

Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**В. Б. Звягинцев, В. А. Ярмолович**

# **УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ВРЕДИТЕЛЯМ И БОЛЕЗНЯМ ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ**

*Рекомендовано  
учебно-методическим объединением  
по образованию в области природопользования  
и лесного хозяйства в качестве учебно-методического пособия  
для студентов учреждений высшего образования  
по специальности 1-75 01 01 «Лесное хозяйство»  
специализации 1-75 01 01 03 «Защита леса»*

Минск 2016

УДК 630\*41(076.5)

ББК 44.9я73

345

**Рецензенты:**

кафедра ботаники Белорусского государственного университета;  
старший научный сотрудник лаборатории микологии  
НУ «Институт экспериментальной ботаники Национальной  
академии наук Беларуси» кандидат биологических наук  
*Д. Б. Беломесяцева*

*Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или ее части не может быть осуществлено без разрешения учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет».*

**Звягинцев, В. Б.**

345 Устойчивость растений к вредителям и болезням. Лабораторный практикум : учеб.-метод. пособие для студентов специальности 1-75 01 01 «Лесное хозяйство» специализации 1-75 01 01 03 «Защита леса» / В. Б. Звягинцев, В. А. Ярмолович. – Минск : БГТУ, 2016. – 75 с.

ISBN 978-985-530-529-4.

Приведены лабораторные работы по основным разделам курса «Устойчивость растений к вредителям и болезням», которые содержат короткую теоретическую часть и подробное описание методики, порядка обработки экспериментальных данных, вопросы для самоконтроля.

Лабораторный практикум предназначен для студентов, обучающихся по специальности «Лесное хозяйство» специализации «Защита леса». Может быть использован студентами и исследователями для выяснения механизмов устойчивости растений при изучении некоторых дисциплин биологического профиля.

**УДК 630\*41(076.5)**

**ББК 44.9я73**

**ISBN 978-985-530-529-4** © УО «Белорусский государственный  
технологический университет», 2016  
© Звягинцев В. Б., Ярмолович В. А., 2016

# ПРЕДИСЛОВИЕ

---

*Устойчивость растений* – это невосприимчивость их к вредителям, болезням и другим стрессовым факторам биотического и абиотического характера. Часто термин «устойчивость» заменяют термином «иммунитет» (от лат. *immunitas* – свободный от чего-либо). Таким образом, наука об иммунитете изучает функции и свойства растений, различные факторы внешней среды, определяющие их способность противостоять поражению (или повреждению) вредоносными организмами.

В практике культивирования встречаются виды и популяции растений, обладающие неодинаковой восприимчивостью к вредоносным организмам. Степень восприимчивости может колебаться от полного отсутствия признаков заражения (заселения) растений, и именно в этом случае чаще применяют термин «иммунитет», до серьезных поражений (повреждений), приводящих к их гибели.

В период своего возникновения учение об иммунитете было составной частью микробиологии, физиологии, ботаники и ряда других наук, однако в настоящее время представляет собой самостоятельную дисциплину. Это обусловлено особым кругом вопросов, которые она изучает, и специфичностью методов, которые использует.

Изначально устойчивость растений рассматривалась применительно к сельскохозяйственным культурам. Повышение интенсивности и уровня ведения лесного хозяйства, возникновение плантационного лесоводства, успехи лесной селекции и генетики поднимают практическую важность вопросов устойчивости лесообразующих древесных видов. Длительный период жизни – от семени и до возраста спелости – дерево сопровождают комплексы ассоциированных с данной породой организмов, многие из которых, являясь фитофагами и фитопатогенами, способны существенно влиять на продуктивность древостоев и устойчивость лесных сообществ в целом.

Особую опасность для лесного хозяйства представляют вредители и возбудители болезней, проникшие на территорию республики с других регионов (инвайдеры, инвазивные виды). Зачастую инвайдеры не испытывают существенного сопротивления со стороны растений-хозяев, т. к. последние не выработали механизмы

защиты от данного вида или расы вредоносных организмов. К примеру, в лесах Европы многие инвазивные патогены и вредители сформировали вторичные ареалы и оказывают существенное влияние на состояние и устойчивость лесов отдельных формаций. В начале XX в. такой масштабной инвазией в Западной и Центральной Европе стало проникновение возбудителя мучнистой росы дуба *Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl. В середине века Европу охватила вспышка развития голландской болезни ильмовых пород, вызываемой аскомицетом из рода *Ophiostoma* (родина которого – Юго-Восточная Азия). Катастрофическое воздействие этого патогена сделало неперспективным выращивание ценных насаждений вяза гладкого и в Беларуси.

В конце XX – начале XXI в. насаждения Европы охвачены уже целым комплексом разрушительных инвазий: халаровый некроз ясеня, вызываемый аскомицетом *Hymenoscyphus fraxineus* Baral et al. 2014 (родина – Дальний Восток); фитофтороз ольхи, вызываемый оомицетом *Phytophthora alni* Brasier et S. A. Kirk 2004 (происхождение неизвестно, впервые выявлен в Англии); вилт хвойных пород, возбудителем которого является сосновая стволовая нематода *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle (родина – Северная Америка); некроз коры пихты, вызываемый грибом *Grosmannia aoshimae* (Ohtaka & Masuya) Masuya & Yamaoka (родина – Дальний Восток), переносимым уссурийским полиграфом *Polygraphus proximus* Blandford.

Искоренение инфекции новых патогенов и полное уничтожение популяций чужеродных насекомых в лесных насаждениях не представляется возможным, поэтому одним из немногих средств противодействия инвайдерам является профилактика и разработка мер по повышению устойчивости леса как биогеоценоза в целом, так и отдельных его компонентов.

Данное пособие предназначено для изучения студентами специальности «Лесное хозяйство» специализации «Защита леса» в соответствии с действующей учебной программой по дисциплине «Устойчивость растений к вредителям и болезням» в части проведения лабораторных опытов, однако может быть полезным и для работников лесного хозяйства, студентов, изучающих дисциплины биологического профиля, научных работников, исследователей.

В пособие включены основные темы учебной программы, что поможет студентам закрепить и углубить теоретическую часть

изучения дисциплины. В большинстве случаев описанные в практикуме лабораторные занятия рассчитаны на выполнение их в течение 2-х академических часов. В то же время некоторые работы предусматривают постановку длительных биологических опытов (проращивание семян, выращивание сеянцев), поэтому рекомендуется на первом часу первого занятия заложить опыты по одной лабораторной работе, а на втором часу поставить опыты по второй работе. Снимать результаты эксперимента и анализировать их предлагается на следующем занятии по тому же принципу. Кроме того, некоторые запланированные исследования требуют проведения систематических наблюдений за их результатами для выявления динамики изучаемых процессов. Такие наблюдения студенты проводят самостоятельно по установленному графику.

Количество лабораторных работ пособия несколько превышает количество часов учебной программы, что позволяет обучающимся и преподавателю выбрать работы в зависимости от наличия опытного материала, проявленного интереса студентов к постановке определенных экспериментов.

В большинстве случаев предусматривается выполнение достаточно простых биологических опытов, однако в ряде лабораторных работ используется современное лабораторное оборудование и некоторые химические реактивы, что предполагает задействование в учебном процессе лаборатории физиологии растений.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам кафедры лесозащиты и древесиноведения Белорусского государственного технологического университета доценту *Баранову М. И.* и доценту *Ковбасе Н. П.* за возможность использования некоторых методических разработок по физиологии и биохимии растений в целях адаптации их применительно к целям изучения устойчивости растений к вредителям и болезням.

Глубоко признательны за проделанную работу и высказанные замечания рецензентам пособия: сотрудникам кафедры ботаники Белорусского государственного университета (заведующей кафедрой кандидату сельскохозяйственных наук, доценту *Поликсеновой В. Д.* и доценту кафедры кандидату биологических наук, доценту *Грушецкой З. Е.*), а также старшему научному сотруднику ГНУ «Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси» кандидату биологических наук *Беломесяцовой Д. Б.*

# 1. ОСНОВЫ ПАТОФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

---

Патологический процесс возникает в результате взаимодействия патогена с растением или как ответная реакция последнего на неблагоприятные условия внешней среды. Он сопровождается разнообразными изменениями, происходящими в тканях растения. Характер этих изменений зависит от вида и стадии развития возбудителя, местоположения и выполняемых функций пораженной ткани растения, защитных реакций растения и других факторов. Наиболее часто болезнь вызывает биохимические, физиологические и анатомические изменения отдельных его частей или органов либо растения в целом.

На первых этапах развития болезни биохимические и физиологические процессы больного растения незначительно отличаются по характеру и интенсивности течения таковых в здоровом организме. В некоторых случаях процесс заражения растений патогеном и внедрение его в поражаемые ткани сопровождаются активными защитными реакциями последнего, что приводит даже к более интенсивному течению многих физиологических процессов. В дальнейшем наступают существенные нарушения функций больного растения, что отрицательно сказывается на его состоянии. Наиболее часто биохимические и физиологические изменения сводятся к нарушению водного режима растения, его фотосинтетической активности, энергии дыхания, углеводного и белкового обмена, а также к нарушению деятельности ферментов.

## **Лабораторная работа № 1**

### **ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ В СВЯЗИ С БОЛЕЗНЬЮ**

*Общие положения.* Болезни растений, например различного рода пятнистости листьев, ржавчина, мучнистая роса и другие, приводят к нарушению ассимиляционных процессов, протекаю-

щих в растительных тканях. В большинстве случаев эти нарушения имеют дегенеративный характер, т. к. возбудитель болезни (*патоген*) либо непосредственно разрушает клеточные структуры растения, либо сильно угнетает питающее растение (*хозяина*), забирая у него воду, питательные вещества, отравляя продуктами своей жизнедеятельности, что также негативно влияет на физиологические процессы растения.

Наиболее часто встречающимися внешними проявлениями (*симптомами*) болезней растений являются пожелтение, покраснение, побурение хвои (листьев), что в большинстве случаев связано с разрушением пигментов в ассимиляционном аппарате или изменением их процентного соотношения в тканях хозяина под воздействием патогена либо других факторов.

К основным группам растительных пигментов, которые принимают участие в процессе фотосинтеза и могут быть прямо или косвенно разрушены патогеном, относятся зеленые пигменты *хлорофиллы*, а также пигменты желтого, оранжевого и красного цвета под названием *каротиноиды*.

Зеленые пигменты представлены хлорофиллами *a* и *b*. Они принимают непосредственное участие в процессах фотосинтеза, поэтому количество и соотношение хлорофиллов – важный показатель, по которому можно оценить работу фотосинтетического аппарата растений, и, следовательно, продуктивность и устойчивость растений к вредным организмам. В листьях здоровых растений количество хлорофилла составляет от 0,3 до 1,3% сухой массы листа. Хлорофилла *a* примерно в 3 раза больше, чем хлорофилла *b*.

Каротиноиды представлены *каротинами* и *ксантофиллами*. Каротиноидов в 3–5 раз меньше, чем хлорофиллов.

Определение количественного содержания пигментов проводится путем их экстракции полярным органическим растворителем (спиртом или ацетоном). Концентрация пигментов в полученном растворе устанавливается при помощи спектрофотометра, затем пересчитывается на единицу массы листа.

Сущность спектрофотометрического метода анализа сводится к определению оптической плотности (*D*) общей вытяжки пигментов при длине волн, которые соответствуют максимумам поглощения пигментов в данном растворителе: для хлорофиллов в 100%-ном ацетоне – 662 и 644 нм, в 96%-ном этаноле – 665 и 649 нм; для каротиноидов – 440 нм независимо от растворителя.

Концентрация пигментов в растворе рассчитывается по следующим формулам:

1) для 100%-ного ацетона (по Хольму – Ветштейну), мг/л

$$C_a = 9,784D_{662} - 0,990D_{644};$$

$$C_b = 21,426D_{664} - 4,650D_{662};$$

$$C_{a+b} = 5,134D_{662} + 20,436D_{644};$$

$$C_{\text{карот}} = 4,695D_{440} - 0,268C_{(a+b)};$$

2) для 96%-ного этанола (по Винтермансу и Де Мотсу, 1965), мг/л

$$C_a = 13,70D_{665} - 5,76D_{649};$$

$$C_b = 25,80D_{649} - 7,60D_{665};$$

$$C_{a+b} = 6,10D_{665} + 20,04D_{649}.$$

Концентрация каротиноидов в спиртовом растворе рассчитывается так же, как и в растворе ацетона.

На основании концентрации пигментов в 1 л исследуемого раствора рассчитывается их количество в 1 г ткани листа по формуле

$$A = CV / (1000P),$$

где  $A$  – количество пигментов в растительном материале (мг/г сырой массы);  $C$  – концентрация пигментов (мг/л);  $V$  – объем вытяжки (мл);  $P$  – навеска растительной ткани (г).

**Цель работы:** сравнение количественного содержания пигментов в здоровых и пораженных патогенами тканях листьев для оценки степени нарушения возбудителями болезней фотосинтеза и других физиолого-биохимических процессов растений.

**Оборудование и материалы:** ступки фарфоровые (2 шт.); пестики (2 шт.); ножницы; насос Комовского; весы торсионные; колба Бунзена; фильтр Шотта № 2; стеклянные палочки (2 шт.); колбы емкостью 25 мл с пробками (2 шт.); мерный цилиндр емкостью 25 мл (2 шт.); спектрофотометр; ацетон 100%-ный либо спирт этиловый 96%-ный;  $\text{CaCO}_3$ ; кварцевый песок; вазелин; здоровые и пораженные листья растений.

**Методика и ход выполнения работы.** Перед началом работы группа студентов разбивается на две бригады. Работа выполняется



в двух повторностях: одна бригада работает со здоровыми листьями растений, вторая – с пораженными; полученные результаты сравниваются членами бригад по завершению опытных работ.

1. Отобрать 2 листа на одном и том же растении, один из листьев должен иметь выраженные симптомы поражения болезнью (мучнистой росой, ржавчиной или пятнистостью), а второй должен быть внешне здоровым. Правильность отбора проверяет преподаватель. Желательно, чтобы были сорваны листья, расположенные рядом. Каждый лист (здоровый и пораженный) подвергается анализу разными бригадами. У листьев вырезаются крупные жилки, и на торсионных весах взвешивается 50–70 мг тканей листа без жилок.

2. Отмерить 15 мл растворителя (спирта или ацетона).

3. Навеску листа следует перенести в фарфоровую ступку, добавить немного углекислого кальция (для нейтрализации органических кислот), кварцевого песка и около 0,5 мл растворителя (из 15 мл, отмеренных ранее). Растереть навеску до однородной массы пестиком. Прилить к растертой массе еще около 5 мл растворителя и с помощью стеклянной палочки смыть стенки ступки. Смазать носик ступки вазелином с внешней стороны, быстро опрокинуть ступку с экстрактом на фильтр Шотта № 2, вставленный в колбу Бунзена. Капли раствора снять с носика ступки стеклянной палочкой. Несколько раз смыть пестик и ступку остатком растворителя таким образом, чтобы не было утрачено ни одной капли раствора.

4. Профильтровать вытяжку при помощи насоса Комовского. Промыть фильтр несколько раз небольшими порциями растворителя. Перенести фильтрат в мерный цилиндр емкостью 15 мл. Дважды обмыть колбу Бунзена и перенести жидкость в этот же мерный цилиндр. Растворителем довести уровень раствора в цилиндре до 15 мл, перемешать и вылить в колбу. Заткнуть колбу пробкой. Хранить вытяжку пигментов следует в темном месте.

5. Определить на спектрофотометре оптическую плотность раствора при тех длинах волн, которые соответствуют используемому растворителю.

6. Результаты измерений занести в таблицу по форме, приведенной в табл. 1. Обменяться отсутствующими данными с членами другой бригады.

Таблица 1

**Показания спектрофотометра при соответствующих длинах волн  
в вариантах опыта**

| Объект исследований | Навеска, мг | Объем вытяжки, мл | Оптическая плотность при длине волны, нм |  |  |
|---------------------|-------------|-------------------|------------------------------------------|--|--|
|                     |             |                   |                                          |  |  |
| Здоровый лист       |             |                   |                                          |  |  |
| Пораженный лист     |             |                   |                                          |  |  |

7. Рассчитать по вышеприведенным формулам концентрацию пигментов в миллиграммах на литр раствора, миллиграммах на грамм сырой навески, а также их соотношения. Результаты записать по форме, приведенной в табл. 2.

Таблица 2

**Содержание пигментов и их соотношение  
в листьях различного состояния**

| Объект исследований | Содержание пигментов, мг/л раствора |                 |                  | Содержание пигментов в сырых листьях, мг/г |                 |                  | Соотношения пигментов |                                    |
|---------------------|-------------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------------------------|
|                     | хл.<br><i>a</i>                     | хл.<br><i>b</i> | кароти-<br>ноиды | хл.<br><i>a</i>                            | хл.<br><i>b</i> | кароти-<br>ноиды | <i>a</i> / <i>b</i>   | $\Sigma(a + b)$ / ка-<br>ротиноиды |
| Здоровый лист       |                                     |                 |                  |                                            |                 |                  |                       |                                    |
| Пораженный лист     |                                     |                 |                  |                                            |                 |                  |                       |                                    |

8. Проанализировать результаты, сравнить их по вариантам исследований и сделать выводы о влиянии патогенов на содержание и соотношение различных пигментов в листьях.

***Контрольные вопросы***

1. Как по внешним признакам различаются пораженные и здоровые листья растения?
2. Какие пигменты разрушаются быстрее при развитии патогенов?
3. Чем обусловлено пожелтение или покраснение пораженных и отмирающих листьев?
4. Как изменяется интенсивность течения процесса фотосинтеза на разных этапах развития патологического процесса в растении?

## Лабораторная работа № 2

### ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ТРАНСПИРАЦИИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

**Общие положения.** *Транспирация* – процесс движения воды через растение и ее испарение через наружные покровы многих органов растений, таких как листья, стебли и цветы. Влага необходима для жизнедеятельности растения, но только небольшая часть воды, поступающей через корни, используется непосредственно для нужд роста и метаболизма. Наибольшая ее часть (порядка 99,0–99,5%) теряется посредством транспирации. Для характеристики этого процесса используется показатель *интенсивности транспирации* – это количество миллиграмм воды, испаренное за 1 ч с поверхности в 1 дм<sup>2</sup> (мг/(дм<sup>2</sup> · ч)). Наиболее интенсивно транспирируют листья растений, значительно меньше эта способность у почек, побегов и других органов. Поверхность листа покрыта порами, называемыми *устьица*, при их помощи происходит газообмен растения с окружающей средой. Устьица ограничены замыкающими клетками и сопровождающими клетками (вместе известными как *устыичный комплекс*), которые открывают и закрывают поры. Транспирация проходит через *устыичные щели*, выполняя функции охлаждения растения, а также изменяет осмотическое давление в клетках и обеспечивает движение воды и питательных веществ от корней к побегам.

На транспирацию влияют особенности структурной организации органов растений и внешние факторы: температура, влажность воздуха и почвы, свет, ветер, воздействие патогенов и вредителей.

Заболевания или повреждения обычно сопровождаются обезвоживанием тканей в результате:

- усиления отдачи воды клетками из-за нарушения их функциональности или гибели;
- усиления отдачи воды органами при повреждении покровных тканей (кутикулы, эпидермиса, корки);
- нарушения поступления воды, которое обычно наступает при поражении корневой системы растения, что негативно влияет на водоснабжение надземных частей (например, при поражении корневыми гнилями или объедании корней почвенными насекомыми);

– закупорки сосудов мицелием грибов или тиллами, которые формируются из-за токсичных выделений некоторых патогенов (например, при сосудистом микозе дуба и вяза).

Характер изменений водного режима во многом зависит от степени поражения растения. К примеру, у сосны в начальной стадии поражения ее корневой гнилью транспирационный расход влаги снижается незначительно. По мере же развития заболевания дерево ослабляется и интенсивность транспирации при достижении степени поражения корневой системы свыше 70% снижается в 2–3 раза. Особенно значительно снижается транспирационный расход в августе, в период повышения уровня солнечной радиации и усиления дефицита влаги в почве. При сильном нарушении водного режима падает тургор клеток, увядают листья, что приводит к усыханию растений.

Поражение сосны смоляным раком, к примеру, вызывает снижение содержания воды в хвое и побегах, располагающихся выше раковой язвы, в то время как в пораженных участках ствола, а также в лубе и заболони возникают локализованные очаги увлажнения вследствие высокой сосущей силы мицелия возбудителя этого заболевания. Интенсивность транспирации деревьев, пораженных смоляным раком, возрастает примерно в 1,5–2,5 раза по сравнению с интенсивностью транспирации здоровых деревьев в начале патологического процесса.

В ряде случаев болезни вызывают снижение транспирации уже на начальных этапах развития патогена. Это наблюдается, например, при поражении листьев древесных пород ржавчиной, мучнистой росой, пятнистостями и паршой.

Механизмы нарушения водного режима растения как реакция на заражение весьма различны. В ряде случаев усиление транспирации обуславливается повышением проницаемости тканей растения-хозяина, а ее снижение – закрыванием устьиц в ответ на заражение или развитием мицелия патогена на поверхности ассимиляционных органов. Иногда транспирация усиливается в связи с тем, что при образовании спороношений грибов-патогенов в покровных тканях растения возникают разрывы, облегчающие испарение связанной в клетках воды.

**Цель работы:** оценить степень воздействия микозов листьев на интенсивность транспирации растений.

**Оборудование и материалы:** живые листья примерно одинакового размера с различной степенью развития мучнистой росы

и пятнистости; непораженные, здоровые листья (контроль); конические колбы на 250 мл; резиновые пробки для колб со сквозным отверстием в центре; миллиметровая бумага; вата; пластилин; весы технические и торзионные; нитки, ножницы; цветные карандаши.

### ***Методика и ход выполнения работы***

#### ***Вариант 1***

1. Свежеотобранные с дерева листья ранжировать по степени развития мучнистой росы и черной пятнистости. Развитие определяется по площади поверхности листа, занятой мучнистым налетом или некротическими пятнами. Для поражения мучнистой росой обычно выбирают градацию в 0 (контроль), 25, 50, 75 и 100%. Пятнистости, как правило, имеют меньшее развитие, поэтому стоит отбирать листья, у которых пораженная площадь составляет, к примеру, 0, 10, 20, 30% и т. д.

2. Площадь каждого листа (в  $\text{дм}^2$ ) определяется путем обводки его контура на миллиметровую бумагу и подсчета целых  $\text{см}^2$  с объединением частично попавших в периметр листа клеток.

Как вариант, площадь листа также можно определить следующим образом: обвести контур листа растения на бумаге (писчей, в клеточку, миллиметровой и т. п.), вырезать обведенный контур и взвесить вырезанную часть. На другом участке этой же бумаги начертить квадрат размером  $10 \times 10$  мм ( $100 \text{ мм}^2$ ), вырезать его и определить массу. Зная массу единицы площади бумаги и массу обведенного по контуру листа фрагмента бумаги, определить площадь листа растения по следующей формуле:

$$S_{\text{л}} = m_{\text{л}} 100 / m_{\text{к}},$$

где  $m_{\text{л}}$  – масса контура листа, вырезанного из бумаги;  $m_{\text{к}}$  – масса квадрата площадью  $100 \text{ мм}^2$ .

3. Листья закрепить с помощью ваты в отверстиях пробок таким образом, чтобы их черешок выступал с противоположного края на 5–10 см, пробки с ними вставить в колбы, наполненные 150–200 мл воды, и герметизировать стыки пластилином.

4. Установки взвесить на электронных весах с точностью до 0,01 г. Колбы при этом должны быть сухими.

5. Установки разместить в однородных по температуре условиях при естественном освещении. Отметить время начала опыта.

Провести повторное взвешивание установок через 30 мин и наблюдать в течение 14 сут, взвешивая один раз в 2 дня. Данные занести в таблицу по следующей форме (табл. 3).

Таблица 3

**Расчет интенсивности транспирации листьев растений,  
пораженных инфекционными заболеваниями**

| Порода | Болезнь | Развитие болезни,<br>% | Масса установки, г |          | Потеря массы, г | Продолжительность<br>опыта, ч | Площадь листьев,<br>дм <sup>2</sup> | Интенсивность<br>транспирации,<br>мг/(дм <sup>2</sup> ·ч) |
|--------|---------|------------------------|--------------------|----------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|        |         |                        | начальная          | конечная |                 |                               |                                     |                                                           |
|        |         |                        |                    |          |                 |                               |                                     |                                                           |

6. Рассчитать интенсивность транспирации на каждый срок учета. Построить графики по каждой породе (заболеванию), в которых на горизонтальной оси отложить время наблюдения (в ч), а на вертикальной – интенсивность транспирации (в мг/(дм<sup>2</sup>·ч)). Сравнить результаты с контролем.

7. Сделать выводы о влиянии изучаемых заболеваний на процессы транспирации листьев, выявить динамику отклонения транспирации здоровых и в разной степени пораженных органов.

*Вариант 2 (с использованием метода быстрых взвешиваний, по Л. И. Иванову, Н. Л. Коссович)*

Данный вариант выполняется либо при наличии пораженного растения в лаборатории, либо в полевых условиях, т. к. срезанные листья необходимо как можно быстрее взвесить.

1. Прикрепить к черешку листа нитку с петлей на конце. Срезать лист с черешком и включить секундомер. Подвесить лист к коромыслу торсионных весов и спустя минуту с момента отделения листа уравновесить их. Записать показания.

2. Подвесить лист на тот же участок растения, с которого он был срезан. Через 3–4 мин сделать повторное взвешивание. С момента срезания листа до его повторного взвешивания не должно пройти более 5 мин.

3. Выполнить первые 2 пункта, указанные в описанном выше варианте 1 лабораторной работы.

4. Опыт провести в 2–3-кратной повторности (по каждому варианту).

5. Результаты опыта записать в таблицу по следующей форме (табл. 4).

Таблица 4

**Интенсивность транспирации здоровых и пораженных листьев растений**

| Вариант опыта                        | Экспозиция, ч | Испарено воды, мг | Площадь листа, дм <sup>2</sup> | Интенсивность транспирации, мг/дм <sup>2</sup> ·ч |
|--------------------------------------|---------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|
| Здоровый лист (контроль)             |               |                   |                                |                                                   |
| Пораженные листья (в разной степени) |               |                   |                                |                                                   |

6. Сделать выводы в соответствии с п. 7 варианта 1 лабораторной работы.

***Контрольные вопросы***

1. Что такое транспирация и какова ее роль в жизнедеятельности растений?

2. От каких внешних факторов зависит интенсивность транспирации?

3. Какими способами регуляции интенсивности транспирации обладают растения?

4. Каким образом патогены и вредители влияют на интенсивность транспирации растений?

5. Как изменяется интенсивность транспирации растений на различных этапах патологического процесса?

6. Опишите ход выполнения работы.

7. По результатам опыта сформулируйте выводы о влиянии изученных заболеваний на интенсивность транспирации растений.

## 2. ОСНОВЫ ФИТОИММУНОЛОГИИ

Существует множество факторов, обуславливающих невосприимчивость растений к отдельным вредителям и болезням или к их совокупности. В зависимости от характера факторов, определяющих иммунитет, условно принято разделять его на две категории: пассивный и активный.

*Пассивным иммунитетом* называют свойства растения препятствовать внедрению паразита и развитию его в тканях растения-хозяина, существующие независимо от наличия паразита. Он включает группу наиболее важных факторов иммунитета, которые позволяют растению не допустить заражения или заселения его тканей большинством видов фитофагов и фитопатогенов. Факторы пассивного иммунитета определяются генотипом растения, его анатомо-морфологическими, биохимическими и физиологическими особенностями (рис. 1).

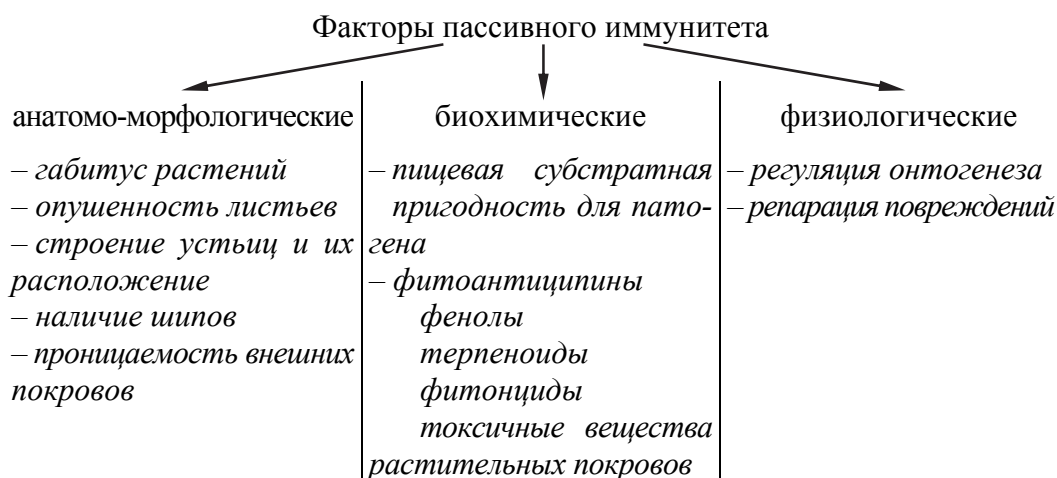


Рис. 1. Классификация факторов пассивного иммунитета

*Активным иммунитетом* называют генетически обусловленную способность растения активно противостоять внедрению паразита. Он проявляется только в случае заражения или повреждения растения.

К факторам активного иммунитета относят, например, реакцию сверхчувствительности, возникновение окислительно-восстанови-



тельных процессов при поражении, синтез растениями фитоалексинов, специфических белков, ингибиторов ферментов и др.

Как правило, растение обладает целым рядом факторов пассивного и активного иммунитета, что позволяет ему успешно противостоять заражению огромным множеством микроорганизмов, существующих в природе, и заселению вредителями, а если это заражение все же произошло, препятствовать распространению вредных организмов по растительным тканям.

Растения обладают многими факторами устойчивости с самого начала своего роста и развития (с рождения), поэтому такой иммунитет называется *врожденным*.

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 них 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 иметь биотическую или абиотическую природу. Приемы, способствующие проявлению приобретенной устойчивости, широко используют в практике сельского и лесного хозяйства. Так, устойчивость сеянцев ясеня к поражению халаровым некрозом можно повысить путем стимулирования раннего опадения листьев, являющихся воротами проникновения инфекции в побеги; устойчивость сеянцев хвойных пород к инфекционному полеганию, поражающему растения при прорастании семян и появлении всходов, можно повысить, соблюдая оптимальные сроки посева, глубину заделки семян, обрабатывая их фунгицидами и т. д.

Иммунитет растений может быть обусловлен неспособностью возбудителя вызывать заражение растений данного вида. Так, хвойные породы не поражаются мучнистой росой, листовые – мучнистой росой, лиственные – мучнистой росой, и т. д. Иммунны к болезням типа шютте, интродуцированный из Северной Америки дуб красный не поражается грибом *Micosphaera alphitoides*,

вызывающим ежегодные массовые поражения (эпифитотии) местного для Беларуси дуба черешчатого. В данном случае иммунитет проявляется на уровне конкретного вида растений. Иммунитет, основанный на неспособности возбудителей вызывать заражение растений определенного вида, называется *неспецифическим*.

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

В некоторых случаях иммунитет может быть обусловлен внутривидовой изменчивостью: одни сорта иммунны и не поражаются болезнью, другие – восприимчивы и поражаются ею в сильной степени.

Так, уже упомянутый возбудитель мучнистой росы дуба черешчатого аскомицет *Microsphaera alphitoides* в большей степени поражает ранораспускающуюся форму растения, в то время как позднораспускающаяся форма гораздо более устойчива к заболеванию. Такой иммунитет называют *специфическим*. Он имеет большое значение при выделении устойчивых популяций и выведении устойчивых сортов растений, все шире используется на практике. К примеру, в ответ на эпифитотию сосудистого микоза вязов (голландская болезнь), ставшую причиной повсеместной гибели насаждений этой породы в Европе и Северной Америке, были выведены устойчивые к болезни сорта под торговой маркой Резиста®-вяз.

Однако древесные породы благодаря высокой продолжительности жизни в лесных и городских насаждениях сталкиваются с воздействием многих стресс-факторов биотического и абиотического происхождения. Следовательно, для древесных растений более важной является устойчивость не к одному, а ко многим, желательно всем возможным вредителям и болезням. Такую устойчивость принято называть *комплексным* или *групповым иммунитетом*. К примеру, в сельском хозяйстве создание сортов с комплексным иммунитетом – наиболее перспективное направление снижения потерь от вредоносных организмов.

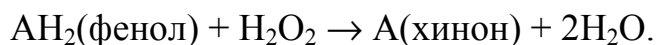
Для лесного хозяйства путь создания сортов древесных растений с комплексным иммунитетом затруднен длительными сроками выращивания насаждений, на протяжении которого меняются не только вирулентность и агрессивность отдельных видов, но

зачастую и видовой состав ассоциированных с каждой породой комплексов возбудителей болезней и вредителей, т. к. со временем дерево (как субстрат) может сильно изменять свои свойства. Применительно к лесным насаждениям принято говорить об устойчивости не отдельных растений, а фитоценоза в целом, что существенно расширяет спектр мероприятий, необходимых для поддержания биологической устойчивости насаждений.

### **Лабораторная работа № 3**

#### **ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЗДОРОВЫХ И ПОРАЖЕННЫХ ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ**

*Общие положения.* Пероксидаза – сложный растительный фермент, который присутствует в тканях растений и катализирует окисление фенолов и ароматических аминов с помощью пероксида водорода, органической перекиси или кислорода. Пероксидаза является одним из важных факторов иммунитета растений, т. к. она всегда присутствует в цитоплазме клеток и при их ранении обуславливает окисление фенолов до хинонов, ядовитых для инфекции (бактерий, грибов и даже вирусов). Схема окисления приведена ниже:



Появление хинонов визуально можно обнаружить в виде возникновения буровато-коричневой окраски на срезах или других нарушениях структуры тканей, например при повреждении яблок, клубней картофеля и других частей растений.

*Ферментативная активность* растительной ткани ( $A_\phi$ ) показывает изменение количества продуктов биохимической реакции ( $p$ ) за установленное время ( $t$ ), равное 1 с, на 1 г массы сырой ткани ( $m$ ) и рассчитывается по формуле

$$A_\phi = p / tm,$$

или

$$A_\phi = v / m,$$

где  $v = p / t$  – это *скорость ферментативной реакции*, которая зависит от количества и активности ферментов, концентрации субстрата,

наличия ингибиторов и активаторов, от температуры и pH окружающей среды.

Оценка активности пероксидазы производится в растворах растительных тканей. При окислении бесцветный фенол превращается в синий хинон, поэтому существенно изменяется оптическая плотность раствора ( $D$ ), что легко можно зафиксировать невооруженным глазом и оценить при помощи фотоэлектроколориметра (ФЭК) на разных этапах окисления.

**Цель работы:** оценить степень проявления защитной реакции органов растения в виде повышения активности пероксидазы.

**Оборудование и материалы:** мерные колбы на 25 мл (2 шт.); пипетки на 2 мл (3 шт.); фарфоровые ступки с пестиками (2 шт.); центрифужные пробирки (4 шт.); центрифуга; секундомер; спектрофотометр (фотоэлектроколориметр); ацетатный буфер с pH 5,4; 0,03%-ный раствор пероксида водорода; раствор бензидина на ацетатном буфере; здоровые и пораженные части растений (листья, семена, клубни и др.).

#### **Методика и ход выполнения работы**

1. Оценку пероксидазной активности провести в двух вариантах – с листьями здоровых и пораженных растений, взятыми с одного участка кроны. По заданию преподавателя можно взять другой растительный материал: здоровые и пораженные семена, желуди, клубни, корни и др.

2. Взвесить на торсионных весах 10–100 мг растительного материала, растереть навеску в фарфоровой ступке с небольшим количеством ацетатного буфера, перенести эту массу в мерный цилиндр и довести буфером до 25 мл. Выдержать 5–10 мин и центрифугировать вытяжку около 5 мин при 3000 об./мин, предварительно уравновесив центрифужные пробирки с раствором. Надосадочную жидкость слить и использовать в дальнейшей работе.

3. В кювету ФЭКа толщиной 2 см налить 2 мл надосадочной жидкости, 2 мл буфера и 2 мл раствора бензидина. Поставить кювету в ФЭК и установить стрелку гальванометра на ноль при желтом светофильтре. Долить в кювету 2 мл 0,03%-ного раствора пероксида водорода пипеткой с широким носиком таким образом, чтобы мощная струя перемешала содержание кюветы. Одновременно с попаданием первой капли пероксида водорода включить секундомер. Закрыть крышку ФЭКа и записать показания по шкале оптической плотности прибора через каждые 5 с. Показания снимать

до тех пор, пока оптическая плотность раствора не достигнет 0,5–0,7. Концентрация раствора должна быть такой, чтобы оптическая плотность достигала заданной величины примерно за 30–40 с. Это делается при помощи коррекции массы навески либо путем дополнительного разведения раствора в кювете. В последнем случае уменьшается объем вытяжки в кювете на 1 или 1,5 мл и такое же количество добавляется буфера.

4. Показания внести в таблицу по следующей форме (табл. 5).

Таблица 5

**Динамика оптической плотности растворов**

| Объект исследований | Оптическая плотность раствора ( $D$ )<br>через интервалы времени, с |   |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|
|                     | 0                                                                   | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
| Лист здоровый       | 0                                                                   |   |    |    |    |    |    |    |    |
| Лист пораженный     | 0                                                                   |   |    |    |    |    |    |    |    |

5. Построить графики, откладывая значения оптической плотности раствора по оси  $y$  с течением времени (ось  $x$ ). Сгладить кривые на графике и по сглаженным кривым определить значение оптической плотности ( $D$ ), соответствующее первым нескольким (1–3) секундам ( $t$ ) течения реакции. Рассчитать пероксидазную активность ткани по формуле

$$A = D\alpha / tmc,$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора;  $\alpha$  – степень разведения вытяжки, рассчитывается путем деления объема реакционной смеси (8 мл) на объем вытяжки, взятой для проведения реакции ( $w$ , мл);  $t$  – время, с;  $m$  – масса растительной ткани в вытяжке, г (рассчитывается по формуле  $m = wn / 25$ , где  $n$  – общая масса растительного материала, используемая в опыте, г;  $w$  – объем вытяжки в испытуемой смеси, мл);  $c$  – толщина слоя жидкости в кювете (2 см).

6. Результаты записать в таблицу по следующей форме (табл. 6).

7. Сделать выводы про ферментативную активность здоровых и пораженных тканей. Ферментативная активность выражается в единицах оптической плотности за 1 с на 1 г сырой массы растительной ткани и 1 см толщины слоя реакционной смеси.

Таблица 6

**Расчет пероксидазной активности тканей здоровых  
и пораженных листьев**

| Объект<br>исследования<br>(лист или др.) | Навеска, г | Объем вытяжки<br>в испытуемой<br>смеси, мл | Степень<br>разведения<br>вытяжки | Время,<br>использованное<br>в расчете, с | Соответствующая<br>временная<br>оптическая<br>плотность | Пероксидазная<br>активность<br>ткани |
|------------------------------------------|------------|--------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Здоровый                                 |            |                                            |                                  |                                          |                                                         |                                      |
| Пораженный                               |            |                                            |                                  |                                          |                                                         |                                      |

8. Высказать соображения о степени проявления защитных реакций в здоровых и пораженных тканях растений.

***Контрольные вопросы***

1. Что такое пассивный иммунитет растений?
2. Назовите основные факторы пассивного иммунитета.
3. В чем принципиальное отличие факторов активного иммунитета от пассивного?
4. Какие реакции растения относятся к факторам активного иммунитета?
5. Что такое врожденный и приобретенный иммунитет?
6. Комплексный иммунитет и его значение в растениеводстве.
7. Что такое пероксидаза?
8. Роль пероксидазы в живой клетке, каким образом она обуславливает устойчивость растений к вредным организмам?
9. Является ли пероксидаза фактором активного или пассивного иммунитета?
10. Как изменяется скорость пероксидазной активности при поражении растения патогеном?

**Лабораторная работа № 4**

**ИЗУЧЕНИЕ ФИТОНЦИДНЫХ СВОЙСТВ РАСТЕНИЙ**

***Общие положения.*** Способность растений вырабатывать *фитонциды* – антибиотические вещества, приводящие к торможению

роста и развития микроорганизмов, в том числе и паразитов – относится к основным факторам, определяющим возможность развития патогенов на растении. Антибиотической способностью обладают различные химические соединения, продуцируемые растениями. Фитонцидность многих растений объясняется содержанием альдегидов, терпеноидов, простых фенолов, дубильных и других веществ. Например, фитонцидность лука и чеснока обусловлена эфирными маслами, черемухи – присутствием в ее соке синильной кислоты. В экстрактах летучих веществ из корней акации выявлено 270 органических соединений, многие из которых подавляли рост мицелия и развитие зооспор паразита корней *Phytophthora cinnamomi*. Фитонциды всегда присутствуют в растительной ткани – здоровой, механически поврежденной или зараженной. При нарушениях структуры ткани количество фитонцидов в ней может возрасть.

Известный ботаник Б. М. Козло-Полянский назвал фитонциды «первой линией обороны», т. к. они токсичным облаком окружают растения. К примеру, было подсчитано, что 1 га соснового бора выделяет в атмосферу около 5 кг летучих фитонцидов в сутки, можжевельного леса – около 30 кг/сут, существенно снижая количество микрофлоры в воздухе. Поэтому в хвойных лесах (особенно в молодом сосновом бору) воздух практически стерилен (содержит лишь около 200–300 бактериальных клеток в 1 м<sup>3</sup>). Не случайно, объекты оздоровления и рекреации (санатории, профилактории, оздоровительные центры и т. п.) чаще располагаются именно в сосновых лесах.

**Цель работы:** оценить степень воздействия фитонцидов на микроорганизмы и построить ряды фитонцидности исследуемых сельскохозяйственных и древесных растений.

**Оборудование и материалы:** микроскоп; чашки Петри диаметром 45 мм; предметные стекла; стеклянная палочка; скальпель или лезвие безопасной бритвы; пластилин; фрагменты растений; вода с простейшими микроорганизмами (инфузориями и т. п.).

#### **Методика и ход выполнения работы**

1. Группа студентов разбивается на небольшие бригады (по 2–3 чел.). Каждой бригаде выдается 1 растительный испытуемый объект (побеги, листья, клубни и другие части растения).

2. Ознакомиться с правилами пользования микроскопом (приложение). Убедиться в том, что в водной среде, взятой для испытания, имеются микроорганизмы в подвижном состоянии. Для этого

при помощи стеклянной палочки следует нанести капельку испытуемой жидкости на предметное стекло, которое поместить на предметный столик микроскопа, и внимательно рассмотреть (увеличение микроскопа должно быть не менее 120–150 раз).

3. Подготовить камеру для испытаний фитонцидных свойств. Для этого следует взять небольшой кусочек пластилина, раскатать его в узкую полоску, свернуть в колечко диаметром около 1 см (должна поместиться капля воды). Приклеить колечко пластилина посередине внутренней стороны крышки чашки Петри.

4. Мелко нарезать при помощи лезвия или скальпеля фрагмент растительной ткани и поместить ее на дно чашки Петри так, чтобы ткань тонким слоем полностью укрывала дно чашки.

5. Нанести стеклянной палочкой каплю с живыми микроорганизмами внутрь колечка. Накрыть чашку крышкой и наблюдать за реакцией микроорганизмов через интервалы времени (увеличение скорости передвижения, замедление движения, колебательные движения, отсутствие признаков жизни и т. п.).

6. Результаты свести в таблицу по следующей форме (табл. 7).

Таблица 7

**Влияние фитонцидных выделений растений  
на жизнеспособность микроорганизмов**

| Объект исследования                                 | Реакция микроорганизмов за время после начала опыта, мин |    |    |    |    |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----|----|----|----|
|                                                     | 5                                                        | 15 | 30 | 45 | 60 |
| <b>Сельскохозяйственные культивируемые растения</b> |                                                          |    |    |    |    |
| 1. Дольки чеснока                                   |                                                          |    |    |    |    |
| 2. Клубни картофеля                                 |                                                          |    |    |    |    |
| 3. Другие объекты                                   |                                                          |    |    |    |    |
| <b>Лесные древесные растения</b>                    |                                                          |    |    |    |    |
| 1. Побеги дуба                                      |                                                          |    |    |    |    |
| 2. Хвоя сосны и т. д.                               |                                                          |    |    |    |    |
| 3. Другие объекты                                   |                                                          |    |    |    |    |

В таблице должны быть результаты исследований всех бригад.

7. По результатам опыта сделать выводы о фитонцидности разных растительных объектов и построить из них ряд фитонцидности, расположив по мере увеличения или снижения антибиотических свойств.



### ***Контрольные вопросы***

1. Что такое фитонциды?
2. Чем обусловлена фитонцидность растений?
3. Какую роль фитонциды играют в устойчивости растений к вредителям и болезням?
4. Являются фитонциды фактором активного либо пассивного иммунитета?
5. В каких целях и как фитонцидность растений может быть использована человеком?

### **Лабораторная работа № 5**

#### **АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ И КИСЛОТНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО СОКА КАК ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА**

***Общие положения.*** Анатомо-морфологические особенности растений являются одними из наиболее важных факторов иммунитета, предопределяющих возможность проникновения многочисленных патогенов внутрь растения (заражения).

*Толщина покровных тканей растений* (кутикулы) значительно влияет на устойчивость растений. К примеру, если брать весь цикл лесовыращивания, составляющий несколько десятков лет, наибольшая гибель растений в количественном выражении наблюдается на первом его этапе – в лесных питомниках, и особенно, в течение первого месяца с момента образования проростков. Проростки и всходы имеют тонкие, слаборазвитые покровные ткани, что делает возможным проникновение внутрь растений даже «слабых» (факультативных) паразитов, основным субстратом для которых являются отмершие органические остатки в почве растительного и животного происхождения.

Толщина покровных тканей имеет значение в основном в тех случаях, когда возбудители проникают в растение непосредственно через кутикулу (в основном представители несовершенных грибов).

*Строение устьиц* имеет значение для проникновения возбудителей пероноспороза, ржавчины и некоторых видов бактерий, которые попадают в растения через устьица. Прежде всего здесь играет роль строение замыкающих клеток устьиц. Важно также время нахождения устьиц в открытом состоянии.

*Количество естественных отверстий* (устьиц, чечевичек, гидатодов) на единицу площади растения также играет значительную роль для патогенов, проникающих в растение данным путем. Чем больше этот показатель, тем больше вероятность, что мицелий патогена, бактериальная клетка или другой инфекционный материал найдет подходящие «ворота» для проникновения внутрь растения.

*Опушенность* листьев является важным фактором устойчивости растений к вирусным патогенам, т. к. опушенные листья менее доступны для питания сосущих вредителей – основных переносчиков вирусов.

*Восковой налет* на плодах или стеблях снижает вероятность заражения патогенами, которым необходима поверхностная капельно-жидкая влага. Восковой налет является также и механическим препятствием для внедрения паразита и часто содержит вещества фунгицидного и фунгистатического действия, вызывающие гибель спор патогена или задержку развития его вегетативных структур.

*Габитус растений* (внешняя форма) определяет вероятность заражения. Например, узкокронная форма сосны обыкновенной с острым углом прикрепления ветвей реже поражается возбудителями смоляного рака по сравнению с ширококронной формой с прямым углом прикрепления. Это связано с меньшей площадью поверхности тонкой коры ветвей, через которые патоген способен проникнуть, а также быстрым скатыванием влаги, необходимой для прорастания спор возбудителя болезни, что характерно для первой формы сосны. В растениеводстве считается также, что разреженные формы кустов лучше проветриваются и нужная патогенам для начального этапа заражения влага быстро испаряется с поверхности листьев и стеблей.

*Кислотность клеточного сока*, как и фитонцидность растений, относится к группе *химических факторов* иммунитета. Химический состав растений влияет на устойчивость к заболеваниям и определяет наличие или отсутствие в тканях растения необходимых для патогена питательных веществ. Ингибиторы различной химической природы содержатся в тканях большинства растений и препятствуют проникновению и развитию в них патогенов.

Известно, что количество углеводов в тканях, а также их соотношение изменяются с возрастом и определяют лежкость овощей в период хранения. Например, чем больше степень созревания лука, тем выше его лежкость.

Высокая концентрация кислот органического происхождения (яблочной, лимонной, щавелевой и др.) в тканях растений предот-

вращает проникновение и развитие многих патогенов на таком субстрате, особенно тех видов, которые не могут полноценно развиваться в кислых средах. Не случайно, большинство сортов яблони, груши, томатов и многие другие фрукты и овощи имеют кислые плоды вплоть до момента полного их созревания, а такие плоды как, например, лимон, клюква, барбарис, калина, сохраняют высокую кислотность тканей даже после вызревания.

**Цель работы:** оценить влияние анатомо-морфологических свойств и степени кислотности плодов различных сортов растений на их устойчивость к отдельным болезням.

**Оборудование и материалы:** микроскоп; окуляр-микрометр; объектив-микрометр; фильтр Шотта; колба Бунзена; насос Комовского; рН-метр; буферный раствор для калибровки рН-метра; водяная баня; пипетки, колбы и другая лабораторная посуда; предметные и покровные стекла; лезвие безопасной бритвы или скальпель; краситель – Судан III; яблоки (либо другой растительный объект по выбору преподавателя) различных сортов (с симптомами поражения паршой и без поражений).

#### **Методика и ход выполнения работы**

*Задание 1. Определение толщины кутикулы здоровых и пораженных плодов*

1. Установить цену деления окулярного микрометра, используя объект-микрометр (инструкция по использованию оптических приборов приведена в прил.).

2. Для приготовления препаратов сделать несколько тонких радиальных срезов через кутикулу плода. Поместить их на предметное стекло в каплю воды и окрасить путем нанесения красителя (Судан III) на срезы.

3. С помощью окуляра-микрометра измерить толщину кутикулы (не менее чем в 5 местах срезов) и определить размер поверхностных клеток паренхимы.

4. Полученные данные измерений (в делениях окулярного микрометра) для выражения их в микрометрах умножить на цену деления.

5. Записать средние значения показаний по каждому объекту в табл. 8.

*Задание 2. Определение кислотности клеточного сока*

1. Взвесить 10–20 г свежих размельченных плодов яблони (или других плодов). Перенести навеску в фарфоровую ступку,

добавить к ней 1–2 г кварцевого песка и тщательно растереть пестиком до получения однородной массы, которую затем перенести в коническую колбу на 250 мл.

2. Нагреть 100 мл дистиллированной воды до температуры 80°C, смыть небольшим количеством этой воды остатки растертой массы плода со ступки и пестика в колбу и туда же перелить оставшуюся воду.

3. Нагреть колбу на водяной бане в течение 1 ч при 80°C.

4. Содержимое колбы охладить и отфильтровать используя фильтр Шотта, колбу Бунзена и насос Комовского.

5. Довести объем экстракта до 100 мл.

6. Пипеткой взять 20 мл вытяжки и перенести в чистую коническую колбу, туда же добавить 2–3 капли фенолфталеина до розового окрашивания.

7. Оттитровать вытяжку 0,1 н раствором щелочи и вычислить кислотность объекта исследований ( $X$ ) по формуле, %

$$X = aV / V_1 m 100,$$

где  $a$  – количество 0,1 н щелочи, пошедшей на титрование, мл;  $V$  – общий объем вытяжки, мл;  $V_1$  – объем вытяжки, взятой для титрования, мл;  $m$  – масса навески, г.

Кислотность клеточного сока может быть измерена рН-метром, для этого следует выполнить первые 5 пунктов задания 2, затем использовать измерительный прибор. Порядок работы с рН-метром приведен в прил.

8. Результаты исследований внести в табл. 8.

Таблица 8

**Результаты измерений толщины кутикулы плода  
и кислотности клеточного сока**

| Объект наблюдений                            | Параметры плода       |                                          |                    |
|----------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------|--------------------|
|                                              | толщина кутикулы, мкм | размер прилегающих клеток паренхимы, мкм | рН клеточного сока |
| Плод без признаков поражения и сорт культуры |                       |                                          |                    |
| Пораженный плод и сорт культуры              |                       |                                          |                    |

9. По результатам анализа полученных данных сделать выводы о влиянии оцениваемых параметров плода на устойчивость растений к парше.

### ***Контрольные вопросы***

1. Перечислите основные анатомо-морфологические факторы устойчивости растений.

2. Укажите роль толщины покровных тканей в первичном заражении тканей растений инфекцией.

3. Каким образом особенности строения естественных отверстий растения (устьиц, чечевичек, гидатодов) и их количество на единицу площади может повлиять на устойчивость растения к патогенам?

4. Раскройте роль опушенности органов растения и воскового налета на их поверхности в устойчивости растений к вредным организмам.

5. Что такое габитус и каким образом он обуславливает устойчивость растения?

### **3. ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ВРЕДНЫМ ОРГАНИЗМАМ И СПОСОБЫ ЕЕ ПОВЫШЕНИЯ**

---

Экспериментально устойчивость растений к вредителям и болезням можно определять косвенными и прямыми методами.

Косвенно устойчивость оценивается путем воссоздания отдельных этапов взаимоотношений хозяина и паразита (вредителя) с использованием ферментов последних или путем имитации других способов воздействия.

В прямых методах изучают последствия взаимоотношений при непосредственном контакте хозяина и патогена в контролируемых условиях. Устойчивость определяется по трем основным показателям: а) внешним признакам проявления реакции растения на заражение патогеном; б) интенсивности проявления; в) снижению продуктивности растений. В качестве контроля при проведении оценки используются восприимчивые растения.

При выявлении иммунных видов или генотипов растений применяется только один качественный показатель – наличие или отсутствие поражений (либо повреждений). Устойчивость характеризуется количественными показателями. Ее степень выявляют разными способами, которые зависят от выбранной методики эксперимента.

Повышение устойчивости растений к вредителям и болезням – очень важная задача в растениеводстве. От ее решения зависит, насколько сложно будет возделывать определенную культуру в той или иной местности, в тех или иных условиях, насколько большими будут потери от воздействия биотических и абиотических факторов, сколько средств уйдет на борьбу с фитофагами и фитопатогенами и, в конечном итоге, насколько высоки будут урожайность и рентабельность выращивания.

Повысить устойчивость растений к вредным организмам и неблагоприятным условиям внешней среды можно различными методами (способами). Наиболее действенными способами повышения

устойчивости растений или поддержания ее на высоком уровне являются: применение улучшенного семенного и посадочного материала (отобранного на селекционно-семеноводческой основе); улучшение условий роста и развития растений (подкормки, рыхление почвы, прополка и т. п.); использование стимуляторов роста; обработка семян и вегетирующих частей средствами защиты растений (фунгицидами, инсектицидами, акарицидами, нематоцидами и т. п.).

При выращивании растений могут быть использованы какие-то отдельные способы иммунизации, но наибольший эффект достигается применением целого комплекса мероприятий по повышению устойчивости растительных организмов на разных этапах их культивирования.

## **Лабораторная работа № 6**

### **ОТБОР РАСТЕНИЙ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К СУПРЕССОРАМ ФИТОПАТОГЕНОВ**

**Общие положения.** Обмен информацией между патогеном и растением-хозяином, приводящий в конечном итоге к изменению иммунного статуса последнего, происходит при помощи специализированных химических веществ. Большинство органических соединений, выделяемых паразитом при его взаимодействии с растением, оказывают воздействие на иммунную систему, т. е. являются *иммуномодуляторами*. Эти вещества принято разделять на два класса: *супрессоры*, подавляющие защитные реакции растения и снижающие его иммунный статус, и *элисторы*, индуцирующие протекание защитных реакций и повышающие иммунный статус растения. Классификация супрессоров, разработанная проф. Дьяковым Ю.Т., представлена на рис. 2.

*Ферменты деполимеразы* – сложные ферменты, синтезируемые патогеном для растворения покровных тканей растения и клеточной оболочки. *Кутиназы* синтезируются для растворения кутикулы, *целлюлазы* – для растворения целлюлозы, *ксиланазы* разлагают гемицеллюлозу, а *пектиназы* – пектин.

*Вивотоксины* – ферменты широкого спектра действия, выделяемые патогенами с целью подавления защитных реакций растений. Они неспецифичны, вызывают повреждения не только хозяина данного паразита, но и видов растений, находящихся за пределами

его пищевой специализации. Эти супрессоры ингибируют ферменты и синтез белков, растений, изменяют проницаемость мембран, генерируют активные формы кислорода и т. д.

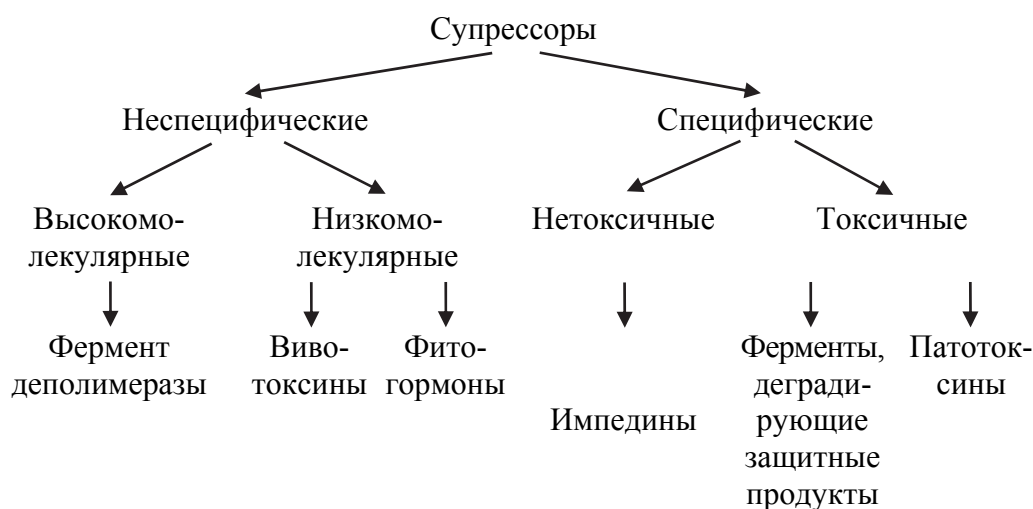


Рис. 2. Классификация супрессоров

*Фитогормоны* – вещества, изменяющие метаболизм пораженных тканей растений. Важнейшими фитогормонами являются *ауксины* (стимулируют деление клеток, вызывают образование и рост отдельных органов и др.), *цитокинины* (вызывают дифференциацию и рост надземной массы, задерживают старение клеток, открывают устьица), *гиббереллины* (вызывают растяжение клеток, индуцируют цветение), *абсцизовая кислота* (вызывает торможение роста и деления клеток, повышает устойчивость к стрессам, способствует аккумуляции запасных веществ), *этилен* (вызывает созревание плодов, способствует осеннему опаданию листьев, утолщает стебли и затормаживает рост междоузлий). Изменяя метаболизм отдельных органов растения, патоген формирует благоприятные условия для своего развития путем стимулирования процесса образования галл, фасциаций, «ведьменных метел», израстаний и т. п. Гормональную роль способны выполнять и некоторые вивотоксины.

*Импедины* – специфические ферменты, выделяемые биотрофными патогенами с целью предотвращения появления устойчивости у атакуемых растений. К примеру, заражение патогенным грибом делает растение восприимчивым для последующего инфицирования авирулентной расой того же гриба или даже сапротрофного организма.



*Ферменты, деградирующие защитные продукты*, способствуют химической модификации токсичных для патогена продуктов стрессового метаболизма пораженных растений – *фитоалексинов* и *фитоантиципинов*. В результате реакции между супрессорами этой группы и защитными веществами растения образуются продукты, слаботоксичные для паразитических организмов.

*Патотоксины* – узкоспециализированные ферменты, выделяемые патогенами с целью подавления защитных реакций растений определенного вида или даже сорта. Продуценты патотоксинов – популяции (расы, штаммы) высокопатогенных грибов и бактерий. Такие расы в природных условиях формируют вспышки массового поражения растений, и по мере отмирания чувствительных особей концентрация токсикогенных штаммов быстро падает. Патотоксины имеют очень низкие токсические концентрации по отношению к восприимчивым растениям (от 0,1 до 30 нанограмм на мл). Эти вещества характеризуются высокой селективностью, т. е. отношением минимальных токсичных концентраций для устойчивого и восприимчивого сортов.

По химическому составу известные патотоксины объединяют в несколько групп: *циклические пептиды, линейные поликетоны, гликозиды, органические кислоты*.

Таким образом, экзоферментный комплекс патогенных организмов представляется в виде сложного биохимического коктейля, комплексно воздействующего на живые ткани растений. С возрастанием патогенности увеличивается эффективность супрессоров, однако и возрастает их специализация. Следовательно, отбор растений по устойчивости следует проводить к определенным видам или даже расам патогенов.

Один из наиболее распространенных методов изучения воздействия на растение супрессоров патогенов основан на проращивании семян изучаемых растений во влажных камерах с культуральной жидкостью, в которой выращивались грибы.

**Цель работы:** изучить метод лабораторной оценки устойчивости растений к токсинам паразитов.

**Оборудование и материалы:** семена сосны и ели; выращенные на жидкой питательной среде Чапека культуры фитопатогенных грибов из родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Phoma*, *Heterobasidion* и др.; стерильные чашки Петри диаметром 90 мм с фильтровальной бумагой (влажные камеры); пробирки с культуральной

жидкостью и водой (контроль); стерильный шприц-дозатор на 2 мл; раствор перманганата калия 0,2%-ный; пинцеты; термостат; цветные карандаши.

### ***Методика и ход выполнения работы***

1. Произвести отбор и сортировку семян с удалением поврежденных, слаборазвитых экземпляров и примесей.

2. С целью дезинфекции выдержать семена в 0,2%-ном растворе перманганата калия в течение 15 мин, после промыть дистиллированной водой и подсушить на стерильной фильтровальной бумаге в течение 5–10 мин.

3. Фильтровальную бумагу во влажных камерах смочить 2 мл культуральной жидкости (в контроле воды) и пинцетом разложить семена с равномерным расстоянием друг от друга в количестве 50 шт. на чашку. В каждом варианте опыта используется 100 семян и 2 чашки Петри.

4. Чашки с семенами разместить в термостате и культивировать при температуре 24°C в течение 14 сут. Не допускать подсыхания фильтровальной бумаги в течение всего срока постановки опыта.

5. Оценить динамику прорастания семян под воздействием ферментов и без них на 3, 5, 7, 10 и 15-е сутки. К проросшим относят семена с длиной проростка, в два раза и более превышающей длину семени. Такие семена подсчитываются и удаляются из чашек при каждом наблюдении. На 15-й день рассчитать техническую всхожесть семян как отношение числа проросших семян к общему числу семян, взятых для проращивания в каждом варианте опыта, выраженное в процентах, %

$$B = 100n / N,$$

где  $n$  – число проросших семян, шт.;  $N$  – число семян, взятых для проращивания, шт.

Ингибирование всхожести рассчитывается как разность всхожести в контроле и вариантах опыта (в %).

6. Данные наблюдений и расчетов занести в лабораторный журнал в следующем виде (табл. 9).

7. Динамику прорастания отобразить в виде графиков, где на горизонтальной оси ( $x$ ) отложить время проращивания в сутках, а на вертикальной ( $y$ ) – количество проросших семян в штуках. Каждый вариант на графике выделить отдельным цветом.

Таблица 9

**Динамика прорастания и всхожесть семян хвойных пород  
под воздействием супрессоров патогенных грибов**

| № | Древесная порода | Вид (штамм) патогена | Количество проросших семян (шт.) на дни учета |         |         |          |          | Всхожесть, % | Ингибирование всхожести, % |
|---|------------------|----------------------|-----------------------------------------------|---------|---------|----------|----------|--------------|----------------------------|
|   |                  |                      | 3-и сут                                       | 5-е сут | 7-е сут | 10-е сут | 15-е сут |              |                            |
| 1 |                  |                      |                                               |         |         |          |          |              |                            |
| 2 |                  |                      |                                               |         |         |          |          |              |                            |
| 3 |                  | Контроль (вода)      |                                               |         |         |          |          |              |                            |

8. Сделать выводы о влиянии супрессоров грибов на развитие молодых растений и устойчивость сосны и ели к определенным видам (расам, штаммам) фитопатогенов.

***Контрольные вопросы***

1. Что такое супрессоры с точки зрения патологии растений?
2. Приведите классификацию известных супрессоров.
3. Какова роль фитогормонов в атаке патогена?
4. Чем отличаются вивотоксины от патотоксинов?
5. Какова химическая природа патотоксинов?
6. Опишите ход выполнения работы.
7. По результатам опыта сформулируйте выводы о влиянии супрессоров грибов на развитие семян хвойных пород.

**Лабораторная работа № 7**

**ОТБОР СЕМЯН УСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ  
НА ОСНОВЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ**

**Общие положения.** На степень устойчивости проростков и формирующихся растений существенное влияние оказывают качественные показатели семян и их происхождение. При оценке роли качественных показателей семян в устойчивости к болезням следует учитывать несколько особенностей: во-первых, разнородность семян и, во-вторых, их плотность.

Явление разнокачественности тканей растений, и в частности, разнокачественности семян было открыто И. В. Мичуриным. Он установил, что на развитие растений оказывают влияние срок созревания семян и место их образования. Так, семена, образующиеся на более ранних побегах, дают потомство с повышенной устойчивостью к заболеваниям по сравнению с потомством из семян, сформировавшихся на более поздних побегах. Как правило, семена, образовавшиеся на главных цветоносах, дают растения, более устойчивые к болезням по сравнению с потомством из семян, образовавшихся на побегах второго порядка.

Значение плотности семян в определении устойчивости заключается в следующем. Полновесные семена дают растения, более устойчивые к болезням, т. к. они обладают лучшей всхожестью и энергией прорастания. Поэтому сортировка семян по плотности обеспечивает получение и более урожайных, и менее поражаемых болезнями растений.

Кроме того, в процессе многолетних работ по селекции растений отмечено также, что некоторые семена могут иметь определенные морфологические (внешние) признаки, например особый цвет или оттенок, форму, которые на молекулярном уровне «сцеплены» с генами, обуславливающими повышенную устойчивость растений.

В тех случаях, когда представляется возможным сочетать несколько способов отбора семян (сначала по срокам созревания, а затем по плотности), эффект в повышении устойчивости будет значительно возрастать.

**Цель работы:** изучить устойчивость семян различных морфологических групп к инфицированию плесневыми и гнилевыми грибами (с использованием естественного инфекционного фона).

**Оборудование и материалы:** семенной материал древесных растений (сосна, ель и пр.), имеющий различное происхождение, сроки заготовки и хранения; чашки Петри диаметром 90–100 мм; фильтровальная бумага; дистиллированная вода; пинцет.

#### **Методика и ход выполнения работы**

1. Группа разбивается на бригады по 2–3 чел. Каждой бригаде предлагается семенной материал древесных растений (сосна, ель), имеющий различное происхождение, сроки хранения. Из этого материала отбираются опытные образцы в количестве 50 шт. семян для каждого варианта опыта. Семена сортируют на следующие группы: по крупности (крупные, мелкие); цвету (темные, светлые).

Отдельно отобрать семена из разных мест и сроков заготовки. Все отобранные образцы взвесить и массу пересчитать на стандартную (на 1000 шт. семян). При количестве семян в отобранном образце 50 шт. пересчет ведется умножением измеренной массы этого количества семян на 20.

В работе используют оценку внутренней зараженности семян и естественный инфекционный фон плесневых грибов, споры которых присутствуют в воздухе повсеместно в любое время года.

2. Приготовить так называемую «влажную камеру». Для этого на дно чашек Петри уложить фильтровальную бумагу (вырезается круг под размер дна чашки) и увлажнить дистиллированной водой. Каждый исследуемый образец семян (50 шт.) выкладывать пинцетом равномерно на фильтровальную бумагу так, чтобы семена не касались друг друга. При наличии более крупных семян (ясень, желуди дуба и др.) они выкладываются в каждую чашку Петри в меньшем количестве (по 25 или 10 шт.). Чашки закрыть и поставить в теплое место (с температурой от +20 до +25°C) на 1 неделю.

3. По результатам исследований подсчитать по вариантам опыта: число нормально проросших семян (у которых длина проростка больше либо равна длине семени), число семян, имеющих внешние симптомы поражения плесневыми и гнилевыми грибами.

4. Результаты записать в таблицу по следующей форме (табл. 10).

Таблица 10

**Оценка устойчивости семян по различным критериям их отбора**

| № | Порода | Дата заготовки | Признак отбора семян в образец | Количество семян в отобранном образце, шт. | Масса, 1000 шт., г | % проросших семян | % семян с гнилями или плесенью |
|---|--------|----------------|--------------------------------|--------------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------|
| 1 |        |                |                                | 50                                         |                    |                   |                                |
| 2 |        |                |                                |                                            |                    |                   |                                |

5. В таблицу вписать результаты исследований других бригад. На основании обобщения и анализа результатов опыта сделать выводы о степени устойчивости растений к первичному инфицированию в зависимости от времени заготовки семян, крупности, массы 1000 шт., цвета оболочки семени и т. д.

### Контрольные вопросы

1. Раскройте роль отбора семенного материала в выращивании устойчивых сортов растений.
2. Какие параметры семян наиболее часто влияют на их устойчивость к вредным организмам на первых этапах роста растения?
3. Как влияют срок созревания и место образования семян на их иммунитет?
4. Каким образом цвет семян может повлиять на устойчивость формирующихся проростков к болезням?

### Лабораторная работа № 8

#### ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ К СТОЛОВЫМ ФИТОНЕМАТОДАМ

**Общие положения.** Паразитические фитонематоды (фитогельминты) – микроскопические черви класса *Nematoda*, являющиеся возбудителями нематодных болезней растений. В лесных насаждениях наиболее экономически значимые заболевания хвойных пород вызывают ствольные нематоды из рода *Bursaphelenchus*. Самцы нематод видов этого рода имеют на кончике хвоста липкий пленчатый лепесток – бурсу, откуда и происходит название рода (рис. 3).

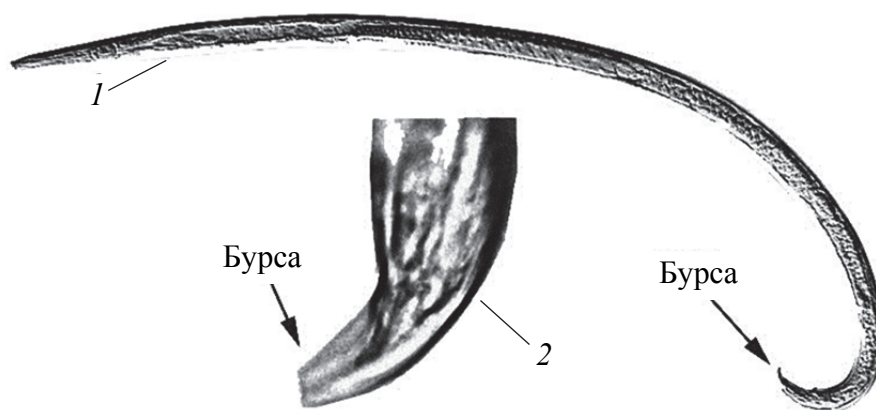


Рис. 3. Нематода рода *Bursaphelenchus*:  
1 – самец нематоды; 2 – хвост самца с бурсой

Некоторые виды из этого рода обладают высоким инвазивным потенциалом, т. е. способны существенно расширять свой ареал. Например, сосновая стволовая нематода *B. xylophilus* внесена в пе-

речни карантинных организмов многих стран и регионов мира. Этот патоген является аборигеном лесов Северной Америки, местные хвойные породы устойчивы к данному виду. В начале XX в. нематода была завезена в Японию, где стала причиной массовой гибели сосен. Впоследствии *B. xylophilus* обнаружена на Тайване, широко распространилась в Юго-Восточной части Китая и Южной Корее. В 1999 г. паразит был выявлен в Португалии, а в 2008 г. достиг Испании.

Питаясь на эпителиальных клетках смоляных каналов, *B. xylophilus* вызывает пожелтение хвои, отмирание ветвей и стволов. Зараженные деревья при среднесуточной температуре (в июле, августе) выше 25°C гибнут в течение одного вегетационного сезона.

В связи с микроскопическими размерами инфекционных фаз нематод для их выявления необходимы специальные микроскопические исследования или ДНК-диагностика. Известно три вида нематод, морфологически близких к виду *Bursaphelenchus xylophilus*. Это виды: *B. mucronatus*, *B. fraudulentus* и *B. kolyomensis*. Патогенность и агрессивность этих видов очевидно ниже, чем у *B. xylophilus*, однако и они способны участвовать в процессах ослабления и усыхания хвойных, образуя при благоприятных условиях совместные очаги со стволовыми вредителями. Агрессивность фитонематод существенно возрастает с повышением летних температур воздуха, аномалии которых все чаще отмечаются в северном полушарии.

В своем развитии нематоды рода *Bursaphelenchus* проходят четыре стадии. Развитие осуществляется двумя путями: первый с участием насекомых – дисперсионный; второй без них – генеративный. Считается, что переносчиками инфекции являются черные усачи из рода *Monochamus*.

Зимует нематода в стадии дисперсионной личинки (3-го возраста). К концу зимы она преобразуется в трансмиссионную личинку (дауэрлярва, 4-я стадия). Время образования этой личинки связано с появлением в куколке насекомого молодого имаго. Трансмиссионные личинки адаптированы физиологически к жуку-переносчику и расселяются по всему телу. В начале лета молодые имаго усача, которые несут в себе нематод, выходят из древесины мертвого дерева и заселяют здоровые. Через раны, нанесенные веточкам жуками, нематоды проникают в древесину здорового дерева, быстро размножаются и расселяются по всему растению. После дополнительного питания самки жуков откладывают яйца на ослабленные или погибшие деревья, где также происходит из них выход нематод.

Проникнувшие в древесину нематоды в результате питания на клетках, а затем на грибах преимущественно из родов *Botrytis* и *Ceratocystis*, содержащихся в мертвой древесине, быстро размножаются, их численность резко увеличивается. Высокая плодовитость *B. xylophilus* подтверждена экспериментально. При оптимальной температуре 25°C развитие сосновой древесной нематоды от яйца до имаго завершается за 4–5 дней. Самка производит в среднем 79 яиц в течение репродуктивного периода, равного 28 дням. Таким образом, при благоприятных условиях потомство каждой самки через 15 дней теоретически может составить 263 000 экземпляров. Согласно результатам исследований, осуществленным на зараженных сосновой нематодой саженцах, уже через 24 ч после заражения нематод находили не только в стволе, но и в ветках, и корнях.

Внешние признаки поражения растений наблюдаются через 10–20 дней после заражения взрослых деревьев и через 6–7 дней у сеянцев. Редуцируется и полностью прекращается выделение живицы, уменьшается и полностью прекращается транспирация, увядает и буреет хвоя, происходит гибель дерева.

При выделении стволовых нематод из древесины пораженных деревьев необходимо учитывать динамику развития вилта: при заражении растения в процессе дополнительного питания только что вылетевшей молодой самки жука нематоды попадают в место питания переносчика. Там происходит развитие колонии нематод пропативного поколения, формирующегося из внесенных жуком дауэров-основателей. Лишь впоследствии нематоды опускаются вниз по проводящим сосудам растения-хозяина. Поэтому надо исследовать в первую очередь вершины (от второй до четвертой мутовки) ветровальных и спиленных деревьев с симптомами начального увядания, обращая внимание на следы погрызов насекомых, а также на летные отверстия. Такие участки (пятна) необходимо выпиливать или выстругивать топором, выбирая наружный слой заболони с галереями и следами погрызов жуков. Собранную щепу (объемом 200–400 см<sup>3</sup>) нужно поместить в полиэтиленовый мешок или завернуть в бытовую тонкую полиэтиленовую пленку и снабдить этикеткой с информацией о виде и состоянии дерева, месте и дате сбора. Нематоды сохраняются в такой пробе до 3 мес при комнатной температуре в помещении или до года в холодильнике при температуре 4–8°C.

Лабораторные исследования устойчивости хвойных пород к фитонематодам включают в себя выделение инфекции из расте-



ний с характерными симптомами и повторное заражение здоровых сеянцев с целью получения сходных симптомов.

**Цель работы:** изучить устойчивость европейских и североамериканских хвойных растений к стволовым фитонематодам.

**Оборудование и материалы:** образцы из растений с симптомами поражения стволовыми нематодами (измельченная древесина); скальпель; пластиковые стаканы для выделения нематод объемом 200 мл; марля; простые бумажные салфетки; пробирки типа эп-пендорф; силиконовая трубка с внутренним диаметром 18 мм; шприц на 20 мл с силиконовой трубкой-наконечником; шприц для инъекций на 2 мл; однолетние саженцы сосны обыкновенной, ели европейской, лиственницы европейской, туи западной и псевдотсуги мензиеса; спирт этиловый 70%-ный.

#### **Методика и ход выполнения работы**

**Этап выделения нематод.** Нематод выделяют методом Берманна, усовершенствованным А. Ю. Рыссом. Принцип этого метода состоит в том, что узкие черви тяжелее воды (их удельный вес примерно  $1,15 \text{ г/см}^3$ ) и подвижны, поэтому они постепенно опускаются в воде сквозь поры погруженного в нее фильтра, тогда как неподвижные частицы детрита и тканей древесины остаются сверху фильтра. Для выделения живых нематод применяют следующую последовательность операций:

1. Изготавливают фильтр из двух стаканов с удаленным дном согласно схеме (рис. 4).

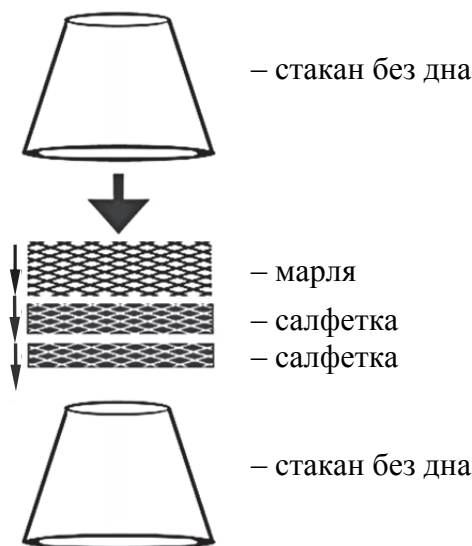


Рис. 4. Схема конструкции фильтра для выделения нематод (по А. Ю. Рыссу)

2. Фильтр переворачивают дном вниз и в него осторожно, чтобы не повредить, кладут предварительно измельченную щепу из одного образца (примерно 50 г).

3. В несрезанный стакан наливают воду и осторожно погружают сверху фильтр со щепой так, чтобы он опустился в нижний стакан с водой под действием собственного веса. Оставляют щепу на 12–48 ч. За это время из щепы выходит в воду и опускается на дно нижнего стакана достаточное количество нематод, и они остаются живыми.

4. После экспозиции фильтр со щепой быстро и резко вынимают, а нижний стакан с водой и вышедшими нематодами ставят в наклонное положение (обычно экстракцию ведут в серии проб, поэтому серию стаканов ставят на поднос, наклон которого в 20–30° обеспечивает подложенная с одной из сторон подставка-упор высотой 3–4 см). Нематоды двигаются и поэтому медленно смещаются в нижний край наклоненного стакана.

5. Через 30 мин воду в стакане осторожно отбирают сверху при помощи шприца с надетой вместо иглы тонкой трубкой-капилляром. Как только верхняя часть дна наклоненного стакана начинает обнажаться сухим участком, оставшуюся жидкость сливают в 10-сантиметровую трубочку с надетой на кончик трубки 1,5-миллиметровую пробиркой типа эппендорф (рис. 5).

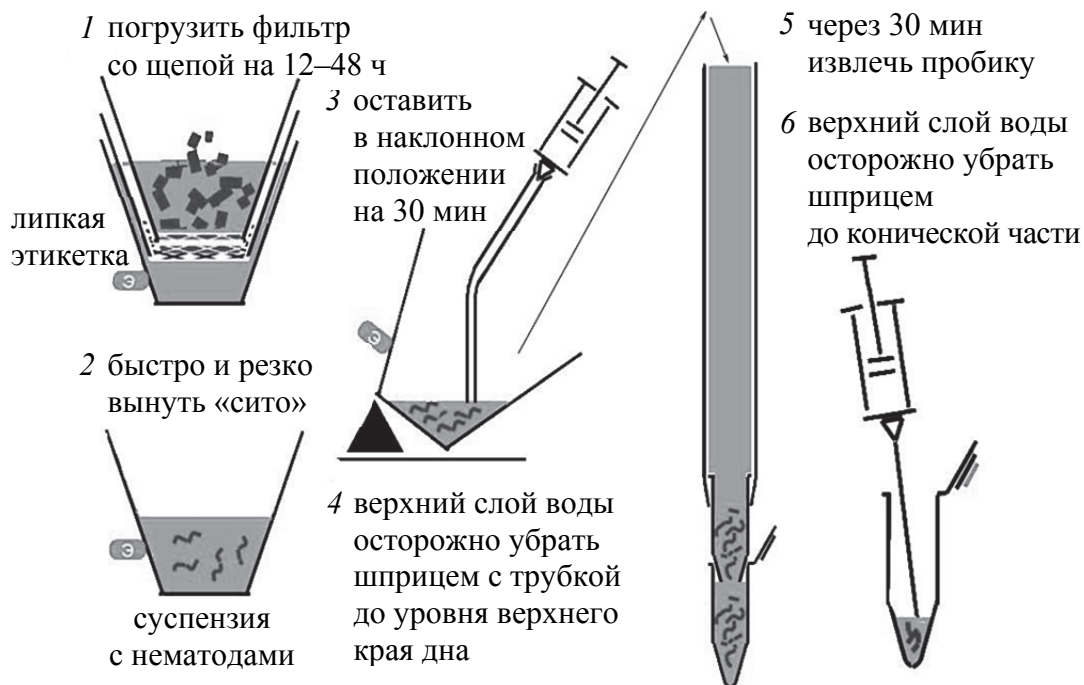


Рис. 5. Схема проведения опыта по выделению нематод (по А. Ю. Рыссу)

6. Жидкость отстаивают в течение 30 мин. За это время нематоды опускаются на дно пробирки. Пробирку снимают с конца трубки, позволяя верхней воде свободно вытечь из трубки мимо снимаемой пробирки. Пробирку ставят вертикально в держатель, из нее через 10 мин (время опускания нематод на дно) отбирают слой воды до конической части. Затем содержимое конической части переливают в стекло с лункой, предварительно взболтав, и просматривают под микроскопом на 100–150-кратном увеличении.

7. Зарисовывают выявленные при увеличении нематоды и проводят их идентификацию до рода с помощью определителя или атласа фотографий. Отмечают количество нематод рода *Bursaphelenchus*.

8. Данные заносят в табл. 11.

Таблица 11

**Результаты обработки образцов древесины пораженных деревьев**

| № образца | Происхождение | Вид растения | Состояние растения | Место отбора | Количество нематод в пробе | Из них рода <i>Bursaphelenchus</i> |   |
|-----------|---------------|--------------|--------------------|--------------|----------------------------|------------------------------------|---|
|           |               |              |                    |              |                            | шт.                                | % |
|           |               |              |                    |              |                            |                                    |   |

9. По наличию и количеству стволовых нематод рода *Bursaphelenchus* делают вывод об устойчивости древесных пород к нематодозам на естественном фоне инфекции.

*Этап повторного заражения растений.* Из-за сложности искусственного заражения хвойных растений путем внесения инфекции в раны, ввиду обильного смолы выделения, заражению подвергаются срезанные надземные части однолетних растений. С этой целью проводят следующие операции:

1. Пробирки эппендорф устанавливают на штативе и добавляют в них 1 мл воды с живыми активными нематодами рода *Bursaphelenchus* в количестве не менее 50 шт. В контрольные пробирки добавляется только вода.

2. Однолетние саженцы (по 3–5 шт. каждого вида) срезают острым скальпелем под углом около 45° к волокнам и опускают в отдельные пробирки таким образом, чтобы ствол достиг дна. Края пробирки прикрывают валиком из ваты для замедления испарения воды.

3. Растения культивируют при комнатных условиях в течение 14 дней, по мере необходимости воду добавляют в пробирки, не допуская подсыхания среза.

4. Периодически проводят наблюдения за состоянием растений. Данные об изменениях внешнего вида и симптомах заболевания фиксируют в табл. 12.

При отсутствии ясных симптомов по окончании эксперимента проводят повторное выделение нематод из стволиков опытных растений по описанной выше методике.

Таблица 12

**Результаты искусственного заражения растений фитонематодами**

| № образца | Вид растения | Состояние растений через интервал времени, сут |    |    | Характеристика устойчивости растений |
|-----------|--------------|------------------------------------------------|----|----|--------------------------------------|
|           |              | 5                                              | 10 | 14 |                                      |
|           |              |                                                |    |    |                                      |
|           |              |                                                |    |    |                                      |
|           |              |                                                |    |    |                                      |

5. По динамике состояния опытных растений (по сравнению с незараженными) делают вывод об устойчивости древесных сравниваемых видов к поражению стволовыми нематодами.

***Контрольные вопросы***

1. Что такое фитонематоды и какой ущерб они причиняют растениям-хозяевам?

2. Каковы пути проникновения нематод в ткани хвойных растений?

3. Опишите процесс отбора образцов с пораженных нематодами древесных растений.

4. Опишите метод выделения нематод из образцов древесины.

5. Каким образом можно диагностировать нематод из рода *Bursaphelenchus*?

6. Опишите метод искусственного заражения хвойных растений нематодами.

7. По результатам опыта сформулируйте выводы об устойчивости испытанных пород к поражению стволовыми нематодами рода *Bursaphelenchus*.

## Лабораторная работа № 9

### ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИМ ФИТОПАТОГЕНАМ

Дереворазрушающие грибы – базидиомицеты в основном относятся к сапротрофным организмам, выполняющим важную работу по утилизации растительного опада. Однако некоторые виды грибов способны паразитировать на живых растениях, вызывая при определенных условиях их массовую гибель. Среди таких патогенов наибольшую распространенность и вредоносность для лесного хозяйства представляют возбудители корневых гнилей древесных пород из родов *Heterobasidion* (корневая губка) и *Armillaria* (опенок). Поражая корневые системы деревьев, патогены из данных таксонов вызывают куртинное или групповое усыхание деревьев, за счет разложения древесины увеличивают интенсивность ветровальных явлений, стимулируют развитие очагов насекомых-вредителей.

Корневая губка стала уже традиционной проблемой лесного хозяйства в хвойных насаждениях Европы. К примеру, очаги заболевания, вызванного грибом *H. annosum*, только в сосновых насаждениях Беларуси охватывают около 130 тыс. га, принося огромный ущерб лесному хозяйству. Площадь очагов этого заболевания составляет до 80% площади очагов всех вредителей и болезней и увеличивается в последние годы. Меры борьбы с корневой губкой весьма затруднительны и часто малоэффективны из-за сложного доступа к скрытой в почве инфекции патогена. Важнейшее значение в системе мероприятий по ограничению вредоносности корневой губки должно отводиться профилактическим мерам, направленным на формирование устойчивых к поражению патогеном насаждений. С этой целью предлагается создание смешанных культур с широким использованием пород, устойчивых к болезни.

Предварительно устойчивость древесных растений можно оценить в лабораторных условиях путем искусственного заражения.

**Цель работы:** изучить устойчивость древесных пород к корневой гнили, вызываемой грибом *H. annosum*.

**Оборудование и материалы:** 3-летние вегетирующие растения сосны обыкновенной, ели европейской и различных лиственных пород в контейнерах с почвой. Диаметр стволиков у поверхности почвы должен быть не менее 5 мм; чашки Петри с 2-недельной культурой высокопатогенного штамма *H. Annosum*, выращенного на

агаризованой питательной среде с добавлением на поверхность инокуляционных деревянных пластинок размером 5×3×2 мм; скальпели; пинцеты; спиртовая горелка; спирт этиловый 70%-ный; лента лабораторная Parafilm M; калькофлуор белый; дистиллированная вода; раствор КОН 10%-ный; предметные и покровные стекла; микроскоп с ультрафиолетовым излучением (флуоресцентный).

#### **Методика и ход выполнения работы**

1. Отобрать по 3–5 саженцев изучаемых пород без признаков ослабления, адаптированных к комнатным условиям. Очистить от хвои (листьев) участок стволика над поверхностью почвы высотой около 5 см и простерилизовать поверхность коры протиранием ватой, смоченной в 70%-ном растворе этилового спирта.

2. По центру подготовленного участка стерильным скальпелем сверху вниз сделать надрез коры до древесины с размером обнаженного участка около 3×5 мм и большей стороной надреза вдоль стволика.

3. Стерильным пинцетом приложить к ране инокуляционную деревянную пластинку, проросшую гифами патогена, и примотать ее лабораторной лентой.

4. В качестве контроля на 2–3 растениях использовать стерильную деревянную пластинку.

5. Растения пронумеровать и описать их состояние на момент начала опыта в табл. 13.

Таблица 13

#### **Результаты искусственного заражения растений грибом *Heterobasidion annosum* (штамм №.....)**

| № | Вид растения | Состояние растений на сутки |     |      |      |      | Размеры некроза через 28 сут, мм |           |
|---|--------------|-----------------------------|-----|------|------|------|----------------------------------|-----------|
|   |              | на начало опыта             | 7-е | 14-е | 21-е | 28-е | по высоте                        | по ширине |
|   |              |                             |     |      |      |      |                                  |           |

6. Саженцы культивировать при комнатных условиях в течение 28 дней, оказывая необходимый уход в виде поливов, рыхления почвы и т. д. Через каждые 7 дней проводить наблюдение за общим состоянием растений, при наличии изменений фиксировать их в таблице.

7. По окончании эксперимента саженцы выкопать, корни отмыть от почвы и слегка подсушить в комнатных условиях на фильтровальной бумаге в течение 5–10 мин. Срезать лабораторную ленту, при необходимости удалить кору и провести описание и измерение размеров сформировавшихся некрозов.

8. В центре некротической раны провести поперечный разрез стволика, острым скальпелем или лезвием вырезать диск толщиной, достаточной для рассмотрения под микроскопом в проходящем свете.

9. Диски окрасить калькофлуором белым по следующей методике. Растворить 0,1 г калькофлуора белого в 100,0 мл дистиллированной воды при слабом нагревании. После этого смешать небольшую каплю 10%-ного раствора КОН на предметном стекле с каплей 0,1%-ного раствора красителя и поместить в приготовленную смесь исследуемый объект, накрыть покровным стеклом и осторожно нагреть.

10. Препарат рассмотреть в ультрафиолетовом излучении при различных увеличениях. Мицелий патогена проявляется в виде яркой зеленой флуоресценции.

11. Определить характер распространения мицелия патогена по сечению ствола и относительную площадь поражения, диагностировать ткани, в которых выявляется гриб.

12. Используя совокупность факторов, провести ранжирование изучаемых растений по устойчивости к корневой губке.

### ***Контрольные вопросы***

1. Что такое корневые гнили и какова их вредоносность?

2. Почему затруднена борьба с корневыми гнилями в лесных насаждениях?

3. Почему важно знать степень устойчивости отдельных видов древесных растений к корневой губке?

4. Опишите метод искусственной инокуляции растений дереворазрушающими патогенами.

5. Каким образом можно оценить устойчивость растений к ксилотрофным грибам?

6. Опишите метод окраски растительного материала на наличие мицелия патогенных грибов.

7. По результатам опыта сформулируйте выводы об устойчивости испытанных пород к поражению корневой губкой.

## Лабораторная работа № 10

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД К НАСЕКОМЫМ-ФИТОФАГАМ

**Общие положения.** Устойчивость древесных пород к вредным насекомым является специфическим проявлением их взаимоотношений, сложившихся в процессе длительной соэволюции. Обычно выделяют три основных фактора устойчивости: *предпочтение* или *отсутствие предпочтения*, *антибиоз*, *выносливость*.

*Предпочтение* или *отсутствие предпочтения* той или иной древесной породе в качестве пищи, места для откладки яиц или укрытия определяется поведением самого насекомого и тесно связано с его пищевой специализацией.

*Антибиоз* – это отрицательное действие, оказываемое устойчивым деревом или породой дерева на определенные фазы жизненного цикла питающегося на нем насекомого. Такое действие может проявляться в снижении плодовитости или в увеличении смертности.

Под *выносливостью* понимается способность древесных пород восстанавливать поврежденные органы и только незначительно снижать текущий прирост по высоте. Например, черный тополь активно заселяется зеленой узкотелой златкой, однако эта древесная порода вынослива к повреждениям. Она быстро образует каллюс и зарастивает возникшие при повреждении раны. Текущий прирост этих деревьев изменяется мало. То же относится и к случаю повреждения листьев на деревьях. Наименее выносливы хвойные породы, гораздо больше – лиственные. Из хвойных пород самыми выносливыми являются сосна обыкновенная и лиственницы.

С иммунологической точки зрения наибольший практический интерес представляют факторы, объединяемые в первые две группы, т. к. они определяют истинную устойчивость. Кроме того, они играют большую роль в ухудшении физиологического состояния и депрессировании размножения вредителей, что обеспечивает возможность использования устойчивых видов и сортов растений для управления численностью массовых насекомых вредителей.

Факторы, вызывающие отвергание вредителем растений для питания или откладки яиц, могут быть самые различные. Это может быть обусловлено содержанием в растениях репеллентных



веществ дистантного или контактного действия, отпугивающей окраской листьев и других органов растений, их формой. Может быть связано с отсутствием привлекающих веществ, с характером ростовых и органообразовательных процессов и другой информацией о растениях-хозяевах, воспринимаемой вредителем.

Трудности вычленения явлений, определяющих отвергание или выбор насекомым растений или их органов и тканей, длительное время не давали возможности изучать эту группу факторов иммунитета. Результаты изучения пищевого поведения ряда видов насекомых показали, что при анализе причин отвергания или выбора насекомыми растений для питания и откладки яиц следует исходить из физиологических особенностей вредителя. Такой подход в небольшой степени будет способствовать развитию энтомологических исследований насекомых вообще и вскрытию причин отвергания ими растений как одной из ведущих основ иммунитета.

Барьеры, возникающие на пути выбора фитофагами растений для питания или откладки яиц, обуславливают или полную неповреждаемость растений, или, в случае частичного отвергания фитофагом растения, высокие энергетические потери у вредителя в результате поиска необходимого ему растения.

Во многих случаях непреодолимым для вредителя барьером следует считать биохимические, морфологические и ростовые особенности растений. Такими факторами могут быть: уровень содержания в растениях различных веществ, степень и характер опущения различных органов растений, восковой налет, характер жилкования листьев, строение кутикулы, эпидермиса, паренхимных тканей и сосудистых пучков, степень и темпы развития механических тканей, форма листьев, прилистников и цветковых чешуй и т. д.

Важным компонентом защитных реакций растений являются *ингибиторы ферментов*, участвующих в процессе переваривания пищи насекомыми. Например, у большинства бобовых растений имеется ингибитор  $\alpha$ -амилазы – специализированного фермента, расщепляющего крахмал. Некоторые виды растений синтезируют белки – *лектины*, способные формировать неперевариваемые для насекомых вещества, связываясь с углеводами и гликопротеидами. Наиболее изученными факторами растений, которые вызывают несварение у насекомых-фитофагов, являются *ингибиторы протеаз*, расщепляющих белки в процессе пищеварения. У насекомых при питании растениями, содержащими ингибиторы протеаз,

резко падают темпы роста и развития. В то же время в их пищеварительном тракте происходит накопление непереваренной пищи, что активирует чувствительные к растяжению механорецепторы, сигнализирующие о насыщении. Экспрессия генов, кодирующих ингибиторы протеаз, индуцируется механическим повреждением растений и позволяет им быстро сформировать систему защитных реакций от поедания насекомыми.

Таким образом, устойчивость растений к фитофагам можно оценить в лабораторных условиях по реакции растительных тканей в ответ на действие стандартного желудочного сока, моделирующего процессы, происходящие в желудочном тракте личинок вредителей.

**Цель работы:** изучить метод лабораторной оценки устойчивости растений к насекомым-фитофагам.

**Оборудование и материалы:** проростки 5–6 видов (сортов) растений с различной устойчивостью к фитофагам; бинокулярные микроскопы; скальпель или лезвие; пинцеты; мерные стаканы на 50 мл; стандартный желудочный сок; термостат.

#### **Методика и ход выполнения работы**

1. Изготовить отрезки неодревесневшего стебля растений для определения физиологической устойчивости тканей. Отрезки длиной 2 см вырезать под углом около 45° к волокнам из однородных по цвету участков стебля проростка. По каждому исследуемому образцу изготовить не менее 10 отрезков стебля (10-кратная повторность).

2. Изготовленные отрезки стебля поместить в мерные стаканы с 50 мл стандартного желудочного сока.

3. С целью моделирования процесса гидролиза стаканы с образцами разместить в термостате на 40 мин при температуре 37°C.

4. Измерение зоны действия желудочного сока провести по максимальной длине некротизированной (побуревшей) части отрезка стебля с помощью окуляр-микрометра под бинокуляром. Вычислить среднее арифметическое значение для каждого варианта опыта. Полученные данные занести в табл. 14.

5. Оценку степени устойчивости провести путем сопоставления средней величины некротизированной зоны стебля у опытных растений между собой.

6. Составить диаграмму, где на горизонтальной оси отметить виды (сорта), а на вертикальной – среднюю длину некротической

зоны (в мм), на которой в порядке снижения устойчивости разместить изучаемые растения.

Таблица 14

**Физиологическая устойчивость древесных пород  
к насекомым-фитофагам**

| № | Древесная порода | Длина некротической зоны, мм |   |   |   |   |   |   |   |   |    |        | В % к наиболее устойчивому растению |
|---|------------------|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|--------|-------------------------------------|
|   |                  | 1                            | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | средн. |                                     |
| 1 |                  |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |        |                                     |
| 2 |                  |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |        |                                     |

8. Сделать выводы об устойчивости видов (сортов) растений к фитофагам. Образцы, у которых величина зоны побурения существенно выше, чем у ряда других, отнести к восприимчивым.

9. По литературным источникам привести комплексы наиболее вредоносных фитофагов изучаемых видов растений.

***Контрольные вопросы***

1. Перечислите факторы устойчивости растений к насекомым-фитофагам.

2. Что обуславливает предпочтение или отсутствие предпочтения у насекомых той или иной древесной породы в качестве пищи?

3. Какова роль ингибиторов ферментов пищеварения фитофагов в устойчивости растений?

4. Почему выносливость растений часто не относят к истинной устойчивости?

5. Опишите ход выполнения работы.

6. Опираясь на полученные в ходе работы результаты, приведите выводы об устойчивости изученных растений к фитофагам.

**Лабораторная работа № 11**

**ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ  
К БОЛЕЗНЯМ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ**

**Общие положения.** Развитие инфекционных болезней и вредителей на растении может происходить при наличии трех основных факторов: патогенного организма или фитофага; восприимчивого

растения-хозяина и благоприятных условий внешней среды для развития вредных организмов (рис. 6).



Рис. 6. Схема взаимодействия факторов процесса поражения (повреждения)

Таким образом, факторы внешней среды (температура, освещенность, влажность воздуха, аэрация, количественный и качественный состав элементов питания в почве, ее кислотность и пр.) играют одну из ключевых ролей, влияющих на степень устойчивости растений к вредным организмам. Они могут понижать или повышать устойчивость к тем или иным болезням и вредителям, а также влиять на жизнеспособность фитофагов и фитопатогенов, усиливая или ослабляя их агрессивность. На характер этих взаимоотношений может сильно повлиять человек, применяя различные способы улучшения среды обитания растений в процессе выполнения различных этапов цикла агротехники выращивания.

Из основных *агротехнических способов повышения устойчивости* растений можно назвать: применение удобрений, систематическую прополку выращиваемой культуры, рыхление почвы, полив почвы в засушливую погоду, выращивание растений в контролируемых условиях (теплицы, парники и т. п.), омолаживающую обрезку ветвей (для снижения вероятности развития болезней и вредителей, приуроченных к возрастным тканям) и др.

*Применение удобрений* в оптимальных для растений количествах и концентрациях позволяет улучшить условия их питания и роста и тем самым усилить способность противостоять биотическим и абиотическим факторам. Кроме того, недостаток или дисбаланс содержания в почве основных элементов питания может негативно отразиться на способности растений противостоять инфекции. Так, при высоком содержании азота в почве, особенно при наличии легкоусвояемых его форм, растения обычно становятся более восприимчивыми к болезням. В таких условиях растения

формируют мощный вегетативный аппарат, что оптимально для проникновения и развития многих облигатных паразитов (например, ржавчинных грибов). В то же время калийные удобрения повышают вязкость цитоплазмы, активность дыхательных ферментов, задерживают распад органических веществ растений, усиливая их защитные реакции.

Роль микроэлементов в иммунитете растений проявляется как в защитных реакциях, направленных непосредственно на самого возбудителя инфекции – патогена, так и в реакциях, направленных на обезвреживание токсических выделений патогенных микроорганизмов и подавление активности их ферментов.

Для иммунизации могут применяться *физические методы* (облучение посевного материала ультрафиолетом, обработка ультразвуком, термическая обработка растений, замазка поврежденных частей ствола и ветвей деревьев специальными составами и т. п.).

Одним из распространенных способов повышения устойчивости растений к вредителям и болезням является применение специальных веществ – *иммунизаторов*. По своему происхождению они могут быть биологической и химической природы.

Если для человека и животных разработаны средства биологической иммунизации – *вакцины*, представляющие собой убитую или сильно ослабленную культуру патогена либо продукты его жизнедеятельности, то для растений применение вакцин сильно ограничено в связи со значительным отличием (от животных) протекающих в растениях физиолого-биохимических и других процессов.

Наиболее часто в практике защиты растений используют *химические иммунизаторы*. Это такие соединения, которые могут проникать в растения, ассимилироваться ими, оказывать влияние на обмен веществ, повышая тем самым устойчивость к паразиту не только в год применения, но и в последующих поколениях. В качестве химических иммунизаторов используются различные соединения. Наиболее широко среди них применяется 25%-ный парароданилин, известный под названием родан. Могут также использоваться растворы гидрохинона, паранитрофенола, орто-нитрофенола и др. Механизм действия иммунизаторов, как правило, заключается в их активном влиянии на обмен веществ растения, в том числе и на процессы, обеспечивающие защитные реакции растения против возбудителей болезней. Чем глубже изменения в обмене веществ, тем продолжительнее может быть

эффект повышения устойчивости. В некоторых случаях приобретенный иммунитет сохраняется не только в год воздействия на растение химическим иммунизатором, но и на следующий год в последствии.

В связи с интенсивным развитием молекулярной генетики и ее достижениями в последнее время в практику повышения устойчивости растений все чаще стали внедряться *методы генной инженерии*. При создании генетически модифицированных растений в их геном добавляются фрагменты, повышающие устойчивость к вредным организмам. К примеру, в растительный геном могут быть введены кодирующие иммуноглобулины гены, экспрессия которых приводит к образованию антител или их фрагментов, способных функционировать в растении, создавая в конечном итоге эффект наподобие вакцинации. В других случаях трансгенные растения получают способность выделять специфические ферменты, например хитиназу, которая растворяет клеточные оболочки паразитных видов грибов при их попытках внедриться в растение.

**Цель работы:** изучить способы повышения устойчивости растений к болезням в контролируемых условиях при создании высокого инфекционного фона.

**Оборудование и материалы:** поддоны с почвой, зараженной спорами гриба *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen (2 шт.); семена сосны или ели; протравители семян фунгицидного действия (2–3 наименования); стимуляторы роста (1–2 варианта), макро- и микроэлементы питания (2–3 наименования); облучатель или микробиологический бокс, оборудованный ультрафиолетовой лампой.

**Методика и ход выполнения работы.**

1. Группа разбивается на 2 бригады. Каждая бригада в лабораторных условиях готовит поддон с почвой для посева семян. Почва в поддонах предварительно инфицируется грибами рода *Fusarium* – возбудителями инфекционного полегания сеянцев. Иммунизация растений производится путем химической и физической обработки семян сосны или ели. Всего в опыте следует испытать 6–9 вариантов повышения устойчивости растений. Рекомендуется использовать предпосевную обработку семян фунгицидами (2–3 наименования), стимуляторами роста (1–2 варианта), макро- и микроэлементами питания (2–3 наименования), облучение семян ультрафиолетом в течение 2–3 мин и др. Для каждого варианта опыта

отсчитать 50 шт. семян сосны или ели. Отдельно отсчитать еще 50 семян для контроля (без обработки).

При работе с фунгицидами, стимуляторами роста, удобрениями и ультрафиолетом следует строго соблюдать меры безопасности.

2. В почве поддона нарезать бороздки глубиной около 2 см. Количество бороздок должно соответствовать количеству вариантов опыта (с учетом контроля). Семена высеять равномерно в дно бороздок, укрыть почвой, которую слегка уплотнить и увлажнить. Поддоны установить на проращивание в помещении с температурой  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ . Почву периодически увлажнять во избежание ее подсыхания и гибели появляющихся проростков от недостатка влаги.

3. Результаты опыта снимать через 2 недели. Подсчитать количество взошедших растений, в том числе пораженных и погибших от инфекционного полегания по вариантам опыта. Высчитать количество невзошедших растений (как разность между количеством высеянных семян и числом растений в появившихся всходах). Определить распространенность болезни по следующей формуле:

$$P = 100n / N,$$

где  $P$  – распространенность болезни %;  $n$  – количество больных растений (сумма пораженных, погибших и невзошедших), шт.;  $N$  – общее количество семян, используемых в варианте опыта (50 шт.).

4. Результаты записать в табл. 15.

Таблица 15

**Оценка различных способов иммунизации растений с искусственным созданием инфекционного фона патогена**

| Вариант опыта                           | Количество высеянных семян, шт. | Количество взошедших растений, шт. |            |          | Невзошедших растений, шт. | Распространенность болезни, % |
|-----------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------|----------|---------------------------|-------------------------------|
|                                         |                                 | здоровых                           | пораженных | погибших |                           |                               |
| Контроль (без обработки)                | 50                              |                                    |            |          |                           |                               |
| Обработка фунгицидом (указать название) | 50                              |                                    |            |          |                           |                               |
| Другие варианты                         | 50                              |                                    |            |          |                           |                               |

5. По основному критерию – распространенности болезни в различных вариантах и по отношению к контролю сделать заключение о возможности и степени повышения иммунитета растений к инфекционному полеганию сеянцев различными методами (способами).

### ***Контрольные вопросы***

1. Что такое иммунизация растений?
2. Назовите основные способы повышения устойчивости растений к вредителям и болезням.
3. Какие химические вещества чаще используют в качестве иммунизаторов?
4. Назовите физические способы иммунизации.
5. Почему омолаживающая обрезка деревьев повышает устойчивость растений к вредным организмам?
6. Каким образом методы генной инженерии могут быть применены в целях повышения устойчивости растений к вредителям и болезням? Приведите примеры.
7. На какой срок можно искусственно повысить иммунитет растений?



# ПРИЛОЖЕНИЕ

---

## МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ОПТИЧЕСКИХ ПРИБОРОВ И ДРУГОГО ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ

Изучение устойчивости растений к вредителям и болезням во многих случаях проходит с применением оптических приборов и другого оборудования, которым нужно уметь правильно пользоваться. При проведении лабораторных работ в рамках данной учебной дисциплины широко применяются следующие оптические приборы и оборудование: световые микроскопы (проходящего и рассеянного света), объективный и окулярный микрометры, рН-метр, спектрофотометр и др.

*Микроскопы* – оптические приборы, предназначенные для рассмотрения объектов, невидимых невооруженным глазом. В настоящее время наиболее широко применяются биологические микроскопы МБР-1, МБИ-3, а также микроскопы серии «Биолам» и бинокулярные микроскопы серии МБС.

В биологических микроскопах различают две части: механическую и оптическую. Механическая часть состоит из штатива, коробки с микромеханизмом, макрометрического винта, тубусодержателя, револьверной системы, предметного столика, винта и оправы конденсора, вилки для зеркала (рис. 1). Все эти детали служат для крепления и передвижения оптических частей микроскопа.

Штатив является опорой всех составных частей микроскопа. Основание его – башмак имеет прямоугольную или подковообразную форму и придает микроскопу необходимую устойчивость. На нем монтируется коробка микромеханизма, который представляет собой систему зубчатых колес, приводимых в действие вращением микровинта. Микромеханизм служит для точной фокусировки изображения, позволяющей рассматривать его детали. К коробке микромеханизма крепится тубусодержатель, фиксирующий в определенном положении оптические части микроскопа. В нижней его части расположен механизм для грубой подачи тубуса при помощи

макровинтов, расположенных с обеих сторон тубусодержателя. Тубусодержатель перемещается на определенную высоту, устанавливая фокусные расстояния для объективов с разным увеличением.

Тубусодержатель микроскопа «Биолам С-11» располагается наклонно. В верхней его части установлена головка с гнездом для крепления тубуса и револьверной системы. Тубус фиксируется в гнезде с помощью винта, ослабив который легко повернуть его вправо и влево. Тубус укреплен под определенным углом, что создает большее удобство при работе с этим микроскопом.

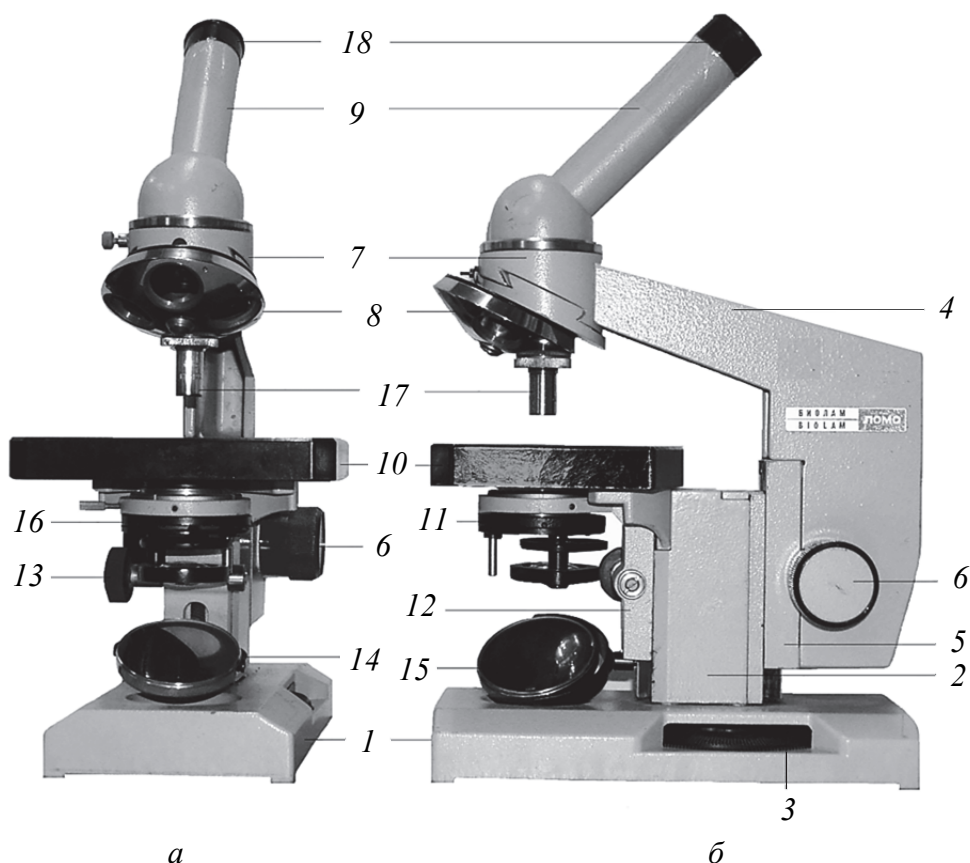


Рис. 1. Микроскоп биологический «Биолам С-11»:  
*а* – вид спереди; *б* – вид сбоку; 1 – башмак; 2 – коробка микромеханизма;  
 3 – микровинт; 4 – тубусодержатель; 5 – механизм подачи тубуса;  
 6 – макровинт; 7 – головка; 8 – револьверная система; 9 – тубус;  
 10 – предметный столик; 11 – гильза конденсора; 12 – кронштейн;  
 13 – винт конденсора; 14 – вилка зеркала; 15 – зеркало; 16 – конденсор;  
 17 – объектив; 18 – окуляр

Револьвер имеет четыре отверстия с резьбой для ввинчивания объективов. Сферическая его часть вращается, что позволяет

быстро заменять один объектив другим. Предметный столик микроскопа предназначен для помещения и закрепления на нем исследуемого препарата. Расположен он над коробкой микромеханизма, под револьвером и тубусом. В середине предметного столика имеется круглое сквозное отверстие, через которое проходят лучи света, освещающие препарат. В верхней поверхности столика сделано несколько мелких отверстий для установки клемм – металлических пружинящих пластинок, предназначенных для крепления препарата на предметном столике.

Оправа (гильза) конденсора укреплена на кронштейне, расположенном на коробке микромеханизма под предметным столиком. Небольшой болтик удерживает конденсор в гильзе. При помощи винта конденсор может перемещаться вверх и вниз на 20 мм. Под гильзой конденсора крепится вилка зеркала.

Оптическая часть состоит из осветительной и увеличивающей систем. Осветительная система включает в себя зеркало и конденсор с диафрагмой. Зеркало микроскопа направляет свет на объект. Оно имеет две отражающие поверхности: с одной стороны плоскую, а с другой – вогнутую. Вогнутое зеркало применяется при работе с искусственным освещением и объективами малых увеличений. При естественном освещении лучше пользоваться плоской поверхностью зеркала. Зеркало вращается в полукруглой вилке, которая, в свою очередь, поворачивается справа налево, поэтому зеркало может перемещаться в двух взаимно перпендикулярных направлениях, что позволяет увеличить освещение.

Конденсор (рис. 2) сосредотачивает лучи света, отраженные зеркалом, на препарате. Он состоит из двух развинчивающихся частей. Конусообразная часть включает одну или несколько линз, верхняя из которых обращена к отверстию в предметном столике микроскопа. Цилиндрическая часть имеет одну линзу. В ее оправу вмонтирована диафрагма, которая состоит из отдельных изогнутых металлических пластинок. Пластины смещаются, накладываются друг на друга благодаря движению связанного с ними рычажка. При этом отверстие диафрагмы суживается или расширяется. Степенью раскрытия диафрагмы регулируется светосила конденсора. При сужении отверстия диафрагмы через конденсор проходят только лучи, близкие к центру, чем достигается большая четкость изображения. На конденсоре снизу находятся линза и подвижная оправа (рамка) для светофильтра.

Светофильтр матового или синего стекла служит для смягчения слишком яркого света.

Увеличивающая система микроскопа создает увеличенное обратное и мнимое изображение объекта. Она состоит из окуляра, вставленного в тубус, и объектива. Объектив направлен на исследуемый объект (отсюда и его название). Он представляет собой короткую металлическую трубку, в которой монтируется система линз. Микроскопы серии «Биолам» снабжены обычно тремя объективами: № 8, 40 и 90, дающими соответственно малое, среднее и большое увеличение. Объектив № 90 предназначен для рассматривания самых малых объектов с иммерсионной системой.

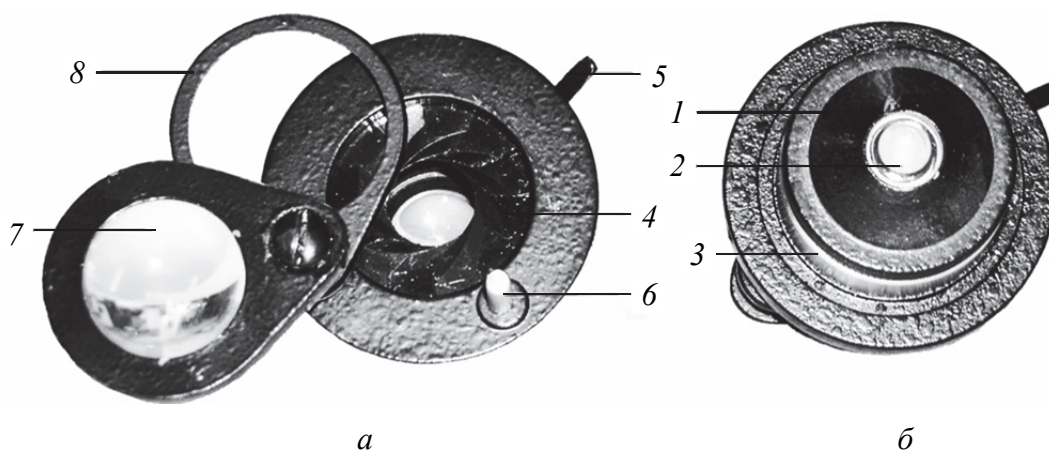


Рис. 2. Конденсор:

*а* – ирисовая диафрагма и линза; *б* – общий вид; 1 – верхняя часть; 2 – верхняя линза; 3 – нижняя часть; 4 – диафрагма; 5 – рычажок диафрагмы; 6 – ограничительный упор; 7 – нижняя линза; 8 – оправка для светофильтра

Объективы ввинчены в подвижный револьвер, поворотом которого один объектив легко заменить другим. Это важно, т. к. часто деталь, замеченную при малом увеличении объекта, необходимо изучить при большом увеличении. Объективы должны быть центрированы, т. е. точка препарата, установленная в центре поля зрения при слабом объективе, должна остаться в поле зрения и более сильного объектива. Для этого линзы монтируются так, чтобы оптическая ось каждого объектива совпадала с оптической осью тубуса.

В верхней части тубуса находится окуляр, состоящий из двух линз, вставленных в металлическую оправку. В окуляр направлен глаз исследователя. Окуляры также обладают различным увеличением. Для биологических микроскопов применяются окуляры

с увеличением в 7, 10 и 15 раз. На каждом объективе и окуляре выгравирована цифра, указывающая увеличение.

Таким образом, наименьшее увеличение микроскопа типа МБИ – в 56 раз (8 – увеличение окуляра, умноженное на 7 – увеличение объектива), а наибольшее – 1350 раз ( $90 \cdot 15$ ). Глаз исследователя, как бы продолжая оптическую систему микроскопа, преломляет лучи, вышедшие из окуляра, и строит увеличенное изображение объекта на сетчатке.

В биологических микроскопах, где тубус расположен по отношению к объекту под углом  $45^\circ$ , обычно есть дополнительная призма, изменяющая ход лучей и направляющая их в окуляр. Линзы микроскопа, увеличивающие объект, дают и отрицательные, мешающие исследованию явления. Боковые лучи, падающие на края линзы, преломляются сильнее остальных и делают изображение объекта расплывчатым, нечетким. Это явление называется сферической аберрацией. Кроме того, белый луч света, проходя через линзу, разлагается на составные цвета. Изображение объекта получается окруженным радужой. Это явление называется хроматической аберрацией. Для устранения таких явлений в объективах микроскопа монтируют целую систему исправляющих линз.

Для микроскопирования прежде всего необходимо установить хорошую освещенность поля зрения. При работе с естественным освещением рабочий стол должен стоять у окна, чтобы света было достаточно. В то же время прямые солнечные лучи создают излишне сильное освещение, слепящее глаза, поэтому рекомендуется микроскопировать у окон, обращенных на север. Естественный свет направляют на конденсор плоской стороной зеркала. Конденсор должен быть поднят и диафрагма открыта. Устанавливают объектив № 8, окуляр 7 или 10. Поворачивают зеркало до тех пор, пока поле зрения не станет равномерно и интенсивно освещенным.

При искусственном освещении осветитель (типа ОИ-19) устанавливают на расстоянии 10–12 см от зеркала микроскопа. Зеркало должно быть обращено к осветителю вогнутой поверхностью и повернуто под углом примерно  $45^\circ$  к оси конденсора. Перемещая осветитель, направляют свет на центр зеркала, отражающего лучи в линзу конденсора. Применяют также осветители (типов ОИ-32, ОИ-35), которые вставляют вместо зеркала в основание микроскопа под конденсор. Передвигая патрон с лампой вдоль оси осветителя и поворачивая осветитель вокруг своей оси, получают наиболее

интенсивное освещение поля зрения микроскопа. Для более равномерного освещения объекта вставляют в гнездо оправы осветителя или подвижную оправу конденсора матовое либо синее стекло.

Препарат помещают на предметный столик микроскопа, прижимают клеммами и рассматривают под малым увеличением. Для этого препарат устанавливают под объективом № 8, конденсор опускают, при сильном свете закрывают диафрагму. Поворачивая макровинт, нужно найти рабочее расстояние между объектом и линзой объектива, при котором будет получено изображение. Для объектива № 8 оно составляет 10–12 мм. Вращая макровинт от себя, опускают тубус, вращая на себя – поднимают. Макровинтом осторожно перемещают тубус до появления четкого изображения объекта в поле зрения. Передвигая предметное стекло, устанавливают в центре поля зрения ту часть объекта, которую нужно рассмотреть при большом увеличении. Затем, не поднимая тубус, нужно повернуть револьвер так, чтобы поместить над объектом объектив № 40. При этом свет необходимо усилить: открыть диафрагму и приподнять конденсор до среднего положения. Снова находят рабочее расстояние между объективом № 40 и объектом. Для этого объектива оно равно примерно 2–3 мм.

Фокусировку производят очень осторожно, чтобы не допустить соприкосновения объектива с препаратом и повреждения того или другого, т. к. объектив почти касается препарата. Глядя в окуляр, медленно поднимают тубус до получения изображения объекта. Вращением микровинта добиваются четкости изображения.

Иммерсионное микроскопирование применяется при необходимости наибольшего увеличения. На препарат, а в некоторых случаях на верхнюю линзу конденсора наносят каплю иммерсионного масла. Обычно для иммерсии применяют кедровое масло. Освещение должно быть сильным, т. е. конденсор поднят до отказа и диафрагма открыта. Иммерсионное масло применяют для создания между препаратом и объективом однородной среды, преломляющей световые лучи так же, как и линзы объектива. Это способствует получению четкого изображения при большом увеличении.

Препарат помещают на предметный столик и прижимают к нему клеммами. Объектив № 90 погружают в каплю иммерсионного масла до соприкосновения с препаратом. Затем, глядя в окуляр, поднимают тубус очень осторожными движениями макровинта,

т. к. рабочее расстояние между объективом и объектом в этом случае равно 1,0–1,5 мм. При помощи микровинта получают четкое изображение и просматривают объект послойно. Работая с микровинтом, нужно поворачивать его медленно на неполный оборот. Ни в коем случае не следует свободно и много вращать микровинт: это может привести к нарушению регулировки и уменьшению четкости изображения.

Микроскопирование следует вести поочередно: то левым, то правым глазом. При этом оба глаза должны быть открыты, что предотвращает утомление.

После окончания работы вращением макровинта поднимают тубус, убирают предметное стекло и с поверхности фронтальной линзы и оправы удаляют иммерсионное масло (обтирают кусочком чистой фильтрованной бумаги или сухой тряпочки, смоченной в бензине). Микроскоп накрывают полиэтиленовым мешком или помещают в футляр. Его следует предохранять от пыли, соприкосновений с кислотами, щелочами и другими химическими веществами. Линзы окуляра и объектива необходимо периодически протирать чистой тряпочкой.

Одним из лидеров технических разработок в области биологической микроскопии можно считать фирму Leica Microsystems (Германия). Микроскопы Leica серии DM – одни из наиболее современных.

Чаще при биологических исследованиях применяют микроскопы Leica DM LS и DM LB (рис. 3) – модульные системы, обеспечивающие возможность исследований в проходящем и отраженном свете с применением всех методов световой микроскопии (светлое и темное поле, косое освещение, фазовый контраст, флуоресцентная и поляризационная микроскопия, дифференциальный интерференционный контраст).

В зависимости от задач, стоящих перед исследователями, они могут быть оснащены объективами



Рис. 3. Универсальный исследовательский микроскоп Leica DM LB 2



с увеличением от  $1\times$  до  $200\times$ . При этом объективы характеризуются большой числовой апертурой, отсутствием сферической и хроматической аберрации, плоским и широким полем зрения. Некоторые из них имеют коррекционную оправу для установки на различную толщину препарата. Установленные в одном револьверном держателе, объективы парафокальны, т. е. изображение объекта при смене одного объектива другим остается резким и не возникает необходимости в дополнительной фокусировке на объект, что особенно важно при переходе с минимальных увеличений на максимальные.

Микроскопы этой серии имеют широкий спектр различных типов конденсоров, согласованных с соответствующими объективами, и окуляров. Кроме того, они оснащены полевыми и апертурными диафрагмами. Максимальное суммарное увеличение – от  $3000\times$  до  $6400\times$  для различных моделей. Для флюоресцентных исследований установлены фильтры, обеспечивающие пропускание света определенного диапазона длин волн, испускаемых флюорохромом под воздействием ультрафиолетового излучения. Фильтры встроены, что позволяет легко осуществлять их смену. Освещение для световой микроскопии осуществляется встроенными галогенными лампами мощностью от 12 до 100 Вт. Для флюоресцентных исследований могут быть использованы ртутные лампы 50 или 100 Вт либо ксеноновые 75 Вт.

Любой из микроскопов серии DM может быть оснащен тринокулярным тубусом, на который устанавливается фото- или видеокамера, и в котором полностью или частично (50%) осуществляется переключение светового потока с окуляров на фото- и телевизионный выход. Это особенно важно для демонстрации микроскопических объектов перед широкой аудиторией.

К оптическим приборам, применяемым при фитопатологических исследованиях, относятся также бинокулярный микроскоп серии МБС, бинокулярная насадка АУ-12, обыкновенная лупа, рисовальный аппарат, окулярный и объективный микрометры, счетная камера.

*Бинокулярный микроскоп МБС-10* (рис. 4) предназначен для наблюдения как объемных предметов, так и тонких пленочных и прозрачных объектов, а также препарировальных работ. Микроскоп состоит из оптической части, столика и осветителя. Оптическая часть включает: окулярную насадку с окулярными трубками и винтом регулировки расстояния между окулярами; оптическую головку с рукоятками переключения кратности увеличения и вин-



тами крепления окулярной насадки и объектива и собственно объектив. Стол микроскопа оснащен винтом крепления подставки с зеркалом для рассмотрения объектов в проходящем свете и отверстиями для прижимных планок. Осветитель состоит из лампы с патроном, шарнирного кронштейна крепления и блока питания.

*Биноккулярная насадка АУ-12* позволяет получать рельефное изображение объекта. Ею можно пользоваться при изучении культур грибов и бактерий, патологических изменений пораженных тканей и пр. Она представляет собой биноккулярный тубус, устанавливаемый на микроскопе вместо обычного. При работе с биноккулярной насадкой вначале регулируют расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы изображение в поле зрения совпало. Эта насадка применяется с объективами любой системы.

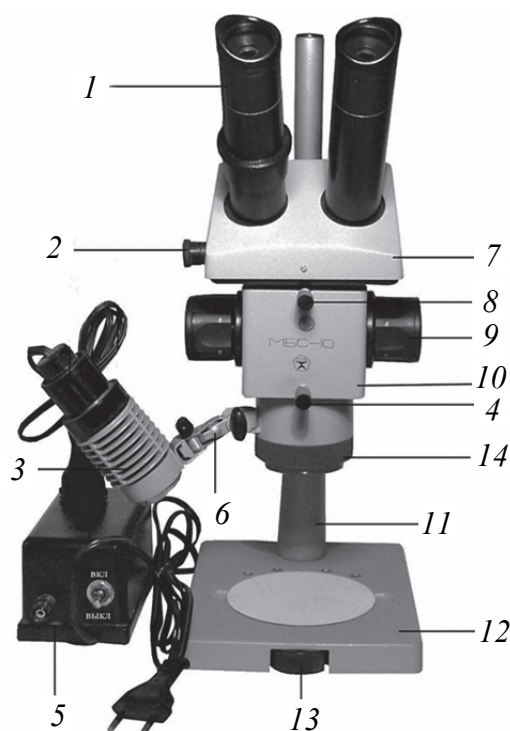


Рис. 4. Биноккулярный микроскоп МБС-10:

- 1 – окулярная трубка; 2 – винт регулировки расстояния между окулярами;
- 3 – лампа осветителя с патроном; 4 – винт крепления объектива;
- 5 – блок питания; 6 – кронштейн крепления осветителя;
- 7 – окулярная насадка; 8 – винт крепления окулярной насадки;
- 9 – рукоятка переключения кратности увеличения; 10 – оптическая головка;
- 11 – направляющая стола микроскопа; 12 – стол микроскопа;
- 13 – винт крепления основания стола микроскопа с зеркалом

*Окулярный микрометр* (рис. 5) используется для измерения поперечных размеров клеток растений, спор и мицелия грибов, а также других объектов. Он представляет собой круглую стеклянную пластинку со шкалой, на которой 1 см (или 0,5 см) разделен на 100 (или 50) равных делений.

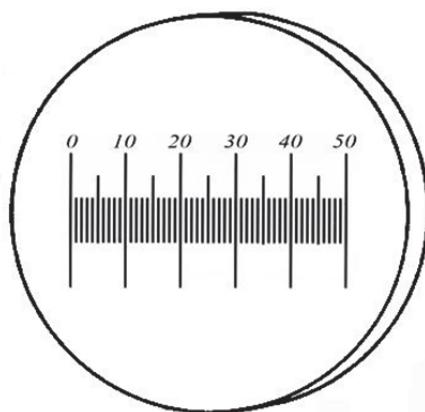


Рис. 5. Окулярный микрометр

Для установления цены деления окулярного микрометра служит *объективный микрометр*. Он представляет собой предметное стекло, на котором 1 мм разделен на 100 частей (рис. 6).

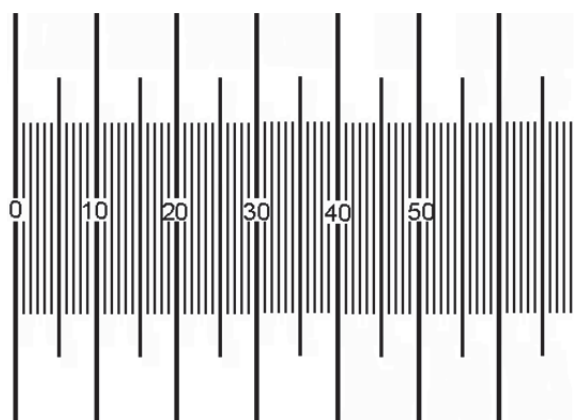


Рис. 6. Объективный микрометр

Одно деление объективного микрометра равно 0,01 мм, или 10 мкм. Для калибрования окулярного микрометра его помещают под окулярной линзой: линзу нужно отвинтить, внутрь на диафрагму вставить микрометр делениями вниз и снова завинтить. Объективный микрометр устанавливают на предметный столик и вращением окуляра добиваются совпадения направления шкал

объективного и окулярного микроскопов. Далее левые крайние деления микрометров совмещают, а затем отсчитывают, какое максимальное деление шкалы окулярного микрометра совпало с делением шкалы объективного. Например, 60 делений окулярного микрометра совпало с 18 делениями объективного (одно деление объективного микрометра равно 10 мкм, а 18 делений – 180 мкм). Отсюда – одно деление окулярного микрометра равно 3 мкм ( $180 : 60$ ).

Определив цену деления окулярного микрометра, объективный микрометр заменяют препаратом и производят измерение исследуемого объекта. Если, например, измеряемая спора занимает в длину 6, а в ширину 2,5 деления окулярного микрометра, значит длина ее будет 18 мкм ( $3 \cdot 6$ ), а ширина 7,5 мкм ( $3 \cdot 2,5$ ). Для определения размеров объектов с учетом цены деления можно заранее заготовить табличку.

В настоящее время для измерения линейных размеров микроскопических объектов используется микрометр окулярный винтовой (МОВ-1–15×). Он состоит из компенсационного окуляра 15× с диоптрийным механизмом и отсчетного приспособления (рис. 7).

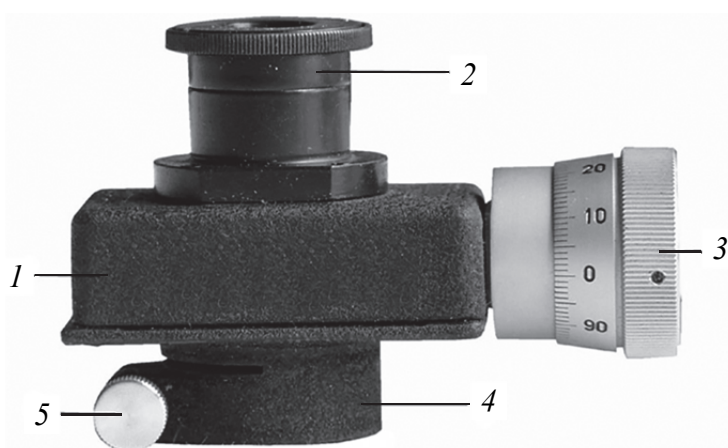


Рис. 7. Микрометр окулярный винтовой МОВ-1–15×:  
1 – корпус микрометра; 2 – компенсационный окуляр с диоптрийным механизмом;  
3 – барабан с отсчетным механизмом;  
4 – хомут; 5 – зажимной винт

Его надевают на окулярную трубку тубуса микроскопа до упора и закрепляют винтом. Вращением окуляра устанавливается резкость изображения перекрестия. В фокальной плоскости окуляра микрометра расположены две стеклянные пластинки: первая – неподвижная

со шкалой от 0 до 8 мм (цена деления 1 мм) и вторая – подвижная с перекрестием и индексом в виде рисок. Вторая пластинка связана с микрометрическим винтом, шаг которого равен 1 мм, т. е. при повороте барабанного винта за один оборот риски перекрестия в поле зрения окуляра переместятся на одно деление шкалы. Неподвижная шкала служит для отсчета целых миллиметров перемещения перекрестия окуляра, а шкала на барабане винта – для отсчета сотых долей миллиметра. Барабан винта разделен на 100 частей с ценой деления в 0,01 мм. Для измерения размеров объекта по объективному микрометру предварительно определяется линейное увеличение объектива.

Объективный микрометр устанавливается на предметном столике, и микроскоп наводится на резкость изображения его шкалы. Для удобства измерения нулевой штрих шкалы объективного микрометра устанавливают на расстоянии  $1/3$  радиуса поля зрения от края, затем вращением барабана по часовой стрелке подводят центр перекрестия окуляра на совмещение с изображением нулевого штриха шкалы объективного микрометра и делают по шкале окулярного микрометра отсчет ( $A$ ). Вращая барабан по часовой стрелке, совмещают центр перекрестия с изображением штриха, который расположен на расстоянии  $1/3$  радиуса поля зрения от края и делают второй отсчет ( $B$ ). Обязательно знать, какое число делений шкалы объективного микрометра взято для измерения. Линейное увеличение объектива вычисляется по формуле

$$P = B - A / Za,$$

где  $P$  – линейное увеличение объектив;  $A$  – первый и  $B$  – второй отсчет по окулярному микрометру;  $Z$  – принятое при измерении число делений объективного микрометра;  $a$  – цена деления шкалы объективного микрометра.

Предположим, что первый отсчет по окулярному микрометру равен 2,50 мм, а второй отсчет – 6,35 мм; принятое при измерении число делений шкалы объективного микрометра – 25; цена деления шкалы объективного микрометра – 0,01 мм. Тогда увеличение объектива будет

$$P = \frac{6,35 - 2,50}{25 \cdot 0,01} = \frac{3,85}{0,25} = 15,4 \times.$$

Для измерения величины объекта необходимо вращением барабана по часовой стрелке подвести центр перекрестия на край изображения объекта и по шкалам микровинта сделать первый отсчет (предположим 1,65 мм). Затем таким же образом совместить перекрестие с изображением второго края объекта и сделать второй отсчет по шкалам микровинта (он равен 6,34 мм). По разности отсчетов определяют величину изображения объекта.

Для определения величины самого объекта полученную разность (4,65 мм) необходимо разделить на линейное увеличение объектива ( $15,4\times$ ). Следовательно, для нашего примера искомая величина объекта будет равна  $4,65 : 15,4 = 0,305$  мм.

*рН-метры* предназначены для измерений показателя активности ионов водорода (рН), т. е. уровня кислотности или щелочности среды. В настоящее время они представлены самыми разнообразными конструкциями: как стационарными, так и переносными. Принцип действия рН-метров основан на зависимости электродвижущей силы (ЭДС) электродной системы, образованной погруженными в исследуемый водный раствор измерительным электродом и электродом сравнения, от активности ионов водорода (рН). Измеряются ЭДС электродной системы и температура раствора с последующим преобразованием измеренных значений в величины Рн по методу градуировочного графика.

Конструктивно рН-метры состоят из электродной системы (набора первичных преобразователей) и измерительного преобразователя. В современных рН-метрах в качестве первичных преобразователей используются комбинированные электроды и термоэлектрический датчик температуры, что позволяет измерять кислотность растворов в широких диапазонах температурных условий.

Одним из современных распространенных рН-метров, применяемых в лабораториях, является «ЭКСПЕРТ-рН» (рис. 8).

Измерительный преобразователь (ИП) выполнен в виде микропроцессорного блока с графическим жидкокристаллическим дисплеем и пленочной клавиатурой. На корпусе ИП расположены разъемы для подключения первичных преобразователей – стеклянного электрода, электрода сравнения и датчика температуры, а также разъем для подключения магнитной мешалки и разъем для подключения персонального компьютера для передачи информации об измеряемых параметрах в цифровом коде интерфейса RS 232. Программное обеспечение позволяет управлять работой рН-метра,

включая градуировку, диагностику состояния и автоматическую температурную компенсацию результатов измерений.



Рис. 8. pH-метр «ЭКСПЕРТ-pH»

Порядок работы на pH-метре: включить прибор, подключить к нему электроды и магнитную мешалку. Перед первым циклом измерений исследуемых растворов следует провести калибровку прибора. Для этого залить в лабораторную посуду калибровочные растворы, приготовленные из набора стандарт-титров. Чтобы растворы имели однородный состав, в них перед измерениями каждый раз необходимо погружать магниты и ставить на мешалку. Откалибровать прибор по известной кислотности каждого раствора, поочередно погружая в них электроды. Следует хорошо промывать электроды и магниты в дистиллированной воде после каждого их погружения в рабочий раствор. После калибровки прибора берется исследуемый раствор, магниты снова погружаются на дно посуды, включается мешалка и производятся измерения показаний электродов.

*Спектрофотометр PV 1251C «Solar»* (рис. 9) является современным прибором, обеспечивающим измерение спектров поглощения и пропускания, определение концентрации, кинетические и многоволновые измерения, предоставляя широкий выбор функций математической обработки и возможность сохранения и документирования результатов измерений при работе с компьютером. Предна-

значен для применения в лабораториях биологического профиля в качестве полуавтоматического биохимического анализатора.



Рис. 9. Спектрофотометр PV 1251C

*Правила работы на спектрофотометре PV 1251C.*

1. Подготовка к работе. Включить спектрофотометр в сеть за 30 мин до начала работы, установив выключатель в положение «ON». Дождаться появления на цифровом табло сообщений «SOLAR», «325». Если на табло появилось сообщение «Et rot» – прогреть прибор в течение **3 минут**, выключить, снова включить и дождаться сообщений «SOLAR», «325».

2. Установка заданной длины волны. Нажать последовательно кнопки «F», « $\lambda$ ». В левой части цифрового табло отобразится значение длины волны, на которую установлен в данный момент прибор. Набрать с помощью клавиатуры требуемую длину волны в диапазоне от **325** до **999** нм, нажать кнопку «Enter». В левой части табло появится заданная длина волны. При нажатии кнопок «F» и « $<\lambda$ » длина волны уменьшится на **1** нм; при нажатии кнопок «F» и « $>\lambda$ » длина волны увеличится на **1** нм. При нажатии кнопок «F» и « $\lambda_0$ » устанавливается длина волны **325**.

3. Измерение оптической плотности. После установки длины волны поместить пустую кювету или кювету с контрольным раствором в кюветное отделение прозрачной стороной по направлению стрелки, закрыть крышку кюветного отделения. Нажать кнопку

«Zero» – появляется значение «0,000» (начало шкалы отчета). Поместить в кюветное отделение кювету с исследуемым образцом. Закрыть крышку кюветного отделения. Нажать кнопку «A» – на табло отобразится измеренная величина оптической плотности.

4. Установление режима непрерывного измерения оптической плотности. Выполнив первые этапы п. 3, после нажатия кнопки «Zero» поместить в кюветное отделение кювету с исследуемым образцом, нажать последовательно кнопки «F» и «λ», затем набрать код режима непрерывного измерения оптической плотности «104», нажать кнопку «Enter». Стартует процесс непрерывного измерения оптической плотности с непрерывным выводом результатов измерения на табло.



# ЛИТЕРАТУРА

---

1. Полещук, Ю. М. Устойчивость растений к вредителям и болезням: учеб. пособие / Ю. М. Полещук. – Минск: БГТУ, 2003. – 89 с.
2. Баранаў, М. І. Фізіялогія раслін з асновамі біяхіміі: дапаможнік да лабараторных заняткаў / М. І. Баранаў, М. П. Каўбаса. – Мінск: БДТУ, 2012. – 102 с.
3. Помазков, Ю. И. Иммуни́тет растений к болезням и вредителям: учеб. пособие / Ю. И. Помазков. – М.: Изд-во УДН, 1990. – 80 с.
4. Дьяков, Ю. Т. Иммуни́тет растений / Ю. Т. Дьяков, В. А. Шкаликов. – М.: Колос, 2005. – 190 с.
5. Плотникова, Л. Я. Иммуни́тет растений и селекция на устойчивость к вредителям и болезням / Л. Я. Плотникова. – М.: Колос, 2007. – 359 с.
6. Шапиро, И. Д. Иммуни́тет растений к вредителям и болезням / И. Д. Шапиро, Н. А. Вилкова, Э. И. Слепаян. – Л.: Агропромиздат, 1986. – 192 с.
7. Вавилов, Н. И. Иммуни́тет растений к инфекционным заболеваниям / Н. И. Вавилов. – М.: Наука, 1986. – 296 с.
8. Рубин, Б. А. Биохимия и физиология иммунитета растений / Б. А. Рубин, Е. В. Арциховская, В. А. Аксенова. – М.: Высш. шк., 1975 – 320 с.
9. Токин, Б. П. Целебные яды растений. Повесть о фитонцидах / Б. П. Токин. – Л.: Лениздат, 1974. – 344 с.
10. Фитоалексины / под ред. Дж. А. Бейли, Дж. В. Мансфилда; пер. с англ. – Киев: Наукова думка, 1985. – 256 с.
11. Рысс, А. Ю. Самые простые методы обнаружения стволовых нематод и их лабораторного культивирования / А. Ю. Рысс. – СПб.: Известия СПб. лесотехн. академии. – 2015. – С. 287–295.
12. Чекмарева, Л. И. Иммуни́тет растений к вредителям: учеб. пособие / Л. И. Чекмарева, Е. В. Догадина, Г. И. Караваева. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2005. – 100 с.

13. Федоров, Н. И. Лесная фитопатология. Лабораторный практикум / Н. И. Федоров, В. А. Ярмолович. – Минск: БГТУ, 2005. – 448 с.

14. Биохимия растений: метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы студентов / сост.: Г. Г. Филиппова, И. И. Смолич. – Минск: БГУ, 2004. – 60 с.

15. Попкова, К. В. Практикум по иммунитету растений: учеб. пособие / К. В. Попкова, З. П. Качалова. – М.: Колос, 1984. – 176 с.

16. Коновалов, Ю. Б. Селекция растений на устойчивость к болезням и вредителям: учебник / Ю. Б. Коновалов. – М.: Колосс, 2002. – 135 с.

17. Семена деревьев и кустарников. Методы фитопатологического анализа: ГОСТ 13056.5. – Введ. 30.06.1977 г. (с измен. № 1 от 01.07.1987). – М.: Гос. ком. по стандартам. – 86 с.

# СОДЕРЖАНИЕ

---

|                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ПРЕДИСЛОВИЕ .....</b>                                                                                                               | <b>3</b>  |
| <b>1. ОСНОВЫ ПАТОФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ .....</b>                                                                                         | <b>6</b>  |
| Лабораторная работа № 1. Изменение содержания<br>пигментов в листьях растений в связи с болезнью .....                                 | 6         |
| Лабораторная работа № 2. Изменение<br>интенсивности транспирации под воздействием<br>патологического процесса .....                    | 11        |
| <b>2. ОСНОВЫ ФИТОИММУНОЛОГИИ .....</b>                                                                                                 | <b>16</b> |
| Лабораторная работа № 3. Пероксидазная активность<br>здоровых и пораженных органов растений .....                                      | 19        |
| Лабораторная работа № 4. Изучение<br>фитонцидных свойств растений .....                                                                | 22        |
| Лабораторная работа № 5. Анатомо-морфологические<br>особенности растений и кислотность клеточного сока<br>как факторы иммунитета ..... | 25        |
| <b>3. ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ<br/>К ВРЕДНЫМ ОРГАНИЗМАМ И СПОСОБЫ<br/>ЕЕ ПОВЫШЕНИЯ .....</b>                                       | <b>30</b> |
| Лабораторная работа № 6. Отбор растений<br>по устойчивости к супрессорам фитопатогенов .....                                           | 31        |
| Лабораторная работа № 7. Отбор семян устойчивых<br>растений на основе морфологических признаков .....                                  | 35        |
| Лабораторная работа № 8. Оценка устойчивости<br>древесных растений к стволовым фитонематодам .....                                     | 38        |
| Лабораторная работа № 9. Оценка устойчивости<br>растений к дереворазрушающим фитопатогенам .....                                       | 45        |
| Лабораторная работа № 10. Определение<br>физиологической устойчивости древесных пород<br>к насекомым-фитофагам .....                   | 48        |
| Лабораторная работа № 11. Повышение устойчивости<br>растений к болезням различными методами .....                                      | 51        |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ .....</b>                                                                                                                | <b>57</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>                                                                                                                | <b>73</b> |

Учебное издание

**Звягинцев** Вячеслав Борисович  
**Ярмолович** Василий Александрович

**УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ  
К ВРЕДИТЕЛЯМ И БОЛЕЗНЯМ  
ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ**

Учебно-методическое пособие

Редактор *Е. И. Гоман*  
Компьютерная верстка *В. В. Терахович*  
Корректор *Е. И. Гоман*

Подписано в печать 31.03.2016. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.  
Усл. печ. л. 4,4. Уч.-изд. л. 4,6.  
Тираж 50 экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение:  
УО «Белорусский государственный технологический университет».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий  
№ 1/227 от 20.03.2014.  
ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.