**Морфологический барьер.** Плотность колоса определяет топическую ориентацию большой злаковой тли на колосковых чешуях пшеницы и ячменя и может быть фактором

устойчивости зерновых культур к тлям (Дворянкина, 1981). Проникновение стилетов тлей к флоэме затрудняется при повышенной лигнификации клеточных стенок, определяющих плотность растительных тканей.

**Физиологический барьер.** Низкое содержание растворимых аминокислот (лизина, триптофана и др.) во флоэме и высокий уровень содержания веществ вторичного обмена в листьях и в стебле - в частности, флавоноидов (и т.ч. бензоксазолинонов) имеет большое значение в устойчивости злаков к тлям. Среди них особое внимание уделяется агликону ДИМБОА (2,4-дигидрокси-7-метокси-1,4-бензоксазин-3-ону), оказывающему отпугивающее и прямое токсическое действие на тлей и затрудняющее их доступ к флоэме, что ухудшает их питание и способствует образованию некротических пятен в местах проколов тканей листа стилетами тлей. При этом выявлено, что содержание в листьях более 4 ммоль ДИМБОА на 1 кг сырой массы тканей растений резко ухудшает условия питания тлей. К веществам вторичного обмена, содержащимся в злаках и имеющим иммунологическое значение в отношении тлей, относятся также бензиловый спирт, транс-коричная, п-кумаровая, кофейная, феруловая, хлорогеновая, гидроксамовая, галловая кислоты, гидрохинон, грамины, некоторые другие физиологически активные вещества. В случае межклеточного проникновения стилетов тлей к флоэме препятствием для ее достижения может служить уровень содержания пектина и матричных полисахаридов.

### **Методы оценки устойчивости зерновых культур к тлям**

Оценка устойчивости образцов к тлям проводится в полевых, вегетационных и лабораторных условиях. Для оценки устойчивости зерновых культур к тлям используют следующие показатели:

1) процент заселенных растений, характеризующих предпочтительность тлей, что особенно важно в случае их виروفорных популяций;

2) численность насекомых на растениях, которая формируется в зависимости от плодовитости самок, выживаемости личинок и длительности преимагинального периода при питании на разных по устойчивости формах

растений; учитывают по 6-балльной шкале в период пика численности того или иного вида тли;

3) гибель растений, количество некротических пятен, изменение основных элементов продуктивности растений, что характеризует реакции растений на повреждение;

4) количественное содержание токсичных для питания веществ (ДИМБОА) в листьях и стеблях злаков.

### **Полевые методы**

В полевых условиях оценку степени устойчивости проводят 2-3 года. Количество повторностей - 4. В каждой повторности проводят учет численности тли на 25 растениях, выбранных на делянке случайно. Первый учет проводят в период массового заселения культуры, второй - в период максимума численности тлей через 3-4 недели после первого. Наиболее четкая дифференциация сортообразцов по устойчивости на естественном фоне наблюдается при заселенности тлями 25-60% стеблей и при их численности на один стебель не менее 15-20 особей. При низкой и при высокой численности тли различия между сортообразцами могут оказаться незначительными.

В годы депрессий размножения злаковых тлей необходимо создавать искусственные накопительные фоны, способствующие привлечению насекомых на опытные посевы. Для этого опытные делянки располагают вблизи летних или зимних резерваций злаковых тлей. По периферии опытного участка проводят изреженный посев неустойчивого сорта, площадь которого должна составлять не менее 1/3 площади опытного участка. Для обеспечения оптимальной численности тлей посев опытных образцов проводят спустя 1-2 недели после посева накопительного фона. С накопительного фона самки-расселительницы перелетают на опытные делянки.

Помимо этого, для искусственного заселения злаков вредителями используют целые растения-накопители тлей (за 2-3 дня до начала учетов) или их фрагменты (за 2 недели до проведения учетов), которые размещают на опытных делянках. Целые растения помещают в емкости с водой и укрепляют выше уровня стеблестоя, а фрагменты растений помещают за влагалища листьев опытных образцов. Количество тлей на одно растение должно составлять не менее 10 особей.

## **Оценка устойчивости зерновых колосовых культур к тлям**

Первый учет заселенных растений и численности тлей проводят в фазу кущения растений. При заселенности более 30% растений тлями при наличии на растении 3-4 крылатых особей, при благоприятных условиях (отсутствии ливневых дождей, температуре 20-25°C, незначительном количестве энтомофагов) можно ожидать резкого увеличения их численности и поражения растений вирусными заболеваниями.

Для оценки устойчивости растений к черемухово-злаковой и обыкновенной злаковой тлям в Северо-Западном регионе Нечерноземной зоны РФ используют 6-балльную шкалу:

- 1 - отдельные особи на одном из нижних листьев;
- 2 - отдельные особи на 2-3 нижних листьях;
- 3 - небольшие колонии из 3-5 особей на 2-3 нижних листьях;
- 4 - колонии средних размеров - 10-15 особей на половине всех листьев;
- 5 - колонии средних и больших размеров (не более 20 особей на 2/3 всех листьев);
- 6 - колонии средних и больших размеров на всем растении.

В Северо-Западном регионе Нечерноземной зоны РФ, где основными наиболее вредоносными видами являются черемухово-злаковая и большая злаковая тли, степень заселения растений от кущения до выколашивания учитывают по 6 балльной шкале:

- 0 - растения не заселены тлей;
- 1 - отдельные особи на одном из нижних листьев;
- 2 - отдельные особи на 2-3 нижних листьях;
- 3 - небольшие колонии из 3-5 особей на 2-3 нижних листьях.
- 4 - колонии средних размеров, 10-15 особей на половине всех листьев;
- 5 - колонии средних и больших размеров (не более 20 особей) на 2/3 всех листьев;
- 6 - колонии средних и больших размеров на всем растении.

Для оценки устойчивости растений к черемухово-злаковой, обыкновенной злаковой и ячменной тлям в южных районах их ареала, где пик их численности наблюдается в фазе колошения

(VIII этап органогенеза), рекомендуется использовать следующую шкалу:

0 - растения не заселены тлей;

1 - не более 5-6 небольших колоний на листовых пластинках и влагалищах листьев;

2 - колонии со средней и высокой численностью особей, располагающихся главным образом за влагалищем флагового листа, колос может быть несколько искривлен;

3 - многочисленные колонии тлей за влагалищем флагового листа и частично других листьев; растения имеют обесцвеченные влагалища, скрученную пластинку верхнего листа, колос сильно искривлен;

4 - слившиеся колонии тлей за влагалищем большинства листьев, колос сильно деформирован, частично обесцвечен, часть колосьев погибает внутри влагалищ листьев.

Для всех зон распространения злаковых тлей, где наблюдается заселение колоса большой злаковой тлей, рекомендуется использовать следующую шкалу:

0 - растения не заселены тлей;

1 - единичные особи на колосе;

2 - единичная колония (3-6 особей) на колосе;

3 - колония (10-15 особей) занимает до 25% поверхности колоса;

4 - несколько колоний (20-30 особей) занимают до 50% поверхности колоса;

5 - несколько слившихся колоний (30-50 особей) занимают до 75% поверхности колоса;

6 - весь колос усыпан тлями (более 50 особей).

Селекционные образцы группируют в блоки с учетом их скороспелости и хозяйственно-ценных признаков. Оценку степени устойчивости, выделение стандартных образцов, выявление механизмов устойчивости, ограничивающих вредоносность тлей, в полевых условиях проводят 2-3 года.

Образцы с численностью тли в 0-2 балла следует отнести к устойчивым, 2-3 балла - среднеустойчивым, 4-5 баллов - неустойчивым.

Для ранжирования образцов по степени устойчивости можно использовать стандарты - образцы с заранее известной

устойчивостью. При этом численность тлей на опытных растениях сравнивается с ее численностью на стандарте.

### **Вегетационно-лабораторные методы**

Большинство видов тлей хорошо размножается в условиях теплицы, что важно для проведения оценочных работ в осенне-зимний период. Для проведения опытов в теплице должна быть температура 22-25°C, освещенность 10 000 люкс, фотопериод 14-16 часов.

Оценочные работы складываются из следующих этапов: первый - разведение насекомых, второй - заселение растений тлями, третий - оценка устойчивости исследуемых образцов.

Разведение тлей. В качестве растений-хозяев, на которых тля хорошо размножается, используют неустойчивые сорта ячменя, овса, пшеницы, сорго и др. Семена высевают в вегетационные сосуды исходя из того что будущие растения должны быть обеспечены площадью питания 10 см<sup>2</sup>. С появлением всходов на растения подсаживают по 5-10 тлей, отловленных в природе. Сосуд с растениями и тлями накрывают изолятором из мелкоячеистой ткани, одетой на каркас. Через две недели в каждом сосуде будет 500 и более особей тлей.

Заселение растений тлями. Для выращивания растений исследуемых образцов используют деревянные ящики размером 50x30x10 см. Ящики заполняют почвенной смесью, состоящей из 3-х частей дерновой почвы, 1 части песка и 1 части торфа. Смесью досыпают до верха бортиков ящика на 2,5 см. В каждый ящик произвольно наравне с оцениваемым образцом высевают семена неустойчивого сорта. В опыте используют не менее 20 ящиков. В ящике делают 10 рядков, в каждый из которых высевают по 30 семян. Через 2 дня после появления всходов производят заселение образцов тлями разных возрастов, а по возможности и совокупности их биотипов. Тлей равномерно стряхивают мягкой кисточкой на каждое растение. Через 2-3 дня на малозаселенных растениях процедуру повторяют. Нагрузка заселенности составляет 2 особи на 1 растение зерновых культур и 4 особи - на проросток сорго. В качестве контроля используют неустойчивый сорт.

Оценку устойчивости образцов проводят через 10-14 дней после заселения растений и гибели неустойчивого сорта по б-

балльной шкале:

- 1- листья без видимых повреждений;
- 2- мелкие светло-желтые пятна на листьях в виде точек, часть листа обесцвечена;
- 3- крупные сливающиеся светло-желтые пятна, часть листа погибла;
- 4- один лист погиб;
- 5- два листа погибли;
- 6- растение погибло целиком.

Для ускорения работ первую оценку проводят без повторностей, в дальнейшем отобранные номера высевают в 3-4 повторностях. В качестве контроля в этой серии опытов используют устойчивый сорт.

Отобранные контрастные по устойчивости образцы оценивают в дальнейшем в полевых условиях.

Более детальное исследование механизмов устойчивости растений к тлям проводят в строго контролируемых условиях. Для этих целей наиболее доступным является метод изучения плодовитости тлей при питании на разных сортах кормовых растений.

Оцениваемые образцы выращивают в горшках, в каждом горшке должно быть по 5 растений. Повторность опыта 10-кратная.

После появления всходов (1-2 листа) на растения под изоляторы подсаживают личинок мерного возраста - одна особь на растение. Изоляторами в данном случае могут служить стеклянные колпаки от фонарей «летучая мышь», верхнее отверстие которых закрывается бязью или марлей. Подсчет численности тлей проводят через 10-20 дней после заселения растений. При проведении учетов регистрируют также число погибших взрослых особей и личинок.

Коэффициент плодовитости рассчитывают как среднюю плодовитость самки в сутки за время опыта.

Оценивают физиологическое состояние тлей (партеногенетических самок) при питании на разных сортах. Для этого на каждое растение помещают по одной крылатой особи, после отрождения трех личинок самку удаляют. У взрослых особей, развивающихся из этих личинок, определяют массу тела,

а после их вскрытия - общее число зародышей и степень их зрелости.

**Задание 3.** Определение устойчивости зерновых колосовых культур к тлям по содержанию токсичных для них веществ вторичного обмена (МБОА, ДИМБОА).

Метод основан на хроматографическом фракционировании нативного растительного сока с последующим окрашиванием веществ вторичного обмена, содержащих МБОА И ДИМБОА, образующих цветной комплекс с ионами железа.

*Материалы и оборудование.* 10 г зеленой массы 18-дневных растений. Специально подготовленная и обработанная парафином хроматографическая бумага размером 5x15см, хроматографическая камера, 0,5 л растворителя: н-бутанол, уксусная кислота, вода в соотношении 4:1:5; 2%, водный раствор хлорного железа; пипетка, стеклянный пульверизатор, фарфоровая чашка с пестиком.

*Методика выполнения работы.* Каждый образец анализируется трижды. Для анализа каждой повторности необходимо взвесить 3г зеленой массы образца. Путем растирания зеленой массы пестиком в фарфоровой чашке необходимо получить 0,5-1 мл сока.

Для анализа 0,1 мл растительного сока с помощью пипетки наносят на хроматографическую бумагу в узкий промежуток между двумя полосками парафина.

После просушки бумаги и нарезки парафина хроматограммы загнутым концом подвешивают на каркас и помещают в хроматографическую камеру (эксикатор) с растворителем. В одну камеру помещают по 10-12 хроматограмм так, чтобы они не касались одна другой. Восходящая разгонка сока на хроматограммах продолжается 2 часа при комнатной температуре. При этом растворитель проходит расстояние 7-8 см. После этого хроматограммы вынимают из камеры, просушивают и опрыскивают 2% раствором хлорного железа в воде. В результате качественной реакции с фенольными соединениями недалеко от линии фронта появляется зона с голубым окрашиванием. Интенсивность ее окрашивания сравнивают с таковой у образцов с заведомо известной устойчивостью к тлям. Оценку проводят по 5-балльной шкале. Высокоустойчивые

образцы оценивают баллом 5, неустойчивые - 1.

### **Подсолнечниковая огневка**

Вид широко распространенный: вся Западная Европа, Северная Африка, Передняя Азия. В пределах бывшего СССР северная граница распространения проходит от Финского залива к Ладожскому озеру. Широко распространена в Средней Азии, Казахстане, Сибири и на Дальнем Востоке (Амурская обл., Приморский край). Вредитель обнаруживается во всех зонах выращивания подсолнечника.

Самки откладывают яйца в соцветия сложноцветных растений. Плодовитость 100-300, яиц, яйца откладываются поодиночке или небольшими группами. Эмбриональное развитие длится 3-7 дней. Отродившиеся гусеницы питаются пылью и лепестками цветков, начиная с третьего возраста, вгрызаются в мякоть соцветий, где проделывают ходы в паренхиме, поедают основания цветков и выедают содержимое семян. Стадия гусеницы длится 13-20 дней. По завершении развития гусеница обычно спускается на землю, где на глубине нескольких сантиметров плетет кокон, в котором окукливается или перезимовывает. Развитие куколки продолжается около 17 дней.

Вид поливольтинный. В зависимости от широты и наличия пригодных растений-хозяев может развиваться 1-4 поколения, и даже пятое неполное поколение. В центральной России чаще 2 поколения, из которых второе может быть частичным. Имаго появляются обычно в конце мая - июне. Помимо подсолнечника повреждаются многие виды сложноцветных, в частности, сафлор, астра, хризантема, ноготки, ромашка, чертополох, крестовник, пижма, василек и др. Питание гусениц осуществляется исключительно репродуктивными частями растений, повреждения стеблей не отмечается. Зимовка взрослых гусениц и их окукливание происходит внутри коконов в поверхностном слое почвы.

С введением в культуру подсолнечника подсолнечниковая огневка стала первостепенным вредителем, вызывая потери 20-60% урожая этой культуры. Вред обуславливается не только выеданием содержимого семян, но и оплетением корзинок паутиной и загрязнением их экскрементами гусениц;

поврежденные корзинки часто загнивают при попадании в них дождевой воды. Радикальным приемом защиты растений против этого вредителя является выращивание панцирных сортов подсолнечника, которые почти не повреждаются гусеницами благодаря защитному слою оболочки семян.

Таким образом, панцирность семян выступает в роли фактора устойчивости подсолнечника к подсолнечниковой огневке. Факторы устойчивости растений играют первостепенную роль в сдерживании размножения вредителя, в частности, фитомеланин, содержащийся в перикарпе семян подсолнечника.

**Задание 4.** Определение панцирности семян подсолнечника как фактора устойчивости к подсолнечниковой огневке.

*Цель работы.* Определить панцирные и беспанцирные семянки подсолнечника, подготовить анатомические препараты и провести анатомическое изучение панцирного слоя.

*Материалы и оборудование.* Семянки различных по устойчивости к подсолнечниковой огневке сортов подсолнечника, двухромовосерная смесь, микроскопы, предметные и покровные стекла, чашки Петри, стеклянные стаканчики, лезвия безопасной бритвы.

*Методика выполнения работы*

1. Определение панцирности семян.

Отсчитать по 100 штук семян нескольких (2-3) сортов подсолнечника. Поместить семянки в стеклянные стаканчики (каждый сорт отдельно) и залить двухромовосерной смесью (насыщенным 18-% раствором двухромовокислого калия и концентрированной серной кислоты в соотношении 85:15) на 10-20 минут. В результате воздействия двухромовой серной смеси эпидермис и пробковая ткань обесцвечиваются, а панцирный слой нерастворим в смеси. Поэтому беспанцирные семянки становятся светлыми, а панцирные остаются темноокрашенными. Смесью сливают, семянки тщательно промывают водопроводной водой и подсчитывают количество панцирных и беспанцирных в каждой пробе. Определяют процент панцирности семян изучаемых сортов.

Результаты опыта записывают в рабочую тетрадь.

2. Гистологическое изучение панцирного слоя семян подсолнечника.

Для приготовления гистологических срезов берут кусочки кожуры панцирных семян, помещают их в сердцевину бузины и острым лезвием безопасной бритвы делают поперечные срезы. Можно сделать срезы непосредственно с семян, не вылушивая ядра. Срезы получаются более тонкими, если кожура размягчена, чего можно достигнуть, замочив семечки на 5-10 минут в горячей воде.

### **Лабораторная работа № 3**

## **МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАРТОФЕЛЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ**

В настоящее время одним из важнейших путей повышения продуктивности сельскохозяйственных растений является защита их от болезней. В комплексе мероприятий, направленных на решение этой проблемы, ведущее место занимает создание высокоурожайных и болезнестойких сортов и гибридов.

Селекция на болезнестойкость более сложна, чем селекция на любой другой хозяйственноценный признак, так как она ведется в отношении биологического фактора - патогена, которому свойственен непрерывный ход эволюционной изменчивости. Наряду с этим в условиях крупных специализированных хозяйств, агропромышленных объединений, на фоне широкой мелиорации земель, резко возросшего обеспечения сельского хозяйства минеральными удобрениями, энергетическими мощностями требуется создание сортов, устойчивых к комплексу заболеваний. Успех работы в этом направлении в значительной мере зависит от выбора метода определения устойчивости селекционного материала к возбудителю той или иной болезни.

### **Методы оценки картофеля на устойчивость к фитофторозу**

Фитофтороз относится к числу повсеместно распространенных и наиболее опасных болезней картофеля. Заболевание проявляется ежегодно, значительного развития

достигает раз в 1-2 года. Массовые вспышки повторяются в среднем через 3-5 лет с потерями урожая до 50%.

Развитию болезни способствуют осадки, относительная влажность воздуха свыше 75%, среднесуточная температура воздуха 10-20°C, минимальная 6-10°C. Вредоносность фитофтороза заключается в преждевременном отмирании пораженной ботвы, снижении урожая клубней и гниении их во время хранения, размеры потерь урожая зависят в основном от уровня устойчивости возделываемых сортов, метеорологических и почвенных условий, срока появления болезни, приемов возделывания картофеля.

На листьях образуется бурые расплывчатые, постепенно разрастающиеся пятна. Во влажную погоду или при росе по краям отмершей ткани, преимущественно на нижней стороне листьев, развивается серовато-белый налет спороношения гриба. Споры разносятся и ветром по полю, фитофторозом поражаются все надземные органы растения и клубни и при благоприятных для развития болезни условиях могут в течение нескольких дней вызвать массовое поражение растений. Клубни заражаются в период вегетации спорами, попадающими в почву с пораженной ботвы, или при соприкосновении с ней во время уборки. В наибольшей степени подвержены заболеванию клубни с неокрепшей кожицей и механическими повреждениями. На их поверхности заболевание проявляется в виде твердых, слегка вдавленных серо-коричневых пятен, распространяющихся внутрь мякоти в виде ржаво-бурых тяжей. Первичным источником инфекции являются слабозараженные клубни, попадающие в посадочный материал или отбросы картофеля после весенней переборки.

Возбудитель болезни - гриб *Phytophthora infestans* (Mont.) относится классу Oomycetes, порядку Peronosporales, семейству Pythiaceae. Мицелий многоядерный, неклеточный, распространяется в тканях растения межклеточно. Внутри клеток проникают образующиеся на мицелии многочисленные боковые выросты (гаустории). На поверхности пораженных тканей грибок появляется в виде ответвлений мицелия - конидиеносцев с формирующимися на них лимоннообразными конидиями (18-40 мкм). Они могут прорасти одним или несколькими ростками,

или образуют 6-16 подвижных зооспор (10x7 мкм). Зооспоры появляются только в капельно-жидкой влаге при температуре ниже 14°C и способствуют самому быстрому нарастанию инфекции в поле.

Для борьбы с фитофторозом разработан комплекс фитосанитарных, агротехнических и химических мероприятий, среди которых одним из основных является возделывание устойчивых сортов. У картофеля обнаружено два типа устойчивости к фитофторозу.

**Вертикальная, или специфическая, устойчивость,** которая определяется доминантными R-генами и проявляется реакцией сверхчувствительности (СВЧ) клеток растения-хозяина по отношению к несовместимым расам патогена. Этот тип устойчивости обеспечивает полную невосприимчивость растений только к отдельным расам и недостаточно долговечен из-за постоянного расообразовательного процесса у гриба.

**Горизонтальная, или неспецифическая, устойчивость** контролируется системой патогенов, обуславливает одинаковый уровень защиты от всех рас гриба, наиболее стабильна при правильной технологии производства картофеля, снижает степень споруляции гриба.

Сортообразцы картофеля могут обладать одним из этих факторов или их сочетаниями. Неспецифическая устойчивость не способна предохранить растения от поражения, особенно в год эпифитотий, но делает их менее доступными для возбудителя болезни. Одно из главных достоинств этого типа невосприимчивости заключается в снижении коэффициента размножения гриба, что ведет к уменьшению интенсивности расообразовательных процессов.

Большую роль горизонтальной устойчивости в защите картофеля от фитофтороза и необходимость испытания исходного селекционного материала по этому признаку подчеркивают исследователи в разных зонах страны.

Наиболее объективно оценить сортообразцы можно в полевых условиях в годы эпифитотий болезни. При недостаточном ее развитии следует использовать методы, основанные на искусственном заражении растений.

**Методики, разработанные, апробированные и применяемые в настоящее время в селекционных центрах.**

**Полевой метод оценки листьев.** Достоверность оценки фитофтороустойчивости в поле зависит от расового состава природной популяции возбудителя, времени появления болезни, ее продолжительности и интенсивности развития. Поэтому полевой метод высокоэффективен лишь в годы эпифитотий, когда создается жесткий естественный инфекционный фон. Поскольку горизонтальная устойчивость выражается в задержке появления заболевания и снижении его уровня, оценку образцов в поле следует проводить в динамике, в сравнении с сортами-стандартами устойчивости в каждой группе спелости.

Учет начинают с момента появления болезни на ранних сортах и проводят 5-7 раз в сезоне до отмирания ботвы по следующей шкале.

Таблица 7 - Шкала для оценки устойчивости к фитофторозу картофеля в полевых условиях

Развитие болезни, %	Устойчивость, балл	Степень устойчивости
Отсутствие пятен фитофтороза на листьях	9	Очень высокая устойчивость
Единичные пятна на отдельных листьях	8	Высокая устойчивость
Поражено до 25% листьев	7	Относительно высокая устойчивость
Поражено от 25 до 50% листьев	5	Средняя устойчивость
Поражено более 50% листьев	3	Низкая устойчивость
Все листья растения полностью поражены	1	Очень низкая устойчивость

**Лабораторно-полевой метод оценки листьев.** Позволяет независимо от погодных условий учитывать основные формы проявления горизонтальной устойчивости: устойчивость к

проникновению гриба в клетки хозяина-растения; к распространению в тканях после проникновения; устойчивость, обусловленную снижением интенсивности спороношения и удлинением инкубационного периода. Особенность метода состоит в инокуляции неотделенных от растения листьев, что приближает процесс заражения к естественному протеканию его в природе. Кроме того, инфицирование проводят в течение вегетации несколько раз, чтобы зафиксировать изменения устойчивости в ходе онтогенеза растений.

В качестве инфекции используют высоковирулентную расу, предварительно проверив ее агрессивность, которая может снижаться при многократном пассировании гриба на питательных средах и ломтиках клубней. Повышают паразитические свойства патогена путем пересева с клубней на листья восприимчивого сорта и обратно.

Для оценки устойчивости пригодна лишь высокоинфекционная культура с хорошим спорообразованием и быстрым ростом (4-6 дней). Из инфекции, размноженной на ломтиках клубней, готовят суспензию с концентрацией 20 конидий в поле зрения микроскопа при увеличении 120. Инфекционный материал пригоден для заражения лишь при массовом выходе зооспор. Для этого суспензию выдерживают при температуре 8-10°C в течение 1-2 часов.

К заражению приступают с начала цветения ранних сортов в период естественного появления фитофтороза в годы эпифитотий и повторяют его 3-4 раза до начала уборки поздних. У испытываемых и контрольных образцов заражают в вечернее время 2 листа (по 3 доли) среднего яруса (в качестве контролей используют сорта разных групп спелости с известным уровнем устойчивости). На нижнюю поверхность каждой из трех долей, считая от верхушки, наносят по капле инокулюма и накрывают их специальными микрокамерами, которые снимают через 12-16 часов. Спустя трое суток после инокуляции (минимальный инкубационный период для восприимчивого сорта) зараженные листья отделяют от растений, переносят в лабораторию и раскладывают на стеклянные вкладыши, покрытые увлажненной фильтровальной бумагой и помещают в инкубационные влажные камеры при температуре 18-20°C и нормальном дневном

освещении.

Отмечают дату появления первых признаков заражения, а на 8-е сутки после инокуляции - величину поражения (путем измерения диаметра пятен) и интенсивность спороношения по шкале:

- 0 – отсутствие спороношения;
- 1 балл – слабое спороношение;
- 2 балла - среднее спороношение;
- 3 балла - сильное спороношение.

Высчитывают индекс поражения по формуле:

$$X = \left( \frac{a_1 \cdot b_1}{v_1} + \frac{a_2 \cdot b_2}{v_2} + \dots + \frac{a_n \cdot b_n}{v_n} \right) \cdot \frac{1}{n}$$

где  $X$  - индекс поражения;

$a_1, a_2, \dots, a_n$  - средняя величина поражения (мм);

$b_1, b_2, b_n$  - средняя интенсивность спороношения (балл);

$v_1, v_2, v_n$  - средний инкубационный период (сутки);

$n$  - количество инокуляций за сезон.

В зависимости от величины индекса образцы относят к определенной группе устойчивости (таб. 8).

Таблица 8 - Шкала для дифференциации устойчивости к фитофторозу сортообразцов картофеля по величине индекса поражения листьев

Индекс поражения	Устойчивость (балл)	Степень устойчивости
0	9	Очень высокая устойчивость
0,1-5	7	Относительно высокая устойчивость
5,1-10	5	Средняя устойчивость
10,1-20	3	Низкая устойчивость
Свыше 20	1	Очень низкая устойчивость

Метод рекомендуется для оценки исходного материала и селекционных образцов на завершающих этапах селекции.

### **Лабораторный метод оценки листьев**

В основу положен метод, основанный на заражении отделенных от растения листьев. Особенность его заключается в инокуляции листьев параллельно двумя инфекционными нагрузками (слабой и повышенной), что позволяет наиболее отчетливо разделять образцы с высокой, средней и низкой устойчивостью. Снятие инфекционных капель спустя 16 часов после нанесения дает возможность отобрать формы с устойчивостью к проникновению гриба. Подготовка инфекции, техника инокуляции и условия инкубации такие же, как и в лабораторно-полевом методе, но листья раскладывается на вкладыши верхней стороной вниз. Применение контролей обязательно. Метод пригоден для массовой оценки селекционного материала.

**Задание 1.** Оценить устойчивости к фитофторозу листьев картофеля в лабораторных условиях.

*Материалы и оборудование.* Сорты картофеля разных сроков созревания. Суспензии 5, 10, 20 и 30 конидий в поле зрения микроскопа при увеличении 120. Суспензию выдерживают при температуре 8-10°C в течение 1-2 часов. Стеклообразные вкладыши, покрытые увлажненной фильтровальной бумагой, инкубационные влажные камеры.

*Методика выполнения работы.* Учитывают интенсивность спороношения в баллах, на основании чего вычисляют окончательный средний балл. Эта модификация касается концентрации инокулята, сроков заражения и учета. Двумя суспензиями (концентрация 5 и 10 конидий в поле зрения микроскопа при увеличении 120) заражают в начале цветения по два листа каждого образца из группы скороспелых. Для инокуляции материала других сроков созревания применяют концентрации 10 и 20 конидий. Второй и третьей инокуляции подвергают образцы, не заразившиеся или слабо пораженные в первый и второй раз. При этом используют повышенные нагрузки инфекции - 10-20 и 20-30 конидий соответственно. Учет проводится на 5-е сутки по следующей шкале (таб. 9).

**Лабораторный метод оценки устойчивости клубней.**  
Основан на заражении целых клубней. Методика отработана на

сортах с известным уровнем устойчивости и может быть использована для массовой оценки исходного и селекционного материала.

Таблица 9 - Шкала для оценки устойчивости к фитофторозу листьев картофеля в лабораторных условиях

Интенсивность спороношения	Устойчивость, балл	Степень устойчивости
Отсутствие спороношения	9	Очень высокая устойчивость
Единичные конидиеносцы	8	Высокая устойчивость
Спороношение занимает до 25% площади листа	7	Относительно высокая устойчивость
Спороношение занимает от 25 до 50% площади листа	5	Средняя устойчивость
Спороношение занимает от 50 до 75% площади листа	3	Низкая устойчивость
Спороношение занимает свыше 75% площади листа	1	Очень низкая устойчивость

**Задание 2.** Оценить устойчивость клубней картофеля к фитофторозу.

*Материалы и оборудование.* Клубни разных сортов картофеля. Суспензия 15 конидий высоковирулентной расы в поле зрения микроскопа при увеличении 120. Стеклообразователи, выложенные увлажненной фильтровальной бумагой.

*Методика выполнения работы.* От каждого испытываемого образца берут по 5 кг клубней, моют под проточной водой и заражают путем погружения на 5 минут в суспензию зооспорангиев и зооспор высоковирулентной расы. Подготавливают инфекцию как и для заражения листьев. Концентрация инокулюма - 15 конидий в поле зрения

микроскопа при увеличении 120. Зараженные клубни укладывают в стеклянные кристаллизаторы, выложенные увлажненной фильтровальной бумагой, и накрывают стеклом инкубация при температуре 15-18°C в течение 21 суток. В качестве контролей используют сорта и гибриды с известным уровнем устойчивости клубней. Оценивают заражение по величине некроза из поверхности клубней и глубине проникновения гриба в клубни на их продольном разрезе. Применяют следующую шкалу:

- 0 - поражение отсутствует;
- 1 - единичные неглубокие (до 5 мм) поражения;
- 2 - поражено до 25% поверхности;
- 3 - поражено от 25 до 50% поверхности клубня, площади среза;
- 4 - поражено от 50 до 75% поверхности клубня, площади среза;
- 5 - поражено свыше 75% поверхности клубня, площади среза.

Затем для каждого образца вычисляют средний балл некроза поверхности и средний балл поражения внутренних тканей клубня, по средней величине которых определяет степень поражения, а затем балл устойчивости (таб. 10).

Таблица 10 - Шкала для оценки устойчивости к фитофторозу клубней картофеля

Степень поражения, балл	Устойчивость, балл	Степень устойчивости
0	9	Очень высокая устойчивость
0,1-0,5	8	Высокая устойчивость
0,6-1	7	Относительно высокая устойчивость
1,1-2,0	5	Средняя устойчивость
2,1-3,0	3	Низкая устойчивость
3,1-5,0	1	Очень низкая устойчивость

**Методика отбора фитофтороустойчивых образцов картофеля по клубням.** Устойчивость клубней к фитофторе, также как и надземных частей растений, может быть двух типов: горизонтальная и вертикальная. Самым надежным типом устойчивости для них, также как и для листьев, является горизонтальная устойчивость. Разработка методов отбора форм картофеля, обладавших этим типом устойчивости, имеет большое практическое значение. Метод предусматривает проведение отбора в два этапа в течение двух лет.

Сущность разработанного метода отбора сеянцев на устойчивость к фитофторозу заключается в следующем: во время уборки сеянцев первого года от каждого гибрида берут по одному клубню. Заражение их проводят в ноябре-декабре. Через семь дней после инокуляции проводят первый осмотр поверхности клубней. Клубни с явными признаками поражения удаляют, а на оставшихся делают неглубокий надрез с целью выявления симптомов поражения мякоти и раскладывают обратно в кюветы. Непораженные клубни просушивают, хранят до весны и высаживают в питомник второго года. Оценку вегетирующих растений проводят на естественном инфекционном фоне (при условии, что в популяции гриба присутствуют вирулентные расы, в противном случае листья оцениваются лабораторным методом).

Клубни нового урожая анализируют на устойчивость к фитофторозу осенью путем инокуляции ломтиков.

Наиболее перспективным является отбор по клубню в первом селекционном питомнике, так как он дает возможность селекционеру уже на ранних этапах работать с заведомо устойчивым материалом и тем самым сократить объем изучаемых популяций в последующих питомниках, экономя время и площадь.

**Лабораторная работа № 4**  
**ОЦЕНКА КАРТОФЕЛЯ И ОВОЩНЫХ**  
**ПАСЛЕНОВЫХ КУЛЬТУР НА**  
**УСТОЙЧИВОСТЬ К ЖЕСТКОКРЫТЫМ**  
**ВРЕДИТЕЛЯМ**

Наиболее опасные вредители картофеля и овощных пасленовых культур в России - грызущие насекомые. Это два вида жуков - колорадский жук и 28-точечная коровка, а также бабочка - картофельная моль, являющаяся карантинным объектом. Кроме них, на пасленовых культурах обитают сосущие насекомые - некоторые виды тлей, которые потенциально опасны главным образом как переносчики вирусной инфекции.

**Колорадский жук**

Родина вредителя - юго-запад США (Скалистые Горы). В настоящее время его ареал включает Северную Америку (США и юг Канады), почти всю Европу (кроме скандинавских стран, Великобритании, Ирландии и Исландии), Кавказ, Переднюю и Среднюю Азию, Казахстан; в Российской Федерации - территории Центрального, Центрально-Черноземного, Волго-Вятского, Поволжского, Северо-Кавказского экономических районов и основные зоны картофелеводства в южных и центральных областях Северо-Западного, Северного, Уральского и Западно-Сибирского районов. Ареал вредителя в Евразии в наши дни продолжает расширяться высокими темпами, постепенно охватывая зоны фактического возделывания картофеля и овощных пасленовых культур в пределах умеренного и субтропического поясов.

Благодаря яркой окраске колорадский жук во всех открыто живущих фазах хорошо заметен на поедаемых им растениях, что при обследовании посадок пасленовых культур облегчает и ускоряет выполнение всех учетов численности вредителя, необходимых как для традиционной сигнализации сроков проведения защитных мероприятий (с учетом экономического порога вредоносности), так и для сравнительной оценки образцов растений на устойчивость к

вредителю согласно предлагаемым рекомендациям.

Колорадский жук трофически связан только с пасленовыми растениями. Он сильно повреждает картофель и баклажан и меньшей степени томат. Нельзя исключить вероятность повреждения колорадским жуком (в зависимости от зоны обитания) овощного перца, овощного физалиса, дынной груши и табака, а также опасность сохранения резерваций вредителя (при его проникновении в новые районы) на некоторых видах дикорастущих пасленов - волосистом, сладко-горьком и др. На своей географической родине он первоначально обитал на дикорастущих пасленах: колючем (*Solanum rostratum* Dun.) и каролинском (*S. carolinense* L.), что и обусловило его потенциальную адаптируемость к другим названным выше видам пасленовых растений по мере территориального расселения вредителя.

Вредоносность насекомого связана с объеданием жуками и личинками надземных частей растений - главным образом листового аппарата. При этом особи вредителя съедают листья повреждаемых растений целиком, обгрызая их с краев или с середины. Для картофеля жуки и их личинки особенно вредоносны в периоды бутонизации и цветения, когда закладывается и формируется основная масса клубней; потеря ботвы по окончании массового цветения уже практически не сказывается на урожае клубней. Для овощных пасленовых культур (баклажан, томат и др.) жук вредоносен в течение всего периода их вегетации до полной уборки урожая, так как данные культуры являются растениями с неограниченным ростом, а у баклажана жуки летних поколений часто повреждают и плоды. Зоной постоянной или периодической вредоносности колорадского жука на картофеле следует считать все без исключения районы его постоянного обитания, в т.ч. названные выше северные регионы, в связи с оптимальной адаптацией вредителя к местному климату.

Колорадский жук обладает чрезвычайной экологической пластичностью. По современным представлениям она в значительной мере обусловлена выраженным внутрипопуляционным адаптивным полиморфизмом генетической природы (Вилкова и др., 2002). Благодаря этому в

популяциях колорадского жука в новых условиях обитания существенно облегчены и ускорены приспособительные процессы, совершающиеся на уровне популяций и изменяющие генетическую структуру популяций вида адекватно местным условиям путем естественного отбора наиболее приспособленных генотипов - процессы микроэволюции, приводящие к формированию экологических рас, в т.ч. географических. Такие расы выявлены (в т.ч. методами фенетики популяций для полиморфных видов) и у колорадского жука в основных агроклиматических зонах Евразии.

В связи с их биологической разнокачественностью устойчивость конкретных образцов кормовых растений к вредителю в полевых условиях может иметь зональную специфику. В связи с этим при проведении оценки образцов пасленовых культур на устойчивость к колорадскому жуку (для объективности результатов оценки) важно соблюдать зональный подход, то есть вести отбор перспективных для данной зоны устойчивых форм растений в местных условиях согласно обоснованному Н.И.Вавиловым принципу географического изучения коллекций растительных ресурсов. Очевидно, эти требования справедливы для всех объектов.

### **Механизмы устойчивости**

Устойчивость пасленовых культур к насекомым-фитофагам до настоящего времени изучалась главным образом на примере картофеля и колорадского жука. Исследованиями отечественных и иностранных специалистов показано, что различные виды картофеля, как культурные (включая *Solanum tuberosum*, *S. andigenum* и др.), так и многочисленные дикорастущие, в своей биоразнообразии обладают значительными генетическими ресурсами устойчивости к колорадскому жуку и другим насекомым-фитофагам (Шапиро, 1985; Шапиро и др., 1991).

В устойчивости картофеля к колорадскому жуку доказана роль механизмов морфологического, органогенетического, атрептического, физиологического, ингибиторного, оксидативного, некротического и репарационного барьеров иммуногенетической системы растений, связанных с их различными видовыми и сортовыми признаками (Вилкова, 1980, 2000; Шапиро, 1985; Вилкова, Иващенко, 2000; Вилкова и др.,

2002). Они перечислены ниже в таблице 11, где имеются также примеры некоторых устойчивых к колорадскому жуку сортов культурного картофеля с характеристикой их защитных свойств. Данный список можно дополнить также сортами Андо, Атлантик, Беролина, Бинтье, Гренцмарк, Дезирэ, Кеннебек, Ласунок, Маршаллек, Ромашка и Энергия.

Признаки устойчивости, которые оказывают отрицательное (депрессирующее) воздействие обладающих ими форм картофеля на колорадского жука и поэтому заслуживают наибольшего внимания селекционеров, в таблице 11 выделены и отмечены звездочкой (\*) перед порядковым номером.

Атрептический и ингибиторный барьеры. Отрицательное воздействие устойчивых форм картофеля на вредителя может проявляться существенным затруднением поиска, поглощения и переваривания пищи жуками и личинками, что ведет к значительному повышению энергозатрат организма насекомого на обеспечение этих жизненно важных функций. В последнем случае важнейшее значение имеют особенности молекулярных структур основных биополимеров пищи (атрептический барьер) и наличие у растений белков, ингибирующих активность пищеварительных ферментов насекомого (ингибиторный барьер). Растения с такими свойствами вызывают у фитофагов синдром «неполного голодания» особей, что приводит к гетерохрониям в развитии и повышению смертности личинок, резкому снижению плодовитости имаго и их неполноценному нажировочному (преддиапаузному) питанию. В итоге это проявляется значительным снижением биотического потенциала вредителей (Шапиро, 1985; Вилкова, 2000; Вилкова, Фасулати, 2001; Вилкова и др., 2002).

Физиологический и оксидативный барьеры. Их воздействие на вредителей связано с прямым токсическим эффектом вторичных физиологически активных веществ, а также продуктов их окисления, аналогичное действию инсектицидов и бактериальных токсинов. У пасленовых растений это главным образом гликоалкалоиды: соланин, демиссин, чаконин, полиаденин, томатыны, капсаицин, физалин и другие. Многие из них видоспецифичны (Вилкова, 1980; Шапиро, 1985; Вилкова, Иващенко, 2000).

Таблица 11 - Видовые и сортовые особенности растений картофеля, определяющие устойчивость его форм к колорадскому жуку

Признаки (механизмы) устойчивости генотипов картофеля к колорадскому жуку	Иммуногенетические барьеры (Вилкова, 1980)
1. Куст мощный, многостебельный, сильно облиственный	Морфологический
2. Толщина листовой пластинки 300 мкм и более	Морфологический
3. Механическая прочность тканей листа более 12 г на 1мм <sup>2</sup>	Морфологический
*4. Густое железистое опушение с преобладанием трихом В-типа (у некоторым дикорастущих видов)	Морфологический
5. Большое число глазков клубня и их одновременное прорастание.	Морфологический
6. Ускоренное формирование надземных частей в период от появления всходов до цветения	Органогенетический
*7. Скороспелость или короткий период между цветением и отмиранием ботвы	Органогенетический
*8. Низкая атакуемость основных биополимеров растения гидролазами насекомого	Атрептический
*9. Наличие белков – ингибиторов гидролаз насекомого	Ингибиторный
*10. Наличие видоспецифичных гликоалколоидов и других физиологически активных веществ со свойствами репелентов, детеррентов или токсинов, а также продуктов их окисления	Физиологический и оксидативный
*11. Некроз тканей листьев под кладками яиц жуков	Некротический
12. Интенсивная и ускоренная регенерация листового аппарата	Репарационный

\*Данные свойства растений вызывают затруднение процессов питания и пищеварения колорадского жука, ухудшение его физиологического состояния или условий обитания.

Остальные признаки способствуют повышению ЭПВ колорадского

жука на посадках соответствующих сортов и снижению степени поврежденности надземных частей растений при равной с другими сортами численности вредителя, но не влияют на качество и доступность корма и потому не снижают общий биотический потенциал насекомого.

Обладающие данными веществами устойчивые к вредным организмам сорта картофеля имеют межвидовое происхождение. Так, сорта Зарево, Раменский, Свитанок киевский, Сотка и Петербургский, созданные с использованием устойчивых образцов вида *S. demissum*, обладают комплексной устойчивостью к колорадскому жуку и фитофторе. Одним из ее механизмов является содержание в листьях растений данных сортов стероидного гликоалкалоида альфа-томатина в концентрациях 300-600 мкг на 100 г свежих листьев. Это не ухудшает пищевых качеств клубней. Однако перенасыщение селекционных сортов многими другими гликоалкалоидами (демиссин, чаконин, полиаденин и др.) недопустимо, так как приводит к несъедобности клубней для человека и домашних животных (Шапиро, 1985; Вилкова, Иващенко, 2000). В связи с этим отбор устойчивых к жукам селекционных форм картофеля следует вести лишь среди образцов, удовлетворяющих требованиям качества.

**Некротический барьер.** Его действие у картофеля проявляется по отношению к отложенным жуками кладкам яиц. В местах контакта яиц с листовой поверхностью нередко развиваются процессы некроза тканей листа на всю его толщину вплоть до образования сквозных отверстий, в результате чего яйца или большинство их с листа опадают. Такое явление чаще всего наблюдается на кустах картофеля сортов, большинство из которых содержат физиологически активные вещества типа альфа-томатина.

**Органогенетический барьер.** Ухудшают условия развития колорадского жука и некоторые особенности органогенеза растений, например, короткий период между цветением и отмиранием ботвы и короткий период вегетации в целом. В связи с этим органогенетический барьер устойчивости характерен для всех скороспелых сортов картофеля, поскольку на их посадках обычно не обеспечивается полноценное наживочное питание

отродившихся имаго молодого поколения, что вызывает их повышенную смертность при перезимовке.

Другие особенности органогенеза растений картофеля, а также большинство перечисленных в таблице 11 механизмов морфологического барьера (за исключением железистого опушения В-типа, свойственного ряду дикорастущих видов картофеля) и репарационного барьера (ускоренное восстановление, или репарация утраченных побегов и листьев) - не оказывают отрицательного воздействия на вредителей и не вызывают депрессии их популяций, а обуславливают лишь повышенную выносливость (сопротивляемость) растений к нанесенным вредителями повреждениям надземных частей. Благодаря названным свойствам растений существенно снижается степень поврежденности листового аппарата при равной с другими сортами численности вредителей на посадках соответствующих сортов, но не ухудшаются качество пищи и условия питания фитофагов и потому не снижается их биотический потенциал.

Очевидно, что новые сорта картофеля, создаваемые различными методами селекции (как традиционными, так и генно-инженерными), должны обладать устойчивостью к колорадскому жуку на возможно более широкой генетической основе, то есть сочетать в одном генотипе признаки устойчивости различной природы. Это, в частности, позволит существенно затруднить и замедлить соответствующие адаптивные процессы в популяциях вредителя (Вилкова и др., 2002).

Природные ресурсы устойчивости картофеля к вредителям еще недостаточно широко используются в селекции новых сортов, а зачастую и выявлены далеко не полностью. Так, известны высокоустойчивые к колорадскому жуку образцы (экотипы) у десятков дикорастущих полиморфных видов картофеля, в т.ч. клубненосных (Шапиро, 1985; Шапиро и др., 1991), однако традиционно используются в селекции лишь отдельные из них.

Основными признаками устойчивости томата, перца и физалиса к колорадскому жуку являются механизмы физиологического барьера растений и в первую очередь

свойственные данным видам растений гликоалкалоиды - соответственно томатин (различные формы), капсаицин и физалин. В то же время известно, что коровка-эпиляхна способна нормально развиваться на всех названных культурах, а также на ВТ-трансгенных сортах картофеля. Это подтверждает вполне закономерную неоднозначность воздействия одних и тех же физиологически активных веществ, характерных для пасленовых растений определенных родов и видов, а также бактериальных токсинов на виды фитофагов, принадлежащие к различным, хотя и филогенетически близким семействам отряда жесткокрылых. Сведения о других признаках устойчивости овощных пасленовых культур к жесткокрылым вредителям отсутствуют. Степень устойчивости форм томата к колорадскому жуку также не одинакова и столь же часто, как у картофеля и баклажана, проявляется дифференцированно по отношению к различным морфам и географическим популяциям вредителя, причем имеются примеры оптимальной адаптации колорадского жука к культуре томата (Фасулати, Карасева, 1998; Фасулати, Вилкова, 2000; Вилкова, Фасулати, 2001).

**Показатели устойчивости.** Учитывая разнообразие барьеров и механизмов устойчивости пасленовых культур к жукам, критериями отбора устойчивых к ним сортообразцов могут служить многие биологические и морфометрические показатели насекомых и растений, которые определяют полевыми или лабораторными методами. Ниже описаны только наименее трудоемкие методы (в первую очередь - полевые), которые могут быть рекомендованы для повсеместного практического применения на этапах селекции, конкурсного и государственного сортоиспытания, когда не ставятся научные задачи исследования механизмов устойчивости растений.

#### **Полевые методы**

Отличаются высокой объективностью при минимальной трудоемкости; в равной мере адаптированы к условиям сортоиспытания, семеноводства, селекции и изучения коллекций растительных ресурсов. Выделение и отбор устойчивых к вредителям форм растений ведут путем сравнительного анализа оцениваемых образцов по приводимым ниже показателям численности вредителей и степени поврежденности ими

растений. Данные показатели для различных сортообразцов определяют на фоне естественного заселения вредителями имеющихся сортовых посадок, для чего данные посадки (оценочные группы образцов) обследуют: картофель - 3 раза, овощные пасленовые культуры - 4 раза за период вегетации. Создание особых посадок растений специально для их оценки на устойчивость к жукам, как правило, не требуется.

Большинство показателей заселенности и поврежденности растений жуками, предлагаемых в качестве основных критериев устойчивости к ним растений, хорошо известны и понятны картофелеводам. Они соответствуют показателям, определяемым при обязательном контроле численности вредителей в целях сигнализации потребности и сроков проведения на картофеле истребительных мероприятий с учетом экономических порогов вредоносности (ЭПВ) насекомых. При оценке растений на устойчивость к вредителям соответствующие показатели должны определяться примерно в те же сроки (периоды), для которых по ним рассчитаны ЭПВ насекомых (таб. 12).

Таблица 12 - Экономические пороги вредоносности жесткокрылых вредителей на картофеле (Танский, 1988)

Виды вредителей	Сроки учета (фаза развития растений)	Экономический порог вредоносности
Колорадский жук	Всходы до 15 см высоты	Заселено жуками 5 % кустов
	Всходы до 25 см высоты*	5-10 жуков на 100 кустов; 10 кладок яиц на 10 кустов
	Бутонизация – начало цветения*	Заселено личинками 15% кустов
	После цветения*	То же 20% кустов
	В течение вегетации (любой срок)	20-30% поврежденных (уничтоженных) листьев**
28-точечная коровка	Всходы*	1-3 жука на 1 куст
	Цветение*	3-8 личинок на 1 куст; заселено личинками 10-15% кустов

\*Предлагаются и в качестве оптимальных сроков проведения

обследований наборов образцов растений при их полевой оценке на устойчивость к вредителям.

\*\*В среднем соответствует 2-му баллу поврежденности ботвы по шкале ВИЗР (потеря 10-25% общей площади листьев на растении).

Примечание. ЭПВ колорадского жука и эпипляхны приведены в виде средних значений, без учета сортовых и зональных особенностей. Значения ЭПВ для сортов с разной степенью устойчивости к вредителям могут существенно различаться, однако, за редким исключением, не уточнены.

### **Общие требования к полевой оценке устойчивости образцов растений**

1. Одну оценочную группу образцов растений может составлять только набор образцов, выращиваемых в одинаковых условиях одного поля, на одинаковом агрофоне и при условиях единообразия технологических операций по уходу за растениями для всей данной группы образцов. Наборы образцов, выращиваемые разобщенно, могут являться только независимыми оценочными группами. Наборы образцов разных культур (картофель, баклажан, томат и др.) являются независимыми оценочными группами в любом случае.

2. Все показатели для каждого образца оценочной группы определяются не менее чем в 4-кратной повторности; максимум не ограничен.

Повторностями являются:

- в условиях сортоиспытания, где каждый сорт высаживается в 4 повторностях на стандартных делянках площадью по 25 м<sup>2</sup> каждая – 1 рядок (не крайний) делянки сортоиспытательного участка;

- в условиях семеноводства (или сортоизучения при посадках разных образцов растений на сравнительно крупных делянках) – пробная площадка или фрагмент рядка в 10-20 кустов; такие площадки при каждом обследовании образцов выбираются в пределах массива любого образца произвольно, но по возможности равномерно;

- в условиях мелкоделяночных селекционных, а также коллекционных посадок, создаваемых при географическом изучении массовых коллекций растительных ресурсов на станциях ВИР и в крупных селекционных центрах, в которых

каждый образец обычно представлен всего 6-10 растениями, повторностью является 1 куст. При этом осматривают все растения каждого образца из числа намеченных для сравнительной оценки на устойчивость к вредителям, и данные наблюдений по любому показателю (для последующего расчета средних значений по каждому образцу) записывают в полевой журнал для каждого растения в отдельности.

3. Заключение об устойчивости к вредителям тех или иных образцов даются по результатам статистической обработки данных, полученных по всем показателям, по которым проведена оценка.

### **Оценка устойчивости растений по показателям заселенности и поврежденности растений вредителями**

Показатели используются в качестве прямых критериев устойчивости сортообразцов к колорадскому жуку и эпипляхне. Проводится на фоне естественного заселения посадок растений жуками.

\*1. Среднее число перезимовавших жуков (имаго). Рассчитывается на одинаковое число кустов, обычно на 10 или 100 растений. Определяется один раз за сезон - в период от полных всходов до массовой бутонизации.

\*2. Среднее число кладок яиц на 1 куст. Определяется тогда же. Листья осматривают снизу. При этом фиксируют как общее число кладок яиц на каждой пробной площадке (повторности), так и число кладок с проявлениями некроза тканей листьев под яйцами колорадского жука для расчета следующего показателя.

3. Процент кладок яиц с признаками некроза тканей листа под ними.

4. Средняя численность личинок 3-4 возрастов. Определяется один раз - в период начала цветения картофеля. Рассчитывается на 1 куст, причем в расчет берутся все осмотренные растения, а не только те, на которых обнаружены личинки. Для этого при осмотре каждой пробной площадки необходимо отмечать для каждого куста условный балл количества личинок, оцениваемый визуально по шкале ВИЗР (таб. 13).

5. Средняя доля (%) кустов с большим количеством личинок 2-4-го возрастов - свыше 20 штук для картофеля и 10 штук для

овощных культур (соответственно с 3-5-м и 2-5-м условными баллами численности согласно таблице 13). Срок определения тот же. Расчет по данным регистрации показателя №4.

Таблица 13 - Шкала условных баллов количества личинок колорадского жука на листьях растений

Балл численности личинок 3 и 4-го возрастов	Градация количества личинок на одном кусте картофеля, особей	Условное среднее число личинок на 1 кусте (для расчетов), особей/куст
0	0	0
1	1-10	5
2	11-20	15
3	21-30	25
4	31-50	40
5	более 50	60

\*6. Средняя доля (%) кустов, заселенных личинками любых возрастов, от общего числа растений. Показатель определяется: на картофеле дважды (в периоды начала и окончания цветения большинства сортов картофеля), на овощных пасленовых культурах трижды (тогда же и через 10-15 дней после второго учета); первый учет совпадает со сроком определения показателя №4.

\*7. Средний балл поврежденности листового аппарата. Сроки определения как для показателя №6. Для расчета этого показателя также необходимо отметить балл поврежденности каждого куста на пробной площадке (повторности), оцениваемый визуально по шкале ВИЗР:

- 0 - отсутствие видимых повреждений листового аппарата;
- 1 - потеряно не более 10% общей площади листьев куста картофеля;
- 2 - потеряно от 11 до 25% площади листьев;
- 3 - потеряно от 26 до 50% площади листьев;
- 4 - потеряно от 51 до 80% площади листьев;
- 5 - потеряно более 80% площади листьев.

8. Средний процент кустов с высокими (3-5) баллами поврежденности ботвы - потерей свыше 25% площади листьев (по аналогичной визуальной оценке в те же сроки).

\*9. Средняя численность жуков (имаго) молодого летнего поколения. Рассчитывается на 1 или 10 кустов. Определяется: на картофеле - один раз, по окончании цветения большинства его сортов (одновременно со вторым обследованием образцов по показателям № 6-8); на овощных пасленовых культурах - также повторно, спустя 10-15 дней после первого учета.

10. Доля (%) жуков молодого поколения, обнаруженных на плодах. Показатель используется только при оценке овощных культур (баклажан, томат, перец, физалис). Определяется дважды, как предыдущий показатель (№9).

\*11. Доля (%) кустов, не заселенных вредителем и без видимых повреждений (0 балл). Определяется: на картофеле - дважды, на овощных культурах - трижды, в сроки обследований сортообразцов по показателям № 4-10.

Примечания. Все перечисленные выше показатели являются экологически зависимыми, и ни один из них, взятый в отдельности, не может являться объективной характеристикой устойчивости сортообразца. Оценка должна быть проведена только по совокупности показателей (не менее 4-5 критериев).

\*При проведении государственного сортоиспытания достаточно использовать только критерии № 1, 2, 6, 7, 9 и 11, отмеченные выше звездочками.

При конкурсном сортоиспытании в селекционных центрах оценку образцов желательно вести по всем 11 критериям, описанным выше.

При массовой оценке коллекционных и селекционных образцов в условиях мелкоделяночных посадок не следует применять критерии № 5 и 8, а показатель №9 не применять на картофеле (использовать только при оценке овощных культур).

При оценке растений на устойчивость к коровке-эпиляхне не рекомендуется использовать также критерии №2 и №3 ввиду плохой визуальной различимости одиночных серых яиц коровки на фоне зеленых листьев растений.

## **Предварительная оценка образцов по косвенным критериям устойчивости**

В некоторых случаях, особенно при отсутствии вредителей в пункте (зоне) расположения селекцентра или размещения сортоиспытательного (коллекционного) участка, полезно использовать косвенные критерии устойчивости, к которым относятся следующие морфологические и физиолого-биохимические параметры растений:

- среднее число глазков на клубне (картофель);
- среднее число стеблей на кусте (картофель);
- толщина листовой пластинки, мкм (измеряется по периферии долек 3-4-го листа с помощью микрометра непосредственно в поле, без срезания листьев);
- продолжительность периода вегетации, дни;
- продолжительность периода от окончания цветения до начала увядания листьев (картофель);
- содержание гликоалкалоидов в листьях растений (лабораторный метод; описание см. ниже).

Названные показатели, как и предыдущие, должны использоваться только в совокупности. Их применение позволяет отбирать с высокой степенью вероятности предположительно устойчивые к вредителям образцы на всех этапах селекции и конкурсного испытания. Первые три из названных параметров в условиях мелкоделяночных коллекционных посадок определяют у всех растений каждого образца. При наличии более крупных делянок они должны определяться по данным измерений либо осмотров 30-50 растений каждого образца. Продолжительность периода вегетации растений и его отдельных этапов определяют по методикам, принятым в растениеводстве.

При проведении статистической обработки данных значения тех из названных выше критериев устойчивости, которые соответствуют показателям, приведенным в таблице 12 (об экономических порогах вредоносности колорадского жука и эпипляхны), полезно выражать как в абсолютных значениях, так и в долях или процентах по отношению к величине ЭПВ вредителя по данному показателю. Такой подход наглядно характеризует наличие или отсутствие потребностей в проведении истребительных мероприятий против вредителей на посадках

устойчивых сортов растений в данной зоне картофелеводства и овощеводства.

**Задание 1.** Определить выживаемость (смертность) личинок и куколок колорадского жука. Показатели рождаемости, смертности и продолжительности развития относят к основным популяционно-динамическим характеристикам живых организмов. По изменениям этих показателей судят о силе и глубине воздействия тех или иных факторов среды на популяции организмов. Данные показатели могут быть определены в лабораторных или вегетационных опытах.

Описываемый ниже тест на выживаемость личинок, несмотря на относительную трудоемкость, весьма эффективен при отборе источников устойчивости среди коллекционных образцов дикорастущих видов картофеля для последующего включения в селекционный процесс в качестве родительских форм. В подобных случаях достаточно использовать только показатель выживаемости (или смертности) личинок, даже взятый в отдельности. С другой стороны, при оценке наборов культурных сортов картофеля или баклажана данный критерий, как правило, значительно менее объективен.

*Материалы и оборудование.* Чашки Петри (для всех работ с колорадским жуком следует использовать только пластмассовые чашки диаметром 90 мм, имеющие уступы по бокам нижней стороны крышки, что обеспечивает вентиляцию внутреннего объема) с кружками фильтровальной бумаги. Сосуды объемом 0,2-0,3 л, которые закрывают бязью или крышками с мелкими отверстиями. На дно этих сосудов насыпают слой сухих древесных опилок или измельченной древесной стружки толщиной около трети высоты сосуда. Сбор листьев изучаемых сортов картофеля.

*Методика выполнения работы.* Для постановки лабораторных опытов по определению показателей выживаемости используют личинок, которых выводят из кладок яиц, отложенных жуками любой генерации. Кладки собирают на местных картофельных полях, выбраковывая поврежденные и мелкие (содержащие менее 20 яиц). Собранные полноценные кладки содержат до выхода личинок в чашках Петри с кружками

фильтровальной бумаги. Чашки Петри осматривают не реже 2 раз в день, изымая при этом семьи отродившихся личинок (семья - это группа личинок, отродившаяся из одной кладки яиц). Для опытов пригодны только физиологически здоровые по внешним признакам семьи, у которых наблюдался практически одновременный выход личинок из всей кладки яиц при отрождаемости, близкой к 100%.

При закладке опыта личинок 1-го возраста подсаживают в чашки Петри на фрагменты листьев изучаемых сортов картофеля, уложенные на кружки увлажненной фильтровальной бумаги. Это позволяет менять или добавлять корм в чашки один раз в 2 дня. При каждом кормлении бумагу вновь увлажняют и по мере загрязнения заменяют. В каждую чашку, служащую повторностью опыта, помещают личинок из одной семьи в количестве 10-15 особей в вариантах с традиционными сортами и до 25 особей - с трансгенным сортом. В то же время разные повторности одного варианта заселяют личинками только из разных семей, что важно для обеспечения репрезентативности выборки по показателям генетического полиморфизма популяции колорадского жука. Повторность опыта в каждом варианте 5-6-кратная.

В чашках Петри личинок выкармливают до перехода в 4-й возраст, после чего всех выживших личинок пересаживают в сосуды объемом 0,2-0,3 л, которые закрывают бязью или крышками с мелкими отверстиями. Для обеспечения оптимальных условий окукливания личинок и развития куколок на дно этих сосудов насыпают слой сухих древесных опилок или измельченной древесной стружки толщиной около трети высоты сосуда.

В каждой повторности всех вариантов опыта отмечают дату его закладки и исходное число подсаженных личинок. При учетах в каждой повторности регулярно отмечают количество живых и погибших личинок, их возраст и количество окрылившихся молодых жуков. Наблюдения ведут до естественного окончания опыта в том или ином варианте - до полной гибели личинок или окончания выхода жуков нового поколения. Учеты проводят один раз в 2 дня, совмещая очередные учеты со сменой корма и пересадкой личинок 4-го

возраста из чашек Петри в сосуды с опилками.

На основании полученных данных для каждого варианта опыта рассчитывают следующие средние показатели, которые относят к исходному числу личинок 1 возраста:

- % выживших личинок 2-го возраста;
- то же для личинок 3-го возраста;
- то же для младших личинок 4-го возраста (на следующий день после линьки на этот возраст);
- то же для взрослых личинок 4-го возраста (при достижении длины 12-15 мм и принятии более светлой окраски, свидетельствующих о наступлении стадии предкуколки);
- % окрылившихся имаго.

У окрылившихся в этих опытах имаго измеряют среднюю массу тела для каждого варианта (сортообразца), проводя индивидуальные взвешивания не питавшихся особей в первые сутки после их окрыления.

Наиболее устойчивые формы растений характеризуются по сравнению с другими вариантами опыта: минимальным процентом выживших особей на том или ином этапе развития по отношению к исходному числу подсаженных личинок; минимальными значениями средней массы тела личинок одинакового возраста и окрылившихся имаго; максимальным процентом погибших особей. В частности, получение нулевой выживаемости (гибель 100% личинок), особенно на ранних стадиях их развития, наиболее надежный критерий высокой степени устойчивости образца к вредителю.

**Задание 2.** Провести измерение средней массы тела личинок, куколок и имаго колорадского жука.

*Материалы и оборудование.* Торсионные весы ВТ-500, лабораторные весы ВЛКТ-500-М. Чашки Петри с кружками фильтровальной бумаги. Сосуды объемом 0,2-0,3 л, для окукливания. Сбор листьев изучаемых сортов картофеля.

*Методика проведения работы.* Средняя масса тела насекомых определяется у одновозрастных особей окрылившихся имаго нового поколения или наиболее старших личинок 4-го возраста, развившихся в полевых условиях или в описанных выше лабораторных опытах при питании листьями

исследуемых сортов картофеля. Если проводится лабораторный опыт, описанный выше, массу тела можно определять и у куколок, которых нетрудно выкопать из опилок в банках, а после взвешивания поместить обратно. Средняя масса тела личинок одинакового возраста, предкуколок, куколок или не питавшихся имаго молодого поколения (либо питавшихся в течение одинакового промежутка времени) является одним из показателей, характеризующих влияние сорта кормового растения на преимагинальное развитие фитофага. Для ее определения проводят индивидуальные взвешивания не менее чем по 30 особей на весах любого типа, имеющих миллиграммовый диапазон измерений. Результаты взвешиваний подвергаются статистической обработке (предпочтителен дисперсионный анализ) в соответствии с руководствами по биометрии. Более устойчивые образцы растений характеризуются меньшими показателями средней массы тела личинок, куколок и окрылившихся молодых имаго.

**Задание 3.** Количественное определение содержания гликоалкалоидов в листьях растений (ускоренный метод, разработанный Е.А. Тукало и Г.Н. Царик, 1970).

*Материалы и оборудование.* Водяная баня, весы аналитические, фотоэлектроколориметр (ФЭК), конические колбы на 50 и 100 мл, обратный холодильник (стеклянный), мерные колбы на 25 и 50 мл, делительные воронки, пипетки.

*Реактивы.*

1. Уксусная кислота 2%-я.
2. Соляная кислота концентрированная.
3. Едкий натр NaOH: 50% и 1% растворы.
4. Метиловый оранжевый – 0,05% водный раствор.
5. Хлороформ (аптечный).
6. Цитратно-фосфатный буфер с pH 7,4: на 500 мл воды берется 10,5 г лимонной кислоты и 17,8 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$ .
7. Томатин или иной гликоалкалоид пасленовых растений в сухом виде (чистый).

*Методика проведения работы.* Существует два варианта проведения анализа образцов.

- 1) Свежие листья. Навеску 3 г свежих листьев переносят в

коническую колбу на 100 мл и заливают 100 мл 2% уксусной кислоты. Экстрагирование проводят на кипящей водяной бане в течение 1 часа при постоянном перемешивании.

2) Фиксированный материал. Свежие листья (3-5 г) исследуемых образцов сразу после взятия их с растений помещают в плотно закрывающиеся склянки и заливают 2% уксусной кислотой, чтобы сверху они были ею покрыты. Материал можно хранить в холодильнике в течение 1-2 месяцев.

Далее ход анализа одинаков. Берется 10 мл фильтрата (после экстрагирования экстракт фильтруется), к которому прибавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты. Ставится на гидролиз в течение 45 минут в кипящую водяную баню с обратным холодильником. Далее рН смеси доводят до 4 сначала 50%-м, затем 1%-м раствором едкого натра.

Затем 10 мл полученного раствора переносят в делительную воронку, добавляют 2 мл 0,05% раствора метилового оранжевого (индикатор), перемешивают в течение 1 минуты и полученное окрашенное соединение экстрагируют 3 раза хлороформом, порциями по 5 мл. Хлороформные экстракты собирают в мерную колбу на 25 мл, доводят до метки хлороформом и фильтруют. Величину оптической плотности окрашенных растворов измеряют на ФЭК при синем светофильтре. Количество томатина в пробе определяют с помощью калибровочного графика, построенного заранее.

Построение калибровочного графика.

Навеску томатина в количестве 50 мг растворяют в хлороформе в мерной колбе на 50 мл. Затем в 4 делительные воронки вносят соответственно по 0,2; 0,4; 0,5 и 0,6 мл приготовленного раствора томатина и по 3 мл 0,05% водного раствора метилового оранжевого; рН полученной смеси доводят до 4 (как в опыте). Образовавшееся окрашенное соединение экстрагируют хлороформом порциями по 5 мл. Хлороформные экстракты собирают в колбу на 25 мл и доводят до метки хлороформом. Оптическую плотность окрашенных растворов измеряют на ФЭК против хлороформа.

Наибольшая концентрация томатина обнаружена у ряда дикорастущих видов картофеля и некоторых гибридов (58-59

условных %). У устойчивых к колорадскому жуку культурных сортов она обычно не превышает 34 усл. % (Зарево), у неустойчивых сортов - 13-15 усл. % (Лорх).

Учитывая результаты исследований на томате, где показана прямая связь устойчивости, обусловленной томатином, к фитофторозу, можно полагать, что по содержанию томатина или его аналогов возможно проведение оценки сортов пасленовых культур на комплексную устойчивость к вредителям и болезням.

## Тема 2 МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Устойчивость растений обусловлена комплексным действием разных факторов. Механизмы или факторы устойчивости можно подразделить на две группы:

- факторы, действующие до заражения (преинфекционные);
- факторы, действующие после заражения (постинфекционные).

Факторы (механизмы) устойчивости первой группы присутствуют в растении независимо от поражения, второй — индуцируются возбудителями (к этой группе относится и изменение активности генов). Среди факторов, действующих до заражения, можно выделить *анатомо-морфологические, физические и химические*.

**Габитус растений.** Начальный этап заболевания (проращение спор) в большинстве случаев требует наличия капельно-жидкой влаги на поверхности растений. Проращению спор благоприятствует также высокая влажность воздуха. В связи с этим габитус растения может создавать благоприятные условия для заражения, если он способствует сохранению высокой влажности окружающего воздуха и позволяет каплям воды задерживаться на поверхности надземных органов растения. Так, сорта картофеля с рыхлым кустом менее подвержены заражению фитофторозом, чем сорта с плотным кустом, хотя при искусственном заражении листьев связи между габитусом куста и поражаемостью нет. Отсутствие различий объясняется

тем, что период увлажнения, необходимый для заражения надземных частей растений, у сортов с раскидистым кустом короче, чем у сортов с плотными надземными эпидермальными тканями. Ризодермис, как правило, является более легким барьером для проникновения многих видов грибов в корень.

**Опушенность листьев.** Сорта картофеля с сильноопушенными листьями менее подвержены вирусным болезням, чем сорта со слабым опушением. Это обусловлено более слабым посещением опушенных растений тлями — переносчиками вирусов из-за менее благоприятных условий для питания.

**Толстый кутикулярный слой.** Фактором, препятствующим поражению растения различными заболеваниями, может служить толщина кутикулярного слоя. Так, у сортов крыжовника, устойчивых к мучнистой росе, толщина кутикулы молодых листьев 1,05...1,26 мкм, а у восприимчивых сортов — 0,51...0,64 мкм. У сортов барбариса, неустойчивых к ржавчине, толщина кутикулярного слоя у листьев составляет вместе с эпидермисом 0,82 мкм, тогда как у устойчивых сортов — 1,75 мкм.

**Строение и расположение устьиц и чечевичек.** Возможность заражения растений некоторыми патогенами зависит от числа и строения устьиц и чечевичек. Закрытые устьица и чечевички задерживают заражение растений патогенами. Мандарин более устойчив к возбудителю бактериального рака *Xanthomonas citri*, чем грейпфрут, потому что наружные стенки устьиц мандарина снабжены выступами, препятствующими проникновению в подустичную щель капель жидкости с находящимися в них клетками бактерий.

**Восковой налет.** Наличие его придает поверхности органов растения гидрофобные свойства, что затрудняет ее смачивание и препятствует прорастанию спор. Восковой налет задерживает поступление питательных веществ, которые могут способствовать росту возбудителей на поверхности растения. Каплеудерживающую способность листьев пшеницы часто используют как один из показателей ее устойчивости к бурой листовой ржавчине.

**Особенности строения цветка.** Длина пыльника, характер цветения (открытое или закрытое), его продолжительность и т. д.

играют роль в устойчивости к патогенам, заражающим растения во время цветения (например, возбудителям пыльной головни пшеницы, ржи, ячменя и др.).

**Анатомические особенности внутренних тканей** оказывают существенное влияние на устойчивость растений. Например, восприимчивые к стеблевой ржавчине сорта пшеницы имеют развитую хлоренхиму, которая залегает под эпидермисом широкими тяжами, в то время как у устойчивых сортов эта ткань имеет вид островков, недоступных для колонизации патогенов. Одревесневшая эндодерма корней, особенно у однодольных, представляет для многих видов грибов, например рода *Fusarium*, физический барьер, препятствующий их проникновению в растение.

**Пробковый слой.** Играет важную роль в устойчивости растений на этапе внедрения патогенов. Например, грибы родов *Fusarium*, *Phytophthora infestans* и некоторые бактерии слабее поражают клубни картофеля с хорошо развитым пробковым слоем.

## **Лабораторная работа № 5 ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА РАСТЕНИЙ**

**Задание 1.** Провести заражение растений пшеницы в фазе 1-2 листьев возбудителем мучнистой росы (*Erysiphe graminis* f. *tritici*).

*Материалы и оборудование.* Вата или марля. Суспензия конидий мучнистой росы. Полиэтиленовые мешки.

*Методика проведения работы.* Влажной ватой или марлей снимают восковой налет с листьев. На контрольных растениях такой операции не проводят. Затем растения опрыскивают суспензией конидий мучнистой росы и покрывают полиэтиленовыми мешками. Через 5-6 дней подсчитывают число подушечек с мицелием и конидиальным спороношением на листьях пшеницы с удаленным восковым налетом и с контрольных. Результаты систематизируют и записывают в таблицу 14.

Таблица 14 - Заражение пшеницы возбудителем мучнистой росы

Вариант	№ листа	Характеристика поражений		Примечание
		Число подушечек, шт	Размер, мм	

**Задание 2.** Провести анатомический анализ толщины кутикулярного слоя и размера прилегающих клеток паренхимы и установить различия у сортов яблони: восприимчивых (Бельфлёр, Китайка, Боровинка) и устойчивых (Славянка, Антоновка) к парше *Venturia inaequalis*.

*Материалы и оборудование.* Объект-микрометр (цена деления 0,01 мм или 10 мкм.), окуляр-микрометр, микроскоп, предметные стекла, скальпели. Краситель Судан III.

*Методика проведения работы.* Установить цену деления окулярного микрометра, используя объект-микрометр, цена деления которого равна 0,01 мм или 10 мкм. Для этого объект-микрометр помещают на предметный столик микроскопа, а окуляр-микрометр вставляют внутрь окуляра делениями вниз. Затем совмещают их шкалы и устанавливают, сколько делений окуляр-микрометра укладывается на шкале объект-микрометра. Например, 50 делений окуляра-микрометра укладывается в 20 делений объекта-микрометра, следовательно, одно деление: 10х20 окуляра-микрометра (цена деления) составит: 4 мкм. После определения цены деления объект-микрометр убирают и вместо него на столик микроскопа помещают препарат со срезами плодов. Для приготовления препаратов делают несколько тонких радиальных срезов через кутикулу плода. Их помещают на предметное стекло в каплю воды и окрашивают красителем на кутикулу (Судан III). С помощью окуляра-микрометра измеряют толщину кутикулы (не менее чем в 10 местах срезов) и определяют размер поверхностных клеток паренхимы.

Полученные данные измерений (в делениях окулярного микрометра) для выражения их в микрометрах умножают на цену деления. Результаты анализа всей группы студентов обобщают в таблице 15.

**Задание 3.** Провести измерение кислотности клеточного сока (рН) из плодов устойчивого и восприимчивого сортов яблони на рН-метре. Результаты внести в таблицу 15.

Таблица 15 - Анализ толщины кутикулы, размера прилегающих клеток паренхимы и кислотности клеточного сока

Сорт	Факторы устойчивости											
	Толщина кутикулы, мкм					Размер поверхностных клеток паренхимы, мкм					РН клеточного сока	
	1	2	3	4	5	среднее	1	2	3	4	5	среднее

### **Тема 3 ОЦЕНКА РАСТЕНИЙ НА ИНФЕКЦИОННЫХ ФОНАХ И МЕТОДЫ ИХ ОРГАНИЗАЦИИ**

#### **Оценка растений на инфекционном фоне**

Интенсивная селекция растений на иммунитет невозможна без регулярной оценки селекционного материала на устойчивость к болезням и вредителям. Оценка устойчивости в естественных условиях имеет очень большое значение, однако благоприятные для размножения патогенов условия складываются не каждый год. Вследствие этого оценка образцов и отбор устойчивых форм растягиваются на несколько лет, а сам селекционный процесс чрезвычайно замедляется. Кроме того, в естественной популяции могут отсутствовать потенциально опасные расы, к которым ведется перспективная селекция.

В связи с этим целесообразно оценивать селекционный

материал с помощью специально созданных популяций возбудителей болезней или вредителей в оптимальных условиях развития болезни или повреждения растений. Эти приемы носят общее название «инфекционный фон».

### **Виды фонов**

*Инфекционный фон* подразумевает наличие инфекции, способной вызвать заражение растений, и условий, обеспечивающих успех развития болезни или вредителя.

В соответствии с особенностями организации можно выделить несколько разновидностей фонов:

- провокационный;
- инфекционный (естественный и искусственный);
- инвазионный.

*Провокационным фоном* называют прием, при котором создают условия для оптимального развития патогенов, но пропагулы дополнительно не вносят на участок. Для создания провокационного фона испытуемый материал может быть размещен на участках с оптимальным микроклиматом для проявления болезни. Например, для испытания зерновых на устойчивость к снежной плесени полезно размещать питомники в низинах, где скапливается снег и весной затягивается таяние. Для оценки на устойчивость к фитофторе, мучнистым и ложномучнисто-росяным грибам делянки могут быть размещены около водоемов, в низинах, под защитой лесополос. Это способствует повышению влажности, регулярному выпадению рос и приводит к сильному развитию болезней.

Кроме того, провокационный фон может быть создан с помощью агротехнических приемов, способствующих проникновению патогенов, а также развитию заболеваний и размножению вредителей. Например, для оценки устойчивости к возбудителям твердой головни и корневой гнили семена злаков сеют на большую глубину и в более ранние сроки, чем обычно. Замедленное прорастание растений при пониженной температуре усиливает поражение проростков. Редкий и поздний посев способствует сильному поражению пшеницы шведской мухой. Внесение азотных удобрений в повышенных дозах приводит к увеличению поражения всеми видами ржавчины, мучнистой росой, корневой гнилью. Немаловажную роль при этом играет

высокая влажность почвы и воздуха, способствующая прорастанию спор. Возможны комбинации различных приемов. Например, для оценки устойчивости кукурузы к стеблевым гнилям практикуют загущенный посев и перестой созревших растений.

Однако чаще для более надежного поражения растений специально размножают или дополнительно вносят пропагулы, то есть создают инфекционный фон. Инфекционные фоны подразделяются на естественные и искусственные.

*Естественный инфекционный фон* может быть создан при бессменном возделывании культуры на одном участке. Так, при многолетнем возделывании картофеля без севооборота на одном участке в почве накапливается комплекс возбудителей заболеваний этой культуры. Такой фон, как правило, создают для почвенных патогенов: возбудителей увядания, корневых гнилей и др. Так как почва является естественным местом обитания возбудителей этих болезней, то жизнеспособность патогенов в ней сохраняется долго, что обеспечивает возможность длительного использования инфекционного фона.

*Искусственные фоны* предполагают специальное размножение микроорганизмов или накопление вредителей в лабораторных условиях и последующее заражение (заселение) растений. Фон для оценки устойчивости растений к вредителям называют *инвазионным*.

### **Организация инфекционных фонов**

Для создания и поддержания эффективных инфекционных фонов требуются постоянные усилия, кроме того, такие участки могут быть источниками инфекции или вредителей для других посевов. Поэтому существуют определенные правила их организации. В соответствии с методическими рекомендациями ВИРа иммунологическую оценку сортов сельскохозяйственных культур на искусственных инфекционных и провокационных фонах проводят на специальных энтомофитопатологических участках (ЭФУ). Участок должен быть изолирован от общих посевов лесополосой или кулисной культурой, максимально удален от конкурсного сортоиспытания, семеноводческих и производственных посевов. Для предотвращения заноса

аэрогенной инфекции инфекционные питомники располагают в таких местах, где ветры, господствующие в период вегетации, направлены от семеноводческих и производственных посевов.

На ЭФУ вводят отдельный севооборот. Опыты с искусственным заражением возбудителями болезней надземных органов проводят в соответствующем поле севооборота, отводя под них центральную часть поля, остальную площадь занимают уравнительными посевами этой же культуры. В следующем году в соответствии с севооборотом делянки с искусственным заражением переносят на другое поле. Опыты с корневыми гнилями, пузырчатой головней и стеблевыми гнилями кукурузы закладывают при монокультуре на выводном клине. Для предотвращения распространения инфекции с территории энтомофитоучастка стерилизуют инвентарь, использованный для размножения и внесения инфекционного материала, на территории участка, где закладывали опыт, уничтожают послеуборочные остатки.

По технологии создания фоны можно разделить на постоянные и временные.

*Постоянные фоны*, как правило, создают для почвенных патогенов, хорошо сохраняющихся в почве, например грибов, почвенных нематод, паразитических растений. В некоторых случаях постоянные фоны организуют для патогенов, которым для прохождения отдельных стадий жизненного цикла нужен промежуточный хозяин. Например, барбарис — промежуточный хозяин для возбудителя стеблевой ржавчины, на его листьях проходит половая стадия гриба. Постоянные фоны для стеблевой ржавчины обсаживают кустами барбариса.

*Временные фоны* подразумевают ежегодное внесение инфекции. Так организуют фоны для оценки поражения растений ржавчинными и мучнисто-росяными грибами, вредителями.

Промежуточное положение занимают так называемые *зеленые конвейеры*, то есть комплексы озимых и яровых культур, на которых инфекция накапливается и переходит с одной культуры на другую в течение сезона. Так, ржавчинные и мучнисто-росяные грибы перезимовывают на озимых и рано начинают циклы размножения, накрывая яровые культуры. После уборки яровых грибы опять переходят на озимые формы.

Зеленый конвейер эффективен для накопления гессенской, шведской, яровой и пшеничной мух, при этом более молодые растения играют роль приманочных посевов для насекомых.

Схема размещения образцов зависит от этапа селекции, а также метода оценки образцов. Как правило, инфекционный фон для соответствующего патогена обсевают восприимчивым *сортом-накопителем* инфекции, возможен посев восприимчивых растений и внутри питомников. Сорт-накопитель можно заранее посеять в ящиках или сосудах и предварительно заразить патогеном. В нужный момент ящики (сосуды) выставляют в инфекционный питомник, возможно их перемещение по участку. Такие приемы создают более равномерное распределение инокулюма в питомнике и способствует более объективной оценке. Инфекционную нагрузку регулируют с помощью частоты размещения накопителя. Считается, что если 30 % площади инфекционного питомника занять сортом-накопителем, то это обеспечит сильный инфекционный фон.

Сорта-накопители должны поражаться только тем патогеном, который составляет инфекционный фон, и быть устойчивыми к другим. Так, для европейской части России в качестве сортов-накопителей для бурой ржавчины пшеницы могут быть использованы Мироновская 808 и Саратовская 29, для стеблевой ржавчины — Степняк и Фортуна, для пыльной головни — Харьковская 46.

Патоген естественным путем распространяется от зараженного накопителя по всему питомнику. Для более эффективного распространения инфекции полосы питомника надо располагать поперек господствующих ветров. По сравнению с непосредственным заражением всех образцов питомника этот способ дает возможность экономить инокулюм. Однако он пригоден только для микроорганизмов и вредителей, дающих несколько генераций в сезон: видов ржавчины, мучнистой росы, фитофторы, колорадского жука, тлей.

Для оценок на неспецифическую (горизонтальную) устойчивость и толерантность к аэрогенным патогенам применяют специальные *схемы размещения образцов*. Их идея основана на том, что основная масса спор оседает около места образования и распространение заболевания в пространстве на

сорте с неспецифической устойчивостью происходит медленнее, чем на восприимчивом. Снижение скорости распространения инфекции характеризует устойчивость сорта.

Используют два способа размещения образцов. Первый получил название *метода «центральной точки»* (central pivot), он предусматривает размещение делянок оцениваемых растений по секторам круга радиусом 50 м. В центре круга высевают восприимчивый сорт, на который наносят инфекцию (рис. 5).

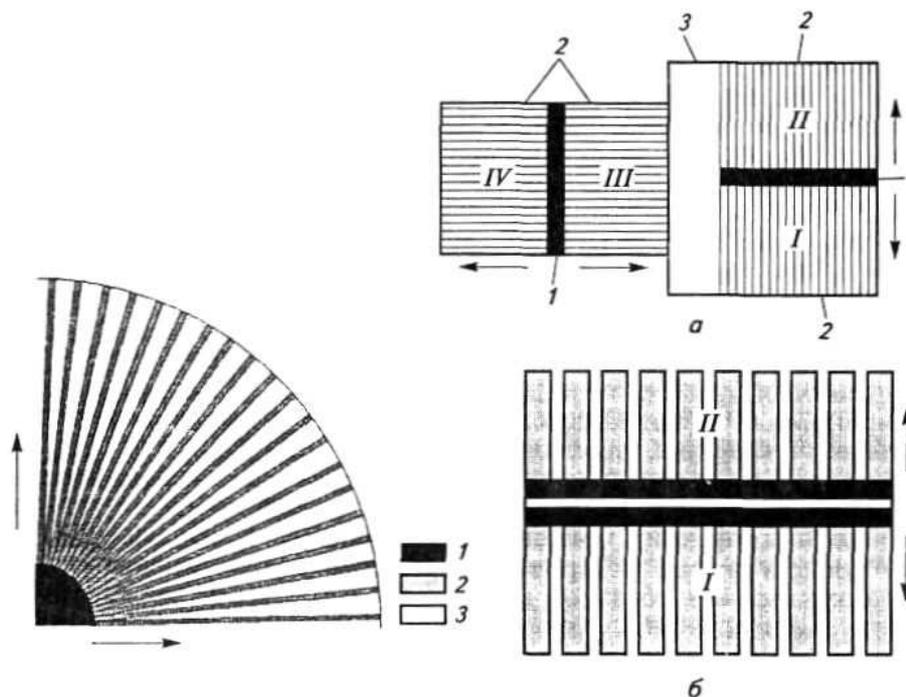


Рисунок 5 - Схема размещения образцов при оценке на горизонтальную устойчивость и толерантность: *А* - метод «центральной точки»; *Б* - прямоугольная модификация метода: *а* - общий план участка, *б* - размещение образцов в повторностях; *1* - восприимчивый сорт; *2* - испытываемые образцы; *3* - устойчивый сорт; *I...IV* - повторности; стрелками показано направление распространения инфекции

Между образцами высевают устойчивый сорт, чтобы воспрепятствовать переносу инфекции с образца на образец. Точность оценок обеспечивает четырехкратная повторность, каждое повторение расположено в одном из четырех секторов большого круга. Секторы ориентированы по сторонам света. Это создает равную возможность для заражения всех сортов вне зависимости от господствующих ветров. Весь участок и каждую

делянку на нем делят концентрическими окружностями на пять поясов. В пределах каждого такого отрезка проводят отдельную оценку. Для определения неспецифической устойчивости и толерантности сопоставляют результаты оценок в начале и конце делянки.

Позже была предложена более удобная модификация метода, основанная на прямоугольной конфигурации посева. Накопители располагают на вытянутой делянке, перпендикулярной к делянкам испытываемых сортов. Формируют четыре таких блока (повторности), ориентируя их по сторонам света.

### **Факторы, влияющие на результаты оценок**

Помимо устойчивости растений на результаты оценки влияют состояние популяции патогена и условия среды.

Для контроля качества инфекционного фона и влияния внешних факторов на участке размещают достаточное количество восприимчивых и устойчивых стандартов — индикаторов восприимчивости и устойчивости соответственно. По их поражению судят о достаточности условий среды для поражения растений, качестве и равномерности инфекционного фона на участке, а также о наличии условий для проявления механизмов иммунитета растений. Стандарты восприимчивости должны быть поражены не менее чем на 60%, иначе оценки не учитывают. Слабое и неравномерное поражение растений может быть результатом: плохого состояния популяции патогена (слабая жизнеспособность, малое количество инокулюма); жестких условий среды, подавивших развитие патогена; нарушений методики закладки опыта.

На результаты поражения растений влияет плотность инокулюма, которую называют инфекционной нагрузкой. *Инфекционная нагрузка* — количество инокулюма (бактерий, спор грибов, вирусных частиц и т. д.) на единице поверхности растения. Величина инфекционной нагрузки может иметь существенное значение для оценки устойчивости образцов. *Минимальная инфекционная нагрузка* — это количество инокулюма, которое может вызвать заражение. *Оптимальная инфекционная нагрузка* обеспечивает наибольшее число случаев

поражения. *Максимальная инфекционная нагрузка* показывает предельную величину, превышение которой приводит к подавлению симптомов поражения растения. При оценке устойчивости стремятся создавать оптимальную инфекционную нагрузку, которая даст наибольшее проявление болезни при данных условиях. Например, при заsporении семян пшеницы хламидоспорами твердой головки на 1 кг семян берут 1...10 г хламидоспор.

Величина оптимальной инфекционной нагрузки может меняться в зависимости от жизнеспособности инокулюма и агрессивности возбудителя, восприимчивости или устойчивости сорта и условий заражения. Оптимальную нагрузку можно установить, инокулируя сорт последовательно разводимой суспензией спор патогена. Концентрацию спор определяют в счетной камере под микроскопом. Зараженные растения выращивают до проявления симптомов болезни. По результатам заражения определяют оптимальную нагрузку, то есть такую, которая в данных условиях обеспечивает наибольшее число поражений.

Для получения достоверных сведений об устойчивости образцов оптимальная инфекционная нагрузка имеет большое значение. При слишком большой инфекционной нагрузке можно наблюдать взаимное подавление патогенов, в результате чего поражение будет уменьшаться. Слишком низкая инфекционная нагрузка не всегда может обеспечить процесс заражения. В этих случаях показатель устойчивости сорта может быть завышен.

Как правило, для заражения факультативными паразитами требуется более высокая инфекционная нагрузка, чем для заражения облигатными паразитами. Это связано с тем, что некротрофные организмы выделяют токсины, подавляющие иммунную систему и разрушающие клетки растений, только после этого патогены заселяют ткани. Количество токсинов, выделяемых в растительную ткань, пропорционально количеству инокулюма, участвующего в заражении. У облигатных паразитов для развития инфекционного процесса иногда может быть достаточно одной споры.

Успех заражения во многом зависит от метеорологических условий среды и агротехнических факторов. Так, для развития

снежной плесени необходима температура не выше 10°C. Высокие температуры и низкая влажность воздуха и почвы подавляют проникновение и развитие многих патогенных грибов и бактерий. При создании инфекционного фона необходимо обеспечить условия, максимально способствующие развитию заболевания или повреждению вредителем (температура, влажность, освещение, питание и т. д.).

Иногда для усиления поражения растений инфекционный фон сочетают с провокационным. Примером подобного сочетания может служить заражение ржавчиной на фоне больших доз азотных удобрений. Инфекционный фон при заражении озимой ржи снежной плесенью создают путем рассеивания инокулюма *Fusarium nivale* по всходам, его обязательно сочетают с наращиванием снежного покрова до высоты не менее 50 см для создания оптимальной температуры и влажности для развития гриба.

Важное требование к инфекционному фону — его равномерность. Для выравнивания фона при внесении инфекции применяют различные виды наполнителей, добиваются равномерного опрыскивания и опыливания растений, равномерного размещения на участке источников инокулюма, дозированного заселения каждого растения вредителем (определенным количеством экземпляров) и т.д. Для почвенных патогенов оказываются полезными уравнивательные посевы и многократное перепахивание почвы. Желательно также, чтобы участок был достаточно однороден по рельефу и плодородию.

Для повышения достоверности оценок в старших селекционных питомниках опыты закладывают в трех-четырёхкратных повторностях. Образцы в повторениях располагают методом рендомизации, группируя их по сроку созревания. Селекционный материал изучают в течение двух-трех лет.

### **Методы создания инфекционных и инвазионных фонов**

Инфекционные фоны могут быть созданы для оценки на устойчивость к одному вредному виду (простые фоны) или к нескольким видам (комбинированные фоны). Комбинированные фоны применяют только на ранних этапах селекции, на поздних

этапах (начиная с конкурсного сортоиспытания) для точной оценки устойчивости образцов к конкретному патогену необходимо использовать только простые фоны.

При создании комбинированных фонов нужно сочетать вредные организмы таким образом, чтобы развитие одного патогена не подавляло или не искажало развитие другого. Например, заражение мучнистой росой злаков не влияет на проявление головневых заболеваний. В то же время желтая ржавчина нарушает развитие головки пшеницы. Некоторые штаммы вирусной желтухи препятствуют развитию пероноспороза на сахарной свекле. Следует учитывать, что сильное развитие одного из совместимых патогенов также может подавить развитие другого, например, при сильном развитии мучнистой росы предотвращается накопление ржавчины из-за отсыхания листьев.

В зависимости от целей селекции и биологии патогена инфекционный фон создают на основе популяции патогена, смеси отдельных рас или инокулюма одной расы. По рекомендациям ВИЗРа и ВИРа для оценки устойчивости образцов к головневым заболеваниям, мучнистой росе, снежной плесени, корневым гнилям, аскохитозу гороха и вики используют инокулюм, полученный на основе местных популяций патогенов. В то же время для создания инфекционного фона на ржавчинные заболевания злаков и септориоз используют смесь высоковирулентных изолятов грибов. Инфекционный материал этих грибов создают в специализированных научно-исследовательских учреждениях (например, ВНИИ фитопатологии) и рассылают в регионы по предварительным заявкам селекционных учреждений. При подготовке инокулюма учитывают расовый и штаммовый состав популяции возбудителя в конкретном регионе, а также наиболее распространенные высоковирулентные изоляты грибов.

Конкретные методы создания фонов зависят от биологии патогенов и вредителей. Их можно разделить на несколько общих приемов: инфицирование почвы, инокуляцию органов растений и использование переносчиков (для вирусных заболеваний).

Инфицирование почвы. Этот прием используют для почвенных микроорганизмов, вредителей, нематод и растений-

паразитов. Инфекцию вносят с пораженными растительными остатками или в виде специально размноженных культур. Для равномерного распределения инокулюм может быть смешан с каким-нибудь видом наполнителя: почвой, соломенной резкой, измельченными листьями и т. д. Увеличения количества инфекции в почве достигают при многократном внесении в нее пораженных растительных остатков. Для накопления инфекции желательнее засеять участок высоковосприимчивым сортом (уравнительный посев) и запахать остатки, добиваясь равномерного распределения патогенов. Фон можно создавать и поддерживать за счет постоянного возделывания на одном участке восприимчивого сорта. Так создают фон для оценки льна и люпина на устойчивость к фузариозному увяданию, злаков — к корневым гнилям и снежной плесени, подсолнечника — к заразихе, капусты — к киле и т. д.

Инокуляция органов растений. При создании инфекционных фонов для некоторых болезней предпочтительнее не вносить инфекцию в почву, а инфицировать семена. Так, для заражения пшеницы твердой головней споры вносят в каждый пакет при подготовке семян к посеву. Для заражения ячменя и пленчатых сортов овса оболочку семян травмируют в размельчителе тканей РТ-3 или миксере и обрабатывают суспензией спор, приготовленной на жидкой питательной среде, содержащей пивное сусло, агар-агар и декстрин. После обработки семена подсушивают и используют для посева.

*Инокуляцию поверхности* растений осуществляют для создания инфекционного фона ко всем видам ржавчины, септориозу, мучнистой росе. В этом случае растения опрыскивают суспензией спор или опыливают спорами. При опыливании для равномерного распределения инфекции применяют наполнители (муку или тальк). Иногда в качестве наполнителя используют ткани больного растения, например, для заражения сахарной свеклы церкоспорозом берут измельченные пораженные листья. Для успешного заражения необходимо сохранение капель влаги не менее 6...9 ч при оптимальной для каждого вида гриба температуре (возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы — 18...22°C, желтой — 8...15 °C, бурой — 15...20°C, корончатой ржавчины овса — 15...18°C). Для

сохранения влаги делают влажную камеру — накрывают делянки полиэтиленовой пленкой.

*Заражение цветков* применяют прежде всего для возбудителей пыльной головки злаков. Для этого используют сухие хламидоспоры или суспензии спор. В первом случае инокулюм наносят на предварительно подготовленный колос с подрезанными колосками с помощью кисточки, натираем головневый колосом или стряхиванием спор. Суспензию спор вводят в колоски с помощью пипетки или медицинского шприца (шприц-метод). Для более быстрого выполнения работы применяют прибор, предложенный Кривченко (рис. 6). В этом случае колосья помещают в цилиндр, из которого откачивают воздух, при этом в колос и в полость колосков закачивается суспензия спор из колбы.

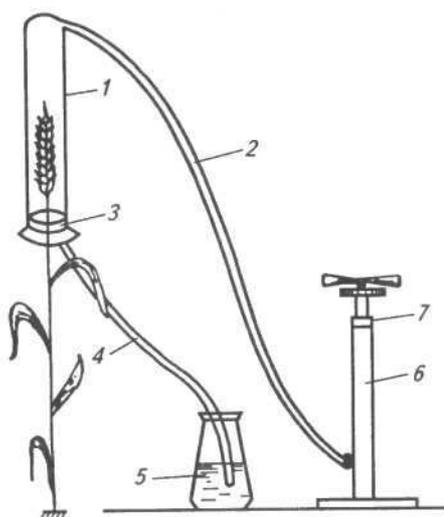


Рисунок 6 - Аппарат для инокуляции пшеницы и ячменя спорами пыльной головки (по Кривченко, 1985): 1 — стеклянный цилиндр; 2 — трубка для откачивания воздуха; 3 — вакуумная зажимная пробка; 4 — шланг для подачи суспензии спор; 5 — сосуд для суспензии спор; 6 — насос; 7 — резиновое кольцо

В некоторых случаях инокулюм вводят непосредственно в *ткань* или *полость органа*. Так, для заражения кукурузы фузариозом и стеблевой гнилью в початки или в стебель вводят деревянные палочки, обработанные суспензией спор. Для

инокуляции кукурузы пузырчатой головней делают инъекцию суспензии спор в верхушку растений или в верхнюю пустую часть початка. Для оценки устойчивости картофеля к кольцевой гнили суспензию бактерий вводят в высечку, сделанную в столонной части клубня.

Заражение возбудителями вирусных заболеваний, распространяющихся механическим путем (например, ВТМ), можно осуществить путем втирания сока больного растения или очищенного препарата вируса в лист. Эффективность заражения повышается при предварительном легком травмировании поверхности растений с помощью наждачного порошка или песка. Для переноса некоторых вирусов (например, X-вируса картофеля) применяют *прививку* участка больного растения.

Использование переносчиков. Для многих вирусов свойственно распространение в природе с помощью векторов (тлей, цикадок, клещей, почвенных грибов). Для оценки устойчивости к вирусным заболеваниям на участке создают условия для привлечения и размножения переносчиков. Например, для создания устойчивой цепи переноса вирусов злаки размещают после злаков, в севообороты вводят культуры, привлекающие векторных переносчиков.

Некоторые узкоспециализированные вирусы имеют определенного переносчика, его используют для заражения растений соответствующим видом вируса. Для инфицирования подобными вирусами проводят специальное размножение и заражение переносчиков (цикадок, тлей).

При создании любых инфекционных фонов (включая инвазионные) способ и время заражения должны быть максимально приближены к биологическим особенностям микроорганизмов и вредителей. Мучнистой росой и желтой ржавчиной пшеницы лучше всего заражать растения после выхода в трубку, стеблевой и бурой ржавчиной — от фазы выхода в трубку до колошения, пыльной головней — через 3...4 дня после колошения. Для хорошего проявления болезни или повреждения условия культивирования инфицированных растений должны соответствовать потребностям вредных организмов.

Для объективной оценки количество пораженных

(поврежденных) растений или органов должно быть достаточно большим. Конкретное число растений или органов определяют в соответствии с методическими рекомендациями для каждой болезни и вредителя.

**Методы создания инвазионного фона.** Общие принципы создания инвазионных и инфекционных фонов сходны. Для получения инвазионных фонов на почвообитающих вредителей или членистоногих, зимующих в земле, применяют запахивание остатков пораженных растений. Например, запахивают остатки растений, пораженных галлообразующими нематодами, картофель, пораженный разными видами картофельных нематод, стерню пшеницы с личинками стеблевого пилильщика.

Высокую численность вредителей злаков поддерживают выращиванием *бессменной культуры* восприимчивых озимых и яровых сортов (зеленого конвейера). Посев проводят полосами в сроки, наиболее благоприятные для определенного вида вредителя. При этом озимые и яровые сорта будут служить взаимными *резерваторами* злаковых мух. Около питомников можно создать также резерватор сорных растений, накапливающих насекомых. Для привлечения и накопления вредителей возможно создание *приманочных посевов*, например, для привлечения комплекса вредителей рапса рядом с питомником высевают горчицу или другие привлекающие крестоцветные культуры.

Часто растения заселяют специально собранными или выращенными в лабораторных условиях вредителями. Так, для оценки устойчивости картофеля к колорадскому жуку растения заселяют личинками. Для заселения кукурузы тлей используют участки листьев, вырезанные вместе с колониями из растений-накопителей.

При искусственном заселении нужно помнить, что вредители — подвижные животные, они способны покинуть оцениваемую делянку или растение. Для ограничения их подвижности применяют садки или изоляторы. При изучении устойчивости пшеницы к вредной черепашке бескаркасный садок надевают на пучок растений, снизу завязывают так, чтобы не вызвать травмирования стеблей и в то же время избежать выползания клопов. В таких садках можно содержать разное

количество клопов, для которых обеспечен доступ к любой части растения, легко проводить соответствующие учеты и наблюдения. Для ограничения передвижения хлебного пилильщика участок заражения располагают в массиве культур, не повреждаемых личинками этого насекомого (кукурузы, люцерны).

**Накопление инфекционного материала и вредителей.** Для создания искусственных инфекционных и инвазионных фонов проводят специальную работу по накоплению инокулюма микроорганизмов или особей членистоногих и нематод.

Как правило, некротрофные патогены хорошо размножаются на растительных остатках, зерне соответствующего вида или на простых питательных средах. Так, размножение возбудителя септориоза проводят на зерне, виды родов *Fusarium* и *Cochliobolus* хорошо размножаются на питательной среде.

В качестве источника инокулюма для возбудителей твердой головни пшеницы и каменной головни ячменя используют колосья злаков, собранные в предыдущем сезоне. Пыльная головня злаков не способна храниться длительное время, поэтому заражение колосьев проводят с помощью свежесобранного спорового материала.

Ржавчинные, мучнисто-росяные грибы и другие листовые патогены хорошо размножаются на зеленых частях растений в лабораторных условиях, однако их споры хранятся ограниченное время, быстро теряют жизнеспособность. Поэтому для создания фонов часто используют подсадку в питомники зараженных растений.

Членистоногих собирают в поле. Некоторых вредителей, например, колорадского жука, тлей, размножают в лабораториях на соответствующих частях растений.

*Способы хранения* инфекционного материала зависят от биологии вредных организмов. Культуры почвенных и некротрофных патогенов хранят в подсушенном состоянии в образцах почвы или высушенных органах растений при пониженной температуре. Споры многих грибов собирают, подсушивают над раствором серной кислоты или в вакууме (лиофилизируют), а затем хранят в герметично закрытых

склянках или запаянных ампулах в холодильнике.

Особые трудности возникают при накоплении и сохранении вирусов, которые вне живых клеток растения не только не размножаются, но, как правило, не сохраняются длительное время. Для размножения и поддержания вирусов применяют специальные виды и сорта растений, которые называют штаммовыми. Так, вирус табачной мозаики хорошо размножается в табаке сорта Самсун, X-вирус картофеля — в диком виде *Datura stramonium* и т.д. По мере их старения проводят заражение молодых здоровых растений. Этот прием называется «живая коллекция вирусов».

### **Организация оценок на инфекционном фоне**

В селекционном процессе инфекционные фоны следует использовать по меньшей мере на трех этапах:

- при изучении коллекционного питомника для отбора родительских форм;
- в селекционных питомниках, где проводят отбор устойчивых форм;
- на этапе конкурсного сортоиспытания. Для этого параллельно с питомником КСИ закладывают мелкоделяночный питомник на инфекционном фоне.

На первых этапах селекции проводят, как правило, визуальную оценку поражения растений к комплексу патогенов. В связи с большими объемами оценок и трудоемкостью организации и поддержания инфекционных фонов допускается использование комбинированных фонов при условии совместимости патогенов и отсутствия их взаимовлияния друг на друга.

На поздних этапах селекционного процесса оценки необходимо проводить на отдельных инфекционных фонах. Начиная с питомника конкурсного сортоиспытания, все оценки проводят по стандартным методикам, принятым в Государственной комиссии РФ по испытанию и охране селекционных достижений. Оценку делают в нескольких повторностях; результаты обрабатывают с помощью статистических методов.

При проведении учетов применяют описанные выше

методы оценки. Для заболеваний местного характера определяют тип реакции, степень поражения болезнью. Для заболеваний общего характера оценивают степень распространения болезни. Повреждения вредителями оценивают по специальным шкалам. Для отбора толерантных форм применяют оценку по потерям урожая. При проведении оценок учитывают распределение образцов по группам спелости.

В соответствии с рекомендациями ВИРа (Методика по оценке устойчивости сортов..., 2000) оценку по основным культурам проводят в следующие сроки:

- окончательный учет поражения злаков ржавчинными болезнями проводят в фазу максимального проявления болезни. Учет для бурой, желтой, корончатой ржавчины — в фазу молочной спелости по поражению флагового и предфлагового листа; для стеблевой ржавчины — в фазу восковой спелости по двум верхним междоузлиям, влагалищам флагового и предфлагового листа;

- учет поражения колосовых злаков мучнистой росой проводят в два этапа: первый — в фазу кущения - начала трубкования, второй — на стадии колошения - начала цветения;

- учет поражения септориозом проводят в фазу молочной спелости по трем верхним листьям и колосьям, средние данные по листьям и колосьям рассчитывают отдельно;

- учеты на устойчивость к головневым заболеваниям проводят в конце вегетации: пшеницы — в фазу восковой спелости, овса и ячменя — на стадии молочной спелости;

- оценку пораженности картофеля фитофторозом проводят по ботве — перед уборкой, по клубням — после уборки и через два месяца хранения.

Все показатели заносят в полевой журнал, где отмечают данные фенологических учетов, результаты оценки пораженности растений по стандартным шкалам. На основании оценок пораженности образцов определяют их устойчивость в соответствии с унифицированной 9-балльной шкалой определения устойчивости, разработанной в ВИРе (1 балл — максимальная восприимчивость, 9 баллов — иммунитет).

На госсортоучастках проводят испытания перспективных сортов и гибридов на устойчивость к возбудителям болезней и

вредителям, наносящим значительный экономический ущерб в регионах. Оценки осуществляют по стандартным методикам на инфекционных и провокационных фонах. В опыты включают все сорта, находящиеся в испытаниях.

В соответствии с требованиями Государственной комиссии РФ по испытанию и охране селекционных достижений сорта должны быть устойчивы к основным заболеваниям и вредителям в регионе, а также к болезням, имеющим карантинное значение (например, картофеля к раку). При равной урожайности с восприимчивыми сортами предпочтение отдают сортам, устойчивым к болезням и вредителям.

### **Лабораторная работа № 6** **ИНФЕКЦИОННАЯ НАГРУЗКА, УСЛОВИЯ ЕЕ** **РЕАЛИЗАЦИИ И МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

**Задание 1.** Провести оценку на устойчивость к гнилям хранения различных тканей корнеплодов по степени поражения в баллах (или в %):

- 0 — поражений нет;
- 1 — поражена 1/4 вырезки (25%);
- 2 — поражена 1/2 вырезки (50%);
- 3 — поражено 3/4 вырезки (75%);
- 4 — полное загнивание (100%).

*Материалы и оборудование.* Чашки Петри. Питательная среда из мезги отваренных корнеплодов. Чистая культура возбудителя кагатной гнили. Вырезка из различных частей корнеплодов. Автоклав.

*Методика проведения работы.* В чашки Петри с питательной средой, засеянной чистой культурой возбудителя кагатной гнили (*Botrytis cinerea*), раскладывают вырезки из различных частей корнеплодов свеклы и моркови. Чашки до учетов выдерживают в течение 3-4 дней при температуре 20°C. При понижении температуры загнивание идет медленнее. Питательная среда готовится из мезги отваренных корнеплодов свеклы или моркови. Ее равномерно раскладывают в чашки Петри, толщиной 0,5-1 см. Чашки со средой стерилизуют в

автоклаве при температуре 115°C в течение 20 мин и засевают чистой культурой гриба.

**Задание 2.** Провести анализ восприимчивых и устойчивых форм растений (например, земляники или картофеля) на зараженность фитогельминтами — стеблевой нематодой (*Ditylenchus dipsaci*).

*Материалы и оборудование.* Штативы, стеклянные воронки, резиновая трубка с пробкой. Зажим Мора. Навески растительной ткани восприимчивых и устойчивых сортов. Пипетка, предметные стекла, 2% раствор метиленовой сини, бинокляр.

*Методика проведения работы.* На штативах закрепляют стеклянные воронки, на нижний конец которых надевают резиновую трубку с пробкой. Трубку посередине перехватывают зажимом Мора. Навески растительной ткани — отдельно восприимчивых и устойчивых сортов (10 или 15 г) — измельчают ножницами на кусочки. Полученный материал помещают в воронки на каркас из металлической сетки или марли и заливают чистой водопроводной водой. Нематоды, выходя из тканей в воду, опускаются вниз и концентрируются у зажима. Через 20-30 мин, открыв зажим, сливают немного воды в пробирку. Из нее берут пипеткой каплю суспензии на предметное стекло, смешивают с каплей 2% раствора метиленовой сини, накрывают покровным стеклом и просматривают под бинокляром. Подсчитывают численность нематод, не окрасившихся в течение 15 мин, относящихся к фитогельминтам. Зарисовывают окрашенные сапрозойные хищные формы и фитогельминты. Отмечают особенности в строении различных частей тела. Делают вывод о степени зараженности и устойчивости растений.

#### **Тема 4 ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РАСЫ И МЕТОДЫ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Расы паразитов поражают только определенные сорта растений-хозяев.

Понятие «физиологические» связано с тем, что способность

рас преодолевать устойчивость одних сортов и неспособность преодолевать устойчивость других связана с различными физиологическими механизмами. Эти различия связаны с продуктами обмена веществ паразита и в клетках растения-хозяина.

Физиологические расы известны для патогенных бактерий, грибов и цветковых растений-паразитов. У вирусов различают штаммы, отличающиеся друг от друга по структуре ДНК и патогенности по отношению к растениям-хозяевам.

Для определения рас используют *растения-дифференциаторы*. Они относятся к сортам и гибридам, характеризующимся определенной вертикальной устойчивостью по отношению к возбудителю болезни. В расах присутствуют факторы вирулентности в дифференциаторах — факторы вертикальной устойчивости. Между расой паразита и сортом растения-хозяина происходит дифференциальное (избирательное) взаимодействие. Оно заключается в следующем.

Если та или иная раса паразита преодолевает устойчивость сорта, то наблюдается реакция совместимости. На пораженных органах проявляются основные симптомы (например, спороношение *Phytophthora infestans* или пустулы *Russinia graminis*). Если раса паразита сталкивается с устойчивостью сорта, то на органах растения наблюдается реакция сверхчувствительности (СВЧ) — основной механизм активного иммунитета растений. Она проявляется в виде мелких некрозов в местах внедрения спор возбудителя в растение-хозяина.

*Авирулентная раса* паразита (без факторов вирулентности) способна поражать только восприимчивые сорта (без факторов вертикальной устойчивости). Устойчивые сорта авирулентная раса, как правило, не поражает.

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

Генетически факторы вирулентности определяются *vir*-генами (*virulence* — вирулентность), а факторы вертикальной устойчивости — *R*-генами (*resistance* — устойчивость). В ряде исследований на основе генетического анализа было показано, что один фактор (вирулентности или вертикальной устойчивости) определяется одним геном (*vir*- или *R*-геном соответственно) с полным доминированием.

Вирулентность — признак рецессивный, а вертикальная устойчивость — доминантный.

### **Лабораторная работа № 7** **ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ (СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ)** **ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ВРЕДИТЕЛЕЙ**

Для выявления рас *Phytophthora infestans* существует набор растений-дифференциаторов Блэка. Он состоит из сортов и гибридов с определенными *R*-генами: *R1...R11*. Набор Блэка признан селекционерами всего мира. Он хранится и поддерживается в Международном центре по картофелю (IPC) в Перу. При определении рас растения-дифференциаторы (или листья с них, разложенные во влажные камеры) заражают суспензией конидий изолятов *Ph. infestans*. Заражение проводят в помещении с низкой освещенностью и высокой относительной влажностью, то есть в контролируемых условиях.

Дифференциатор *R1* способен выявить две расы *Ph. infestans*, *R1* и *R2* — четыре, *R1*, *R2* и *R3* — восемь рас и т.д. (таб. 16).

Чем больше растений-дифференциаторов растения-хозяина используют, тем больше рас можно выявить. Общее число возможных рас (*N*) определяется формулой:

$$N = 2^n,$$

где *n* — число растений-дифференциаторов.

Основание степени равно двум, потому что имеются только две возможные реакции: совместимости и сверхчувствительности.

Таблица 16 - Выявление рас Ph. infestans с помощью сортов-дифференциаторов картофеля с одним фактором устойчивости

Сорт-дифференциатор	Раса							
	avir *	1						
R1	—**	+***						
Сорт-дифференциатор	Раса							
	avir *	1	2	1.2				
R1	—	+	—	+				
R2	—	—	+	+				
Сорт-дифференциатор	Раса							
	avir *	1	2	3	1.2	1.3	2.3	1.2.3.
R1	-	+	-	-	+	+	-	+
R2	-	-	+	-	+	+	+	+
R3	-	-	-	+	-	+	+	+

\* Авирулентная раса.

\*\* Реакция сверхчувствительности.

\*\*\* Реакция совместимости.

В тест-наборы удобно вводить дифференциаторы, содержащие сразу несколько факторов устойчивости. Они входят и в набор Блэка (таб.17).

Таблица 17 - Выявление рас Ph. infestans с помощью сортов-дифференциаторов картофеля с одним фактором устойчивости

Сорт-дифференциатор	Раса							
	avir	1	2	3	1.2	1.3	2.3	1.2.3
R1R2	-	-	-	-	+	-	-	+
R1R3	-	-	-	-	-	+	-	+
R2R3	-	-	-	-	-	-	+	+

\* Обозначения те же, что в таблице 16.

Расы с одним фактором вирулентности не способны

заразить такие сорта. Расы с несколькими факторами вирулентности заражают их только в том случае, если факторы вирулентности комплементарны факторам устойчивости (например, раса 1.2 поражает дифференциатор R1R2, но не поражает дифференциатор R1R3). Раса со всеми факторами вирулентности паразит любые растения-дифференциаторы, входящие в набор. Применение сортов с несколькими факторами устойчивости позволяет уменьшить общее число растений-дифференциаторов в наборе.

**Задание 1.** Избирательность (специализация) возбудителей заболеваний и вредителей.

*Методика проведения работы.* Заполнить форму (таб. 18) взаимодействия сортов-дифференциаторов кофе с физиологическими расами листовой ржавчины *Hemileia vastatrix*. Поставить ( + поражаемый ) или минус ( - устойчивый) в соответствующие графы.

Таблица 18 - Взаимодействие сортов-дифференциаторов кофе с физиологическими расами листовой ржавчины

Растения-дифференциаторы	Расы гриба <i>Hemileia vastatrix</i>											
	avir	1	2	3	4	1.2	1.4	2.3	1.2.3	2.3.4	1.2.4	1.2.3.4
R1												
R2												
R3												
R4												
R1.2												
R1.3												
R1.4												
R2.3												
R2.4												
R3.4												

По таблице 19 определить физиологические расы ржавчины кофе.

Таблица 19 – Определение физиологических рас ржавчины кофе

Растения- дифференциа- торы	Расы гриба <i>Hemileia vastatrix</i>											
R1	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
R2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
R3	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
R4	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
R2.3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
R1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

**Задание 2.** Приготовить суспензию хламидоспор пыльной голвни с заданной концентрацией (20 и 50 спор в поле зрения микроскопа при малом увеличении).

*Материалы и оборудование.* Споры возбудителя твердой или пыльной голвни. Торзионные весы. Микроскопы. Предметные и покровные стекла. Колосья пшеницы. Вакуум-прибор для заражения колосьев голвней. Бритвы, черенки древесных или кустарниковых растений. Полоски полиамидной пленки. Ножницы.

## Список используемой литературы

1. Асякин Б.П. Принципы и пути управления иммуногенезом растений в агроценозах овощных культур/ Б.П. Асякин // Тр. I всеросс. конф. по иммунит. растений к вредителям и болезням. - СПб., 2002. - С. 248-249.
2. Вавилов Н. И. Проблемы иммунитета культурных растений/ Н. И. Вавилов. - Т. IV. - М.; Л.: Наука, 1964.
3. Вилкова Н.А. Новые аспекты изучения антибиоза растений для вредителей / Н.А. Вилкова// Итоги исследов. по устойчив, растений к вредителям. – Познань: Коорд. центр СЭВ, 1978. - с.17-26.
4. Вилкова Н.А. Физиологические основы теории устойчивости растений к вредителям: Автореф. докт. дисс. / Н.А. Вилкова. - Л.: ВИЗР, 1980. - 48 с.
5. Вилкова Н.А. Иммунитет растений к вредным организмам и его биоценотическое значение в стабилизации агроэкосистем и повышении устойчивости растениеводства / Н.А. Вилкова//. - Вестник защиты растений. – 2000. - №2. - С.3-15.
6. Вилкова Н.А. Механизмы устойчивости пасленовых культур к вредителям и их функциональное значение в регуляции жизнедеятельности колорадского жука / Н.А. Вилкова, Л.С. Иващенко // Современные системы защиты и новые направления в повышении устойчивости картофеля к колорадскому жуку. - М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2000. - С.25-35.
7. Вилкова Н.А. Устойчивые сорта и средства защиты растений как индукторы микроэволюционных процессов у насекомых-фитофагов / Н.А. Вилкова, Г.И. Сухорученко, С.Р. Фасулати // Ин-форм. бюлл. /ВПРС МОББ. – 2002. - №32. - С.194-204.
8. Вилкова Н.А. Изменчивость и адаптивная микроэволюция насекомых-фитофагов в агробиоценозах в связи с иммуногенетическими свойствами кормовых растений / Н.А. Вилкова, С.Р. Фасулати //Труды РЭО. – 2001. - №72. – С. 107-128.
9. Дворянкина В.А. Морфофизиологические признаки устойчивости пшеницы к большой злаковой тле /В.А. Дворянкина //Тр. VII Всесоюз. совещ. по иммунит. растений к болезням и вредителям. Новосибирск, 1981. – С. 107-108.

10. Конарев А.В. Ингибиторы ферментов и иммунитет / А.В. Конарев, Н.А. Вилкова // Защ. Растений. - 1984. - №40. - С.17-19.
11. Конарев А.В. Изменчивость ингибиторов трипсиноподобных протеиназ у пшеницы и родственных ей злаков в связи с устойчивостью к зерновым вредителям/ А.В. Конарев // С.-х биология. – Л., 1987. - С.17-24.
12. Куперман Ф.М. Морфофизиология растений / Ф.М. Куперман. - М., 1977. - 287 с.
13. Курсанов А.Л. Транспорт ассимилянтов в растении / А.Л. Курсанов. - М., 1976. – 646 с.
14. Лизгунова Т.В. Капуста / Т.В. Лизгунова. - Л., 1965. - 384 с.
15. Покровский А.А. Роль биохимии в развитии науки о питании / А.А. Покровский. М., 1974. - 125 с.
16. Практикум по иммунитету растений к вредителям: учебное пособие/ И.Д. Шапиро, Н.А. Вилкова, Л.И.Нефедова, и др. - Л., 1989. - 180 с.
17. Рубин Б.А. Биохимия и физиология иммунитета растений/ Б.А. Рубин, Е.В. Арциховская, В.А. Аксенова. М., 1975. - 320 с.
18. Румянцев С.М. Микробы, эволюция, иммунитет/ С.М. Румянцев. Л., 1984. - 170 с.
19. Танский В.И. Биологические основы вредоносности насекомых/ В.И. Танский. М., 1988. - 182 с.
20. Тукало Е.А. Ускоренный метод количественного определения гликоалколоидов картофеля. / Е.А. Тукало, Г.Н. Царик // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. – 1970. - №12. – 56с.
21. Фасулати С.Р. Адаптивная микроэволюция колорадского жука и внутривидовая структура в современном ареале / С.Р. Фасулати, Н.А. Вилкова // Современные системы защиты и новые направления в повышении устойчивости картофеля к колорадскому жуку. М, Центр «Биоинженерия» РАН, 2000. - С.19-25.
22. Фасулати С.Р. Устойчивость овощных пасленовых растений к колорадскому жуку и принципы ее оценки в связи с внутривидовой изменчивостью вредителя/ С.Р. Фасулати, Н.А. Карасева// АГРО-XXI. – 1998. - №2. - С.14-16.
23. Шапиро И. Д. Иммунитет полевых культур к насекомым и клещам / И. Д. Шапиро. Л.: Наука, 1985.

24. Методические рекомендации по изучению и оценке форм картофеля на устойчивость к колорадскому жуку / И.Д. Шапиро, Н.А. Вилкова, С.Р. Фасулати и др. – М.:РАСХН, ВИЗР, 1993. - 47с.

25. Щербаков В.К. Развитие представлений об иммунитете и стратегии селекции устойчивых форм / В.К. Щербаков/ Тр. VII всесоюз. совещ. по иммунит. растений к болезням и вредителям. - Новосибирск, 1981. - С. 66.