

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
АГРОБІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ЗАХИСТУ, ГЕНЕТИКИ І СЕЛЕКЦІЇ РОСЛИН**

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКІВ ХВОРОБ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР**

Методичні рекомендації
до проведення лабораторно - практичних занять
для студентів агробіотехнологічного факультету
зі спеціальності 202– Захист і карантин рослин

Одеса - 2018

УДК УДК 632.2/4: 633/635:378(083.13)

Укладачі: доктор біологічних наук, професор кафедри захисту, генетики і селекції рослин Мілкус Б.Н.

кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри захисту, генетики і селекції рослин Балан Г.О.

Рецензент: кандидат сільськогосподарських наук , доцент кафедри садівництва, виноградарства, біології та хімії Петренко С.О

Методичні вказівки з дисципліни «Ідентифікація збудників хвороб сільськогосподарських культур» мають на меті ознайомити з основними вимогами щодо виконання лабораторно - практичних занять студентів агробіотехнологічного факультета зі спеціальності 202 - Захист і карантин рослин

Методичні вказівки розглянуті та затверджені на засіданні методичної комісії агробіотехнологічного факультету ОДАУ

Протокол № 3 від 26.10. 2018 р.

©Балан Г.О.,2018

© Мілкус Б.Н.,2018

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1. Типи та види хвороб рослин. Візуальна діагностика за симптомами... 5	
2. Ідентифікація грибних збудників хвороб сільськогосподарських культур.....	10
2.1. Мікроскопічні методи ідентифікації грибних збудників хвороб....	10
2.1.1. Світлова мікроскопія.....	10
2.1.2. Люмінісцентна мікроскопія.....	11
2.1.3. Електронна мікроскопія.....	12
2.2. Гістологічні методи ідентифікації.....	12
2.2.1. Метод зриву епідермісу.....	12
2.2.2. Метод виявлення фітопатогенних грибів у середині ураженої тканини.....	13
2.2.3. Метод виготовлення зрізів на мікротомі.....	14
2.3. Біологічні методи ідентифікації.....	14
2.3.1. Метод вологої камери.....	14
2.3.2. Метод поживних середовищ.....	15
2.3.3. Приготування поживних середовищ.....	19
2.4. Молекулярний метод ідентифікації.....	23
2.5. Імунологічний метод ідентифікації.....	24
2.6. Фізико-хімічний методи діагностики.....	24
Список літератури.....	25

ВСТУП

Дисципліна «Ідентифікація збудників хвороб сільськогосподарських культур» тісно взаємозв'язана з такими навчальними дисциплінами як «ботаніка», «фізіологія рослин», «мікробіологія», «вірусологія», «мікологія», «загальна фітопатологія», «сільськогосподарська фітопатологія», «біотехнологія», «рослинництво», «землеробство», «селекція та насінництво», «плодівництво», «овочівництво» та ін.

Дисципліна «Ідентифікація збудників хвороб сільськогосподарських культур» вивчає різноманіття та морфологічні прояви хвороб сільськогосподарських культур, етіологію та патогенез, діагностичні ознаки найбільш розповсюджених та небезпечних збудників хвороб, методи їх ідентифікації, причини та закономірності виникнення, розвитку і поширення хвороб. Вона є важливою профілюючою дисципліною у підготовці фахівців із захисту і карантину рослин.

Вивчаючи предмет «Ідентифікація збудників хвороб сільськогосподарських культур», студенти повинні знати основні морфологічні та фізіологічні групи збудників хвороб сільськогосподарських культур та їх діагностичні ознаки, методи фітопатологічної діагностики, еколого – субстрактну спеціалізацію різних видів збудників хвороб, оволодіти прийомами і методами обстежень і обліки рослин в польових та лабораторних умовах, розпізнавати тип інфекційної хвороби рослини за комплексом діагностичних ознак, визначати видову приналежність розповсюджених та небезпечних збудників хвороб сільськогосподарських рослин. Застосовувати систему захисту від хвороб на підставі даних економічного порогу шкодочинності та аналізу біотичних і абіотичних факторів.

1. Типи та види хвороб рослин.

Візуальна діагностика за симптомами.

Всі хвороби сільськогосподарських культур мають свої характерні зовнішні ознаки. Для діагностики грибних хвороб треба провести аналіз симптомів, відзначити поширення та розвиток та врахувати тип прояву хвороби. За зовнішніми ознаками хвороби рослин об'єднують у наступні типи:

Плямистості Характеризуються відмиранням паренхімних клітин, що призводить до виникнення зміни забарвлення і утворення плям. Плями можуть бути різної форми – округлі, кутасті, видовжені, неправильні, концентричні та ін. В деяких випадках спостерігається випадання уражених ділянок. На поверхні плям гриби часто утворюють органи спороношення у вигляді нальотів.

Некрози проявляються у вигляді ділянок відмерлих тканин, що супроводжується зміною їх забарвлення. Причиною їх виникнення є фітопатогенні гриби, бактерії, віруси, а також абіотичні фактори. Некрози поділяються на *некрози паренхімних клітин* – різні плямистості на органах рослин; *некрози стовбурів та гілок деревних порід* – відмирання кори, луба, камбію та периферійних шарів деревини; *некрози жилок листків* (часто викликаються вірусами, наприклад прижилкова мозаїка чорної смородини); *некрози судинно-волокнистих пучків*.

Гнилі часто проявляються на рослинах та їх органах, але особливо на тих частинах, котрі багаті водою і запасними поживними речовинами (бульбах, коренеплодах, цибулинах, плодах). В уражених рослинах відбувається розм'якшення і розкладання рослинних тканин, що зумовлює дію ферментів, які виділяють патогени. Спочатку розчиняється міжклітинна речовина, що призводить до втрати клітинами зв'язку одна з однією та їх роз'єднанням – мацерацією. Залежно від забарвлення, яке утворюють

патогени на поверхні уражених тканин, гнилі бувають: *сірими, білими, чорними, рожевими*. Залежно від локалізації, гнилі можуть бути: *кореневищними, плодовими – шийковими стебловими кільцевими* За консистенцією гнилі бувають: *водянистими мокрими*

В'янення пов'язано з ураженням кореневої або судинної системи рослин. Зовні воно характеризується проникненням листків, гілок, стебел та інших органів, що пов'язано зі втратою тургору клітин і тканинами, а основною причиною є нестача води в рослині внаслідок припинення її потрапляння по мертвих судинах. На поперечних зрізах рослин із симптомами в'янення можна помітити потемніння судин у вигляді кільця.

В'янення, які викликана фітопатогенними грибами називають – *трахеомікозами*, бактеріями – *трахеобактеріозами*, вірусами - *мозаїчними*, абіотичними факторами – *неінфекційними*.

Найчастіше в'янення рослин викликають гриби Збудниками трахеобактеріозів є бактерії. Серед вірусних хвороб відомі в'янення гарбузових, стовбурне в'янення томатів. Неінфекційне в'янення може часто викликатися нестачею вологи в ґрунті.

Опіком називають некрози листків, гілок, суцвіть та інших органів рослин. Він викликається грибами

Зміна забарвлення уражених рослин – виникає при порушенні пігментації уражених органів. При хлорозах спостерігається загальне посвітління або пожовтіння, при мозаїці – пожовтіння окремих ділянок. Найбільш типові ознаки хлорозу виникають при нестачі поживних елементів у ґрунті (неінфекційні хлорози). Забарвлення листків змінюється також внаслідок ураження рослин вірусами та мікоплазмами.

Пухлини, нарости, гали – хвороби, що характеризується розростанням врожаю тканини. Нарости утворюються на різних органах рослин: кореневій системі кила капуста на бульбах рак картоплі та ін. Виникнення наростів відбувається за рахунок гіпертрофії та гіпоплазії. Гали – порушення

структури тканин рослини, що виникає в окремих її ділянках, коли однорічні дорослі клітини або групи вже сформованих клітин під впливом збудника втрачають зв'язок між собою, збільшується в об'ємі, діляться і починають розвиватися самостійно. В результаті утворюються гали, що можуть мати різну форму і величину, потовщення. Прикладом гал, кила капусти, рак картоплі, туберкульоз коренеплодів буряків. Дуже часто зустрічаються гали, які виникають у результаті збільшення в органі об'єму клітин або міжклітинних проростів. Загалом, гали виникають під дією механічного подразнення рослинних клітин або продукуванням фітопатогенних мікроорганізмів і шкідниками токсинів та інших речовин.

Деформація органів рослин являє собою зміну форми ураженого органу. Це може бути скручування, морщення. Водночас, деформації можуть викликати гриби кучерявість листків персика віруси і мікоплазми скручування листків картоплі та абіотичні фактори. Деформація листових пластинок відзначається змінює їх поверхні, при цьому частина пластинки утворює випукле здуття, або на її поверхні утворюються складки. Прикладом деформації пагонів є «відьмині мітла» на гілках багатьох плодкових дерев (вишні, сливи та ін.). Наприклад, проліферація, або «відьмині мітли» яблуні – хвороба, яка проявляється на штабмі та скелетних гілках у другій половині вегетації дерев у вигляді тоненьких гіллястих бічних пагонів з малими листками. На уражених деревах листки формуються з гострими крайовими зубчиками і збільшеними прилистниками. Квітки на деревах потворної форми, плоди малі, смакові якості їх дуже низькі. Збудниками хвороби є мікоплазмові організми. Деформація плодів проявляється у вигляді повної або часткової зміни форми плода, який при цьому втрачає свій нормальний вигляд, властивості та може не утворювати насіння або утворювати його низької якості. Прикладом деформації плодів є заснітка слив (зб. гриб *Taphrina pruni* Tub.). Хвороба проявляється у вигляді розростання зав'язей і утворення мішкоподібних плодів. Плоди можуть

також деформувати під впливом вірусів, мікоплазм (стовбур томата) та інших чинників.

Муміфікація – такий тип хвороби, коли уражений орган рослини густо пронизується грибною патогенною, уражена тканина темніє, зсихає, стає щільною та перетворюється у складний склеро цій.

Муміфікації переважно піддаються плоди і насіння. Муміфіковані органи не загнивають і не руйнуються, але перезимовують, після чого проростають і продукують органи спороношення. Прикладом муміфікації є плодова гниль.

Нальоти – проявляються при ураженні рослин грибами і являють собою міцелій та спороношення збудника. Наліт може бути білим (борошниста роса пшениці сірим рожево-сірим та ін..

Пустули – накопичення спор, що виходять через розриви епідермісу. Вони завжди утворюються всередині тканин уражених органів і спочатку прикриті епідермісом, який розривається під тиском спороношення. Найбільш характерним є утворення пустул для іржастих хвороб стеблова, або лінійна іржа пшениці іржа гороху іржа буряка.

Руйнування органів рослин – це руйнування ураженого колосся, стебла, листків та інших органів, які спричинені сажковими грибами. Внаслідок ураження патогенами, органи рослин руйнуються і перетворюються у чорну спорову масу. Сажкові хвороби можуть проявлятися на генеративних органах тверда сажка пшениці, а також на вегетативних – стеблах стеблова сажка жита та листках (пухирчаста сажка кукурудзи).

Камедетеча – належить переважно до хвороб деревних порід (кісточкових плодових культур та ін.). Хвороба характеризується витіканням із штамбів, гілок та плодів клейкої янтарно-жовтої або бурої рідини – камеді, що швидко твердіє на повітрі (клястероспорові кісточкових – зб. *Clasterosporium carporhilum* Adern). Камедетеча також може спостерігатися під впливом несприятливих абіотичних екологічних факторів.

Копитоподібні плодові тіла і шапки грибів – спостерігається на штамбах, гілках та коренях деревних порід. Прикладом є сливовий трутовик – *Phellinus pomaceum* Maire, опеньок - *Armillariella melea* Karst. Та ін.

Виразки – розм'якшення тканин (насичених водою), які оточують місце ураження, що призводить до виникнення заглиблення, в якому часто спостерігається спороношення збудника (антракноз квасолі – зб. *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Br. et Cav.).

Розтріскування уражених органів рослин – місцеве ураження покривних тканин коренеплодів, бульб, плодів (звичайна парша коренеплодів буряків – зб. *Streptomyces scabies* Waks. et Henur, порошиста парша картоплі – зб. *Spongospora subterranean* Wallr).

Поява на рослинах квіткових організмів, характеризується поселенням на них квіткових паразитів: Омели (*Viscum album* L.), вовчка (види *Orobanche*), повитиці (види *Cuscuta*). Загалом, при ураженні рослин грибами на поверхні хворих органах утворюються наступні структури: пікніки, спороложа, клейстотеції, склероції, пустули, міцелій та інші, які дозволяють у польових умовах визначити етіологію захворювання.

Однак за загальними видимими симптомами не завжди вдається визначити як походження хвороби, так і її саму, що може бути зумовлено різними чинниками: відсутністю макроскопічних ознак у певних фітопатогенних грибів; поліморфізмом (наприклад, у збудників білої та сірої гнилей рослин та ін.); нетиповими симптомами хвороби; схожістю симптомів мікозів, бактеріозів, віро зів та хвороб непаразитичного походження на певних етапах патологічного процесу. У разі, коли в польових умовах ідентифікувати хворобу за зовнішніми ознаками неможливо, необхідно відібрати декілька уражень рослин з кореневою системою (з ґрунтом), або локалізацією захворювання на листках, стеблах, плодах тощо і провести подальшу діагностику в лабораторних умовах.

2. Ідентифікація грибних збудників хвороб сільськогосподарських культур

2.1. Мікроскопічні методи ідентифікації грибних збудників хвороб

Визначення фітопатогенних грибів проводять на основі їх морфологічних ознак; при цьому значну увагу слід звернути на наступні структури: спори (конідії, пікноспори, ооспори, сумко спори, зооспори, теліоспори, хламідіоспори); плодові тіла (перитеції, апотеції, клейстотеції псевдотеції тощо). Потрібно також ураховувати морфологію конідієносців, спорангіїв, придатків у клейстотеціїв, пряжок, анастомоз, щетинок, гіф, міцеліальних тяжів та ін. Під час аналізу уражених рослин спочатку звертають увагу щодо наявності на їх органах різних спораношень (пустул, нальотів тощо), які помітні неозброєним оком. У разі їх виявлення слід приготувати з них мікроскопічний препарат і проаналізувати. Водночас, якщо структури грибів непомітні, то необхідно промити уражені ділянки тканин і повторно уважно їх оглянути з використанням збільшувальних приладів (лупи, стереомікроскопа). У разі виявлення плодових тіл грибів необхідно приготувати мікроскопічні препарати й ідентифікувати збудника. Якщо ж при огляді уражених тканин рослин на їх поверхні відсутнє спораношення та інші структури грибів, тоді слід використовувати другі спеціальні методи.

2.1.1. Світлова мікроскопія

За умов наявності на поверхні уражених органів рослин структур гриба, їх зшкрябують за допомогою ланцетної голки в краплину рідини на предметне скло, яке попередньо промивають, знежирюють 40%-вим спиртом; на нього наносять піпеткою одну-дві краплини рідини. За необхідності міцеліальний матеріал гриба можна подрібнити. Надалі об'єкт накривають покрівельним скельцем. Для попередження утворення пухирців покрівельне скельце

спочатку ставлять на лівий край та обережно опускають на правий. У виготовленому таким способом препараті, можна аналізувати збудників борошнистої роси, білої та сірої гнилей, уредінію- та теліоспори іржастих грибів. Їх мікроскопічний аналіз проводять спочатку на малому збільшенні мікроскопа, а для більш детального аналізу – на великому.

Мікроскопічний аналіз грибів методом відбитків Для виготовлення мікроскопічних препаратів, що збережуть об'єкт у максимально природному стані, застосовують метод відбитків, який дозволяє виявити структуру гриба, які знаходяться на поверхні уражених тканин. Для отримання відбитків використовують желатин, клейкі стрічки тощо.

2.1.2. Люмінесцентна мікроскопія

При діагностиці хвороб рослин досить часто використовують люмінесцентний метод, що дозволяє виявити наявність фітопатогенних грибів у тканинах та визначити приховану інфекцію. Він ґрунтується на тому, що деякі структури клітин грибів, опромінені світловими променями певної довжини хвилі (до 360-365 нм), володіють здатністю світитися. Водночас, світіння спостерігається при забарвленні грибів спеціальними речовинами – флюорохромами. Для проведення аналізу рослинний матеріал спочатку фіксують у рідині Карнау (абсолютний спирт – 6 частин, хлороформ – 3 частини, льодова оцтова кислота – 1 частина). Після процесу фіксації з рослинних зразків (стебел, листків та ін.) роблять зрізи, які забарвлюють різними флюоробарвниками. Надалі, підготовлені зразки розглядають під люмінесцентним мікроскопом із використанням світлофільтрів.

Переваги люмінесцентного методу порівняно із біологічним у тому, що він менш трудомісткий, не потребує виготовлення спеціальних живильних середовищ, стерилізації посуду та ін. Крім того, проводити діагностику рослинного матеріалу можна відразу ж після його збирання.

2.1.3. Електронна мікроскопія

Техніка виготовлення препаратів для електронної мікроскопії є досить складною порівняно з використанням світлового мікроскопа. Для морфологічного вивчення структур грибів необхідно робити ультра тонкі зрізи на ультрамікрометрі. Самі препарати готують не на предметному склі, а на спеціальних плівках із колодію, кварцу та інших, товщина яких не має перевищувати 200 Å. Часто використовують розчин колодію в амілацетаті. Підготовлені плівки переносять на спеціальні сітки, виготовлені з чистої міді, з 4-10 комірками на 1 мм. Надалі готують суспензії досліджених об'єктів, фіксують зразки, центрифугують для отримання підвищеної контрастності – напилюють (покривають тонким шаром хрому, золота, платини тощо).

У практиці діагностики хвороб рослин використовують електронний трансмісійний мікроскоп, за допомогою якого отримують двомірне скло (плоске) зображення, а також скануючий електронний мікроскоп, який дозволяє одержувати тримірне зображення поверхневої структури мікроскопічних об'єктів.

2.2. Гістологічні методи ідентифікації

2.2.1. Метод зриву епідермісу

Для діагностики грибних хвороб рослин використовують метод зриву епідермісу. Спочатку скальпелем надрізають епідерміс на листовій пластині та за допомогою пінцета від лінії надрізу зривають шматочок і розміщують на предметне скельце в краплину води. Наступним етапом є мікроскопічний аналіз зразка щодо виявлення органів спороношення, спор та грибниці. Для кращого контрасту структур гриба, препарат можна забарвлювати з використанням бавовняної синьки. Даний метод добре використовувати для діагностики грибів, що мають екзотрофний міцелій (борошнесторосяний).

2.2.2. Метод виявлення фітопатогенних грибів усередині уражених тканин

Виявити органи грибів, що знаходяться всередині рослинних тканин, можна за допомогою виготовлення тонких зрізів вручну. Зокрема, саме так можна ідентифікувати зимові спорангії збудника раку картоплі в тканинах наростів. Як правило, для отримання якісних тонких зрізів, використовують гостру бритву. У разі, коли зрізи виготовляють з дуже м'яких, ніжних або тонких частин рослин, необхідно використовувати також опорний матеріал, наприклад, серцевину бузини. Для кращої диференціації органів грибів, виготовлені препарати можна забарвлювати. Водночас, метод виготовлення зрізів вручну не є придатним для ідентифікації багатьох хвороб. Досить часто якісні тонкі зрізи можна отримати на мікротомі.

Під час мікроскопічного аналізу листкових тканин сильно погіршується їх прозорість, що зумовлено наявністю в клітинах хлорофілу. Для подолання цієї перешкоди необхідно провести освітлення матеріалу та обробку барвниками. З цією метою використовують спирт, розчин КОН, розчин Аманна та ін. При *освітленні в спирті* матеріал кип'ятять в абсолютному спирті до повного знебарвлення, після чого його промивають у воді. *Освітлення з використанням калійного лугу* можна проводити різними методами: 1. Шматочки листків протягом 20-30 хв. (залежно від їх товщини) кип'ятять у 10-50%-му розчині лугу, промивають, 2-3 хв. нагрівають у спирті та ще раз промивають холодною водою. 2. Шматочки листків витримують 2 години в льодяній оцтовій кислоті, промивають водою, 1-2 хв. Нагрівають у спирті та ще раз та ще раз промивають холодною водою. *Освітлення в розчині Аманна*: розчин складається з 20 г молочної кислоти, 40 г гліцерилу, 20 г фенолу, 20 мл дистильованої води.

Для забарвлення препарату, можна використовувати 1%-ий розчин бавовняної синьки, кислого фуксину, або суміші одного із барвників з

льодяною оцтовою кислотою (1 мл 1%-го розчину бавовникової синьки та 10 мл льодяної оцтової кислоти). Помістивши шматочок тканини на предметне скло на нього наносять краплю барвника, а через 10-20 хв. Промивають водою за допомогою крапельниці, накривають покрівельним скельцем та проводять мікроскопічний аналіз. Слід відзначити, що для забарвлення можна використовувати й інші барвники (метилову синьку, генцан-віолет та ін.).

2.2.3. Метод виготовлення зрізів на мікротомі

Для виготовлення ендofітних фітопатогенних грибів готують тонкі (10-40 мк) зрізи рослинного матеріалу на мікротомі. В практиці діагностики можна використовувати як звичайний, так і заморожуючий мікротоми.

Виготовлення зрізів на мікротомі відбувається в декілька етапів: фіксація рослинного матеріалу, промивання, зневоднення, просочення матеріалу парафіном, виготовлення блоків, отримання мікротомних зрізів та наклеювання їх на предметне скло, депаранфізація зрізів та забарвлення.

При роботі із заморожуючим мікротомом зрізи можна робити як із живого рослинного матеріалу (не проводячи фіксацію), так і з такого, що пройшов етап фіксації.

2.3. Біологічні методи ідентифікації

2.3.1. Метод вологої камери

Створення сприятливих умов для проростання міцелію грибів, що знаходяться в середині уражених тканин, досягається шляхом використання вологих камер, котрі забезпечують знаходження рослинного матеріалу в умовах 100%-ї вологості повітря. Найбільш придатними для таких камер є чашки Петрі, а також ексікатори, які можна експонувати в термостатах за різних температур.

Перш ніж помістити рослинний матеріал у вологу камеру, його спочатку промивають у проточній воді протягом 20-30 хв. Потім підсушують стерильним фільтруючим папером та фламбують (швидко проводять над полум'ям спиртівки) або стерилізують. Для поверхневої стерилізації використовують: 96 або 70%-ий спирт, в якому об'єкт витримують 1-5 хв.; 0.5-1.0%-ий розчин перманганату калію з експозицією 3-20 хв.; 0.1-1.0%-ий розчин бромної води з експозицією декілька секунд; 0.05%-ий розчин азотнокислого срібла з експозицією 15-30 с та з наступним промиванням у стерильній воді протягом 30 хв; 0.1%-ий розчин сулеми; гіпохлорид натрію розведений дистильованою водою 1:3.

Вологі камери з рослинним матеріалом, як правило, витримують за температури 15-20⁰С протягом 1-3 днів. Слід також урахувати, що окремі збудники вимагають понижених температурних умов – 8-10⁰С, а також те, що тривалість інкубування об'єктів визначається часом, за який гриби формують різні типи спороношення. Після того, як на поверхні частин рослин, що знаходиться у вологих камерах, з'являються морфологічні структури гриба, проводять їх мікроскопічний аналіз та ідентифікацію патогена.

2.3.2. Метод поживних середовищ

У разі, коли діагностувати хворобу за симптомами її проявлення та наявними структурами збудника на поверхні, або всередині уражених тканин не вдається, необхідно вилучити його в чисту культуру на живильне середовище та дослідити морфологічні, біологічні та патогенні властивості. Слід мати на увазі, що більшість грибів збудників хвороб піддається культивуванню *in vitro*, особливо це характерно для факультативних паразитів. Однак і вони в окремих випадках потребують для свого росту і розвитку селективних середовищ. Надзвичайно важко, а в більшості й

неможливо вирощувати поза межами тканин рослин господарів облігатних паразитів.

Вилучення грибів із кореневої системи рослин. Кореневу систему рослин вражає різноманітна кількість фітопатогенних грибів, котрі в більшості викликають такі хвороби як коренева гниль, чорна ніжка та коренеїд.

Коренева гниль – це захворювання кореневої системи та прикореневої частини стебла багатьох сільськогосподарських культур (пшениці, вівса, ячменю, гороху, віки, кукурудзи та ін.), може бути викликана одним або комплексом видів грибів. Залежно від збудника розрізняють різні типи корневих гнилей: на пшениці – фузаріозна гайманоміцетова, звичайна та церкоспорельозна; на горосі – фузаріозна, ризоктоніоз на, афаноміцетна, акохітозна, пітіозна та ін.

Зовні коренева гниль проявляється у вигляді побуріння та загнивання коріння, або основи стебла. Хворі рослини відстають у рості, жовтіють і відмирають. Водночас, у польових умовах не завжди можливо т очно діагностувати вид кореневої гнилі. Тому для цього, порядок із зовнішнім оглядом, диференційовано використовують ряд лабораторних методів стосовно певних груп грибів.

Діагностика фузаріозної кореневої гнилі. Хвороба зустрічається повсюди (на зернових, зернобобових та ін..) і проявляється в усі фази вегетації сільськогосподарських рослин. У результаті візуального огляду прикореневої частини стебла, первинних та вторинних корінців на їх поверхні можна помітити бурі плями, корті з часом розростаються та повністю охоплюють уражені органи. В умовах підвищеної вологості повітря основа стебла може покриватися білим, або біло-рожевим нальотом, що являє собою конідіальне спороношення грибів. Уражені рослини легко витягуються з ґрунту.

Для точної діагностики хвороби, проводять ідентифікацію її збудника. В цьому разі свіжовикопане хворе коріння та прикореневі частини рослин ретельно промивають під струменем водопровідної води і просушують між шарами фільтрувального паперу, після чого здійснюють поверхневу дезінфекцію (витримують у 0.5%-му розчині марганцевокислого калію протягом 20 хв.), поміщають у вологу камеру або висівають на живильне середовище (сусло-агар). Спостереження за матеріалом проводять на 2-3 добу. При утворенні міцелію на уражених органах його пересівають у чашку Петрі з живильним середовищем. Вилучені в чисту культуру гриби ідентифікуються на 15-ту добу.

Діагностика афаноміцетної кореневої гнилі. Під час ураження рослин афаноміцетною кореневою гниллю тканина кореня змінює своє забарвлення від світло-коричневого до темно-коричневого та бурого кольору. При витягуванні уражених рослин з вологого ґрунту в ньому повністю залишається кора кореня, а витягуються тільки волокнисті залишки центрального кореня з центральними циліндрами бічних коренів.

Найефективнішим для вилучення гриба *Aphanomyces euteiches* Drechs. є метод «примарок» в якому використовують сприятливі до патогенна рослини. Для цього, відбирають ґрунтові проби (в 12-17 місцях поля, загальною масою 0,5-1,0 кг), засипають ними ємкості, в котрих вирощують бобові рослини (в темницях при температурі 20-24⁰С). Через 5-10 діб після висіву насіння, проростки з ознаками ураження викопують і ретельно промивають під проточною водопровідною водою протягом 30-60 хв. Ураженні органи розрізають на дрібненькі шматочки (1-2 мм), дезінфікують (0,5%-м гіпохлоридом Са протягом 2-3 хв.), промивають стерильною водою, підсушують та розкладають на селективне живильне середовище (чорносливовий агар) у чашки Петрі. В подальшому проводять мікроскопічний аналіз культури гриба та його ідентифікацію.

Вилучення грибів із листків. Уражені листки промивають під проточною водою, проводять поверхневу їх стерилізацію, промивають у стерильній воді для видалення дезінфікуючих речовин. Після цього стерильним пінцетом матеріал переносять на дезінфіковану робочу поверхню і розміщують по 3-5 шт. у чашці Петрі із необхідним живильним середовищем, інкубують у термостаті за температури 20⁰С. В подальшому щоденно проводять спостереження за ростом гриба. При колонізації ним живильного середовища його відразу ж переносять в іншу чашку Петрі для подальшого о культивування.

Слід відзначити, що серед різних видів фітопатогенних грибів існує відмінність у вимогах до температури, освітлення та елементів живлення, необхідно враховувати при їх ізоляції.

Вилучення грибів із плодів. Якщо на поверхні уражених плодів є спороношення патогенна, то його слід перенести за допомогою мікроскопічної голки у стерильну воду і зробити ряд розведень та висіяти на живильне середовище. У разі, якщо спороношення відсутнє, тоді для провокування утворення структур грибів на плодах, проводять поверхневу стерилізацію останніх та поміщають у вологу камеру. Після з'явлення спороношення його переносять у стерильну воду, роблять розведення та висівають. Наступний спосіб вилучення фітопатогенних грибів – проводять поверхневу стерилізацію хворих плодів, розрізають їх на шматочки та розкладають на живильне середовище. В подальшому колонії грибів відсівають, культивують до утворення органів спороношення та проводять мікроскопічний аналіз.

Вилучення грибів із насіння. Фітопатогенні гриби можуть знаходитися на поверхні насіння (екзофітна інфекція) у вигляді спор, а також всередині насінин (ендофітна інфекція) у вигляді міцелію. Тому способи вилучення грибів диференційовані.

Для ідентифікації поверхневої мікрофлори насіння засипають у стерильну воду та енергійно струшують (для змивання спор). Наступним кроком є послідовне розведення отриманої суспензії, нанесення її на агаризоване середовище, що містить антибіотики (для пригнічення росту бактерій) та інкубування за температури 20⁰С. Після короткого культивування колоній, що утворилися, відсівають на стандартні середовища і продовжують їхнє вирощування до утворення спороношення, за яким і проводять визначення грибів.

У разі, якщо міцелій гриба знаходиться всередині насіння, тоді слід провести поверхневу їх стерилізацію, розкласти у вологі камери, або на живильне середовище в чашку Петрі (за необхідності насіння розрізають) та розмістити в термостаті для інкубування. При цьому регулярно проводять спостереження за об'єктами. Міцелій гриба, що утворюється на поверхні насінини, переносять у нові чашки із середовищем та культивують до утворення спороношення.

2.3.3. Приготування поживних середовищ

Для вилучення та ідентифікації фітопатогенних грибів і бактерій з уражених рослин використовують культуральний метод. З цією метою застосовують живильні середовища визначеного складу. Оскільки потреба різних мікроорганізмів в елементах живлення значно різняться, складові частини одного середовища можуть бути придатними для одних із них та непридатними для інших.

Нижче наведені рецепти найбільш придатних для використання живильних середовищ.

Глюкозо-пептонний агар: глюкоза – 20 г, пептон – 5 г, агар – 20 г, дистильована вода – 1000 мл.

Солодовий агар: агар – 20 г, солод – 30 г, дистильована вода – 1000 мл.

Вівсяний агар: агар – 20 г, екстраговане вівсяне борошно – 30 г, дистильована вода – 1000 мл.

Середовище Чапека: KH_2PO_4 – 0,5 г; MgSO_4 – 0,5 г; KNO_3 – 1,0 г; FeSO_4 – 10 мг; CaCO_3 – 5,0 г; сахароза – 20,0 г; агар – 20,0 г; дистильована вода – 1000 мл.

Живильне середовище Чапека-Докса: калій-фосфат – 1,0 г; NaNO_3 – 2,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г; KCl – 0,5 г; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г; глюкоза 50 г; дистильована вода – 1000 мл.

Картопляно-декстрозний агар (КДА) використовується для вилучення багатьох грибів. Для приготування беруть 200 г очищеної та дрібно нарізаної картоплі, розміщують у посуді із вмістом 1000 мл дистильованої води та кип'ятять на повільному вогні або на водяній бані 40 хвилин. Однак краще використовувати водяну баню, яка попереджує википання води. Відвар зливають (при виконанні доливають воду до початкового об'єму – 1 л), додають до нього 20 г декстрази та 20г агару, після чого автоклавують при 1 атмосфері 30 хвилин.

Солодо-пептонний агар для утворення конідій *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Drechsler: солод ячмінний – 10 г; пептон – 2,5 г; агар – 20 г; дистильована вода 1000 мл. Солод готують із триденних проростків ячменю; для цього їх підсушують при температурі 40⁰С в сушильній шафі та подрібнюють до борошна.

Модифіковане середовище Чапека для ізоляції грибів роду *Drechslera*
Ito: KH_2PO_4 – 0,5 г; MgSO_4 – 0,5 г; KCl – 0,5 г; сечовина – 0,5 г; лактоза – 20 г; агар – 20 г; дистильована вода – 1000 мл.

Середовище для стимулювання спороношення гриба *Botrytis cinerea*
Pers.: пивне сусло (16-17% за аерометром Баллінга) – 500 мл; NaNO_3 – 2,0 г; агар – 18 г; дистильована вода – 500 мл. Пивне сусло змішують із дистильованою водою та NaNO_3 . Суміш нагрівають на водяній парі та

додають агар до повного його розчинення, після чого розливають у колби та автоклавують.

Модифіковане середовище Чапека для вилучення грибів роду *Drechslera*

Ito: на 1 л дистильованої води беруть: KH_2PO_4 – 0,5 г; MgSO_4 – 0,5 г; KCl – 0,5 г; сечовини- 1,5 г; лактози – 20 г; агар – 20г.

Сусло-агар: агар – 20 г; підігріте сусло – 170 мл; дистильована вода – 850 мл.

Кукурудзяний агар для вилучення видів роду *Pythium* із ґрунту: зерно кукурудзи – 25 г; агар – 20 г; ністатин – 50 мл/л; стрептоміцинсульфат – 100 мл/л; дистильована вода 1000 мл. Зерно кукурудзи варять 1 годину в 1 л дистильованої води, в гарячий відвар додають агар, розчиняють, ще раз фільтрують та автоклавують. Після охолодження середовища до 50°C в нього додають антибіотики.

Житній шрот-агар для гриба *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary: житній-шпот – 50 г; декстроза – 10 г; агар – 10 г; дистильована вода – 1000 мл. Суміш слід розігріти на водяній бані до повного розчинення агару. Після відстоювання живильне середовище розлити в посуду та автоклавувати. Приготовлене середовище є непрозорим.

Живильне середовище за Багбі для вилучення *Phoma betae* Frank: 1. Ґрунтовий екстракт: 1 кг ґрунту в 1000 мл дистильованої води слід стерилізувати в автоклаві 30 хв. при 110°C , після чого відфільтрувати. 2. Живильне середовище: K_2HPO_4 – 4 г; KH_2PO_4 - 1,5 г; ґрунтовий екстракт 25 мл; борна кислота 200 мг; стрептоміцинсульфат – 100 мл/л; хлортетрациклін – 100 мл/л; беноміл – 100 мл/л; агар – 17 г; дистильована вода – 1000 мл. Антибіотик додають після автоклавування при охолодження середовища до 50°C .

Лактозне живильне середовище для стимулювання утворення хламідоспор *Fusarium culmorum* (W. G. Sm) Sacc.: KNO_3 – 10 г; MgSO_4 *

7H₂O – 0,5 г; KCl – 0,5 г; FeSO₄ – 0,01 г; лактоза – 20 г; дистильована вода – 1000 мл.

Середовище для отримання інфекційного матеріалу грибів роду *Fusarium Link*, а також видів *Septoria nodorum Berk*, *Clavisept purpurea Tul.*: зерно пшениці – 25 г; дистильована вода – 30 мл. Зернівки ретельно промити, розсипати на фільтрувальному папері і залишити на 12 годин. Після чого 25 г зернівок та 30 мл води поміщують у колбу Ерленмеєра місткістю 100 мл, закривають пробкою та два дні автоклавують по 30 хвилин.

Агар Докса для стимулювання утворення макроконідій *F. Culmorum Sacc.*: сахароза – 15 г; NaNO₃ – 2,0 г; KCl – 0,5 г; KH₂PO₄ – 1 г; MgSO₄ * 7H₂O – 0,5 г; FeSO₄ – 0,01 г; агар – 20 г; дистильована вода 1000 мл. Перед автоклавуванням рН середовища слід довести до 7,0 за допомогою розчину карбоната натрію. В іншому разі, живильне середовище після автоклавування може не застигнути.

Живильне середовище за Матуру для спороношення *Colletotrichum lindemuthianum B. et cav.*: глюкоза – 2,80 г; MgSO₄ * 7H₂O – 1,23 г; K₂HPO₄ – 2,72 г; пептон – 1,00 г; дріжджовий екстракт – сліди; агар – 20 г; дистильована вода – 1000 мл.

Середовища для вилучення флуоресцентних псевдо монад: протеазон-пептон – 20,0 г; гліцерин – 8,0 мл; K₂SO₄ – 1,5 г; MgSO₄ * 7H₂O – 1,5 г; агар – 15,0 г; дистильована вода – 940 мл. Рівень рН середовища доводять до 7,2. Стерилізують 15 хвилин за температури 121⁰С та після охолодження до 60⁰С додають 60 г/л пеніциліну, 50 г/л новобіоцину та 100 мг/л актидіону.

Середовище Ліске для *Agrobacterium tumefaciens*: гліцерин – 20 г; селітра – 5 г; K₂HPO₄ – 1 г; MgSO₄ * 7H₂O – 1 г; дистильована вода – 1000 мл.

Синтетичне нітратне середовище для культивування бактерій: K₂HPO₄ – 0,5 г; CaCl₂ – 0,5 г; MgSO₄ * 7H₂O – 0,2 г; глюкози – 10,0 г; KNO₃ – 1,0 г; дистильованої води – 1000 мл.

Напівселективне середовище Рой і Сасера для вилучення Agrobacterium tumegaciens biovar: адонітол – 1,00 г; MgSO₄ – 0,20 г; K₂HPO₄ – 0,90 г; K₂HPO₄ – 0,70 г; NaCl – 0,20 г; фунгіцид Браво – 4,00 г; агар – 15,00 г. Кислотність середовища доводять до рН 7,2. Стерилізацію здійснюють при 1 атмосфері протягом 10 хвилин. Після зниження температури до 50⁰С у середовище додають триметопром – 0,02 г/л та трифенілтетразоліум хлорид – 0,08 г/л.

2.4. Молекулярний метод ідентифікації

Метод полімеризації ланцюгової реакції (ПЛР) належить до молекулярного методу діагностики хвороб рослин. Він дозволяє визначити наявність патогена ще до прояву видимих ознак хвороби. Метод відзначається високою точністю та швидкістю. Використовується для виявлення як екзофітної, так і ендофітної інфекції. Суть методу полягає в ампліфікації видоспецефічних послідовностей ДНК в ході полімеразної ланцюгової реакції, коли окремі фрагменти ДНК, характерні лише для одного виду, вибірково синтезуються ферментом полімеразою. В подальшому фермент виявляється за допомогою електрофорезу в агаровому гелі. Слід відзначити, що використання методу ПЛР потребує дорогого обладнання, реактивів, а також попереднього вивчення різноманітності ДНК грибів.

2.5. Імунологічний метод ідентифікації

Імунологічний метод ідентифікації використовують для діагностики патогенів рослин. Він ґрунтується на специфічності антисыворотки до фітопатогенних грибів. Високою специфічністю відзначається антисыворотки до очищених екстрактів грибів, а також ферментів та токсинів. Складність

імунологічного методу є отримання специфічних антисывороток та часто їх широкою перехресною реактивністю відносно грибів інших родів.

2.6. Фізико - хімічний метод ідентифікації

Газова хромато-масс-спектрометрія належить до фізико-хімічних методів діагностики і ґрунтується на аналізі та ідентифікації летючих органічних речовин, що виділяються у повітря фітопатогенними грибами з уражених тканин рослин. Перевага газової хромато-масс-спектрометрії полягає у швидкості діагностики хвороб та здатності виявити їх на початкових етапах паразитування грибів, а також при латентному протіканні захворювання. Водночас, забрудненням для широкого застосування цього методу є дорожнеча необхідного для аналізу обладнання.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Основна:

1. Банкина Б. С. Диагностика фиалофорозного увядания гвоздики ремонтантной люминесцентным методом // Бюл. ВИЗР. – 1989. – Вып. 74. – С. 90-94.
2. Кирик Н. Н., Лобань В. Л., Коцевский И. И. Гистологические и гистохимические методы исследования при изучении патологического процесса и устойчивости растений к болезням // Методические указания. – К., 1985 – 23 с.
3. Кирик Н. Н., Пиковский М. И. Грибные болезни гороха // Защита и карантин растений. – 2006. - № 6. – С. 46-49.
4. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С. П. Васер, И. А. Элланская и др. / Под. ред. В. И. Билай. – К.: Наук. Думка, 1982. – 452 с.
5. Піковський М. Й., Кирик М. М. Біла гниль огірка // Карантин і захист рослин. – 2005. - № 10. – с. 28-29.

Додаткова:

1. Bovigny R.-Y. Les systems experts dans le domanie vegetal // Rev. hortic. Suisse.-1990. – Vol. 63, № 7-8. – P. 18-187.
2. Bugbee W. M. A selective raedium for the enumeration and isolation of Phoma betae from soil and seed // Paytopathoiogy. – 1974/ - V. 64.-P. 706-708/
3. De Lacy Costello B.P., Evans P, Ewen R.J., Gunson H.E.,Jones P.R.H.,Rateliffe N. M., Spencer-Phillip P.T.N.Cas chromatography-mass spectrometry analyses of volatile organic compounds from potato tubers inoculated with Phytophthora infestan or Fusarium coeruleum // Plant Pathology. –2001.Vol. 50. – P. 489-496.
4. Dewey F. M. Development of immunological diagnostic assays for fungal plant pathogens // Proc. Brightoa crop protection conf. – pests and diseases. Thornton Heath (Sun.). – 1988 – Vol. 2 – P. 777-786.

5. Henson I. M., Goins T., Grey W., Mathre D. E., Elliott M. L. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil // *Phytopathology* – 1993 – Vol. 83 – P. 283-287.
6. Roy M., Sesser M. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3// *Phytopathology*. – 1983. – Vol/ 73. – P. 810.
7. Smith O.P., Peterson G. L., Back R. J., Shaad N. W., Bonde M.R., Dewelopment of a PSR- based method for identification of *Tilletia indica*, casual agent of carnival bunt of wheat // *Phytopathology*- 1996- Vol. 86.- P. 115- 122.

СХЕМА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗБУДНИКА ХВОРОБИ

Культура: _____

Тип інфекції: _____

Назва хвороби, збудник: _____

Візуальна діагностика . Зовнішні діагностичні ознаки хвороби:

Діагностичні ознаки, які вимагають лабораторних досліджень:

2.Лабораторні методи досліджень:

2.1.Мікроскопічні методи ідентифікації збудників хвороб:

2.2. Гістологічні методи ідентифікації

2.3. Біологічні методи ідентифікації:

2.4. Молекулярний метод ідентифікації:

2.5. Імунологічний метод ідентифікації:

2.6. Фізико - хімічний метод ідентифікації:

Доцент, к.с-г н. Балан Г.О.

