

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ АГРОНОМИИ И ЭКОЛОГИИ

И.Н. Новосадов, Л.К. Дубовицкая, Ю.В. Положиёва

ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ СОИ

Учебное пособие
для обучающихся по агрономическим направлениям

Благовещенск
Издательство Дальневосточного ГАУ
2017

УДК 635.655.+ 632(075.8)
ББК 41.113.6+ 44.7

Рецензент –

Ольга Михайловна Рафальская,, вед. науч. сотр., канд. с.-х. наук.

Новосадов, И. Н. Диагностика болезней сои : учебное пособие / И. Н. Новосадов, Л. К. Дубовицкая, Ю. В. Положиева. – Благовещенск : Изд-во Дальневосточного ГАУ, 2017. – 62[1] с.

В пособии обобщены материалы о методах и учетах болезней сои, дана их характеристика, представлены методики выделения возбудителей из органов культуры, полевые обследования посевов, оценка болезнестойчивости на инфекционном фоне, видовой состав патогенов, таблица определения возбудителей, морфологические и биологические особенности пурпурного церкоспороза, обследование почвы на соевую цистообразующую нематоду, представлены рисунки, отражающие характерные признаки проявления болезней.

Предназначено для обучающихся по агрономическим направлениям при выполнении лабораторных работ по фитопатологии, научных сотрудников, аспирантов и студентов, выполняющих дипломные работы по болезням сои, для специалистов сельскохозяйственных предприятий при определении болезней.

Рекомендовано к изданию методическим советом факультета агрономии и экологии Дальневосточного государственного аграрного университета (Протокол № от)

Издательство Дальневосточного ГАУ
2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 БОЛЕЗНИ СОИ И ИХ СИМПТОМЫ ПРОЯВЛЕНИЯ	5
2 МЕТОДЫ УЧЕТА БОЛЕЗНЕЙ СОИ	21
2.1 Макроскопический метод	21
2.2 Диагностика корневых гнилей сои	23
2.3 Методы оценки на устойчивость к болезням на естественном и искусственном фоне.....	25
2.3.1. Подготовка инокулюма для искусственного заражения в полевых условиях	26
2.3.2. Инфекционный фон.....	33
2.4 Микроскопические и другие лабораторные методы исследования	35
2.4.1 Приготовление срезов на ультрамикротоме	41
2.4.2. Метод отпечатков Пфистерера.....	42
2.4.3. Методика выявления возбудителя бактериальной угловатой пятнистости из пораженных образцово и определение его патогенных свойств.....	42
2.4.4. Выделение фитопатогенных грибов из разных органов растения.....	45
2.4.5. Методики полевых обследований почвы и растений сои на нематоду	47
3 ВИДОВОЙ СОСТАВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ СОИ РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ	51
4 ОПРЕДЕЛИТЕЛЬ БОЛЕЗНЕЙ СОИ (по А.М. Овчиниковой (1971) [3].	53
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	61

ВВЕДЕНИЕ

Назначение диагностики состоит в том, чтобы без излишних затрат, но с достаточной полнотой собрать информацию, характеризующую: фенологию и состояние растений, пораженность болезнями, ожидаемые и фактические потери урожая, метеорологические условия года. Обработка полученных материалов должна быть нацелена не только на фиксацию состояния учитываемых объектов процессов, но и на прогноз их развития, так как быстротечная изменчивость состояния агроценозов поддается управлению только при возможности предвидеть эти изменения.

Учитывая, что конечная ценность собираемой информации зависит от возможности сопоставления данных по сезонам, годам и регионам, важнейшим условием организации диагностики является соблюдение единообразия используемых методов её сбора.

Болезни растений проявляются различно, причем часто одни и те же признаки болезни вызываются различными причинами как инфекционного, так и неинфекционного характера. Болезни растений органично связаны с растениеводством, земледелием, агрохимией. От технологии возделывания культур во многом зависит характер развития болезни: севооборот играет важную роль в процессе накопления возбудителей, дозы удобрений влияют на степень поражения растений.

Известно большое разнообразие болезней растений, однако его можно свести к незначительному количеству основных типов: увядание, пятнистости, изменение окраски, налеты, деформации, гнили. С момента проникновения возбудителя в ткань растения начинается их взаимодействие [1].

Для постановки окончательного диагноза нужно учитывать комплекс признаков:

- 1) внешние признаки больного растения в динамике;
- 2) изменение в строении больных тканей;
- 3) нарушение нормального течения физиологических процессов в растении;
- 4) причину болезни;
- 5) определение возбудителя болезни, его систематическое положение, биологию и экологию.

1 БОЛЕЗНИ СОИ И ИХ СИМПТОМЫ ПРОЯВЛЕНИЯ

Септориоз или ржавая пятнистость (*Septoria glycines*) появляется в начале вегетации на семядолях и простых листьях, иногда на первом тройчатом листе, в виде пятен. Они угловатые с окраской от красновато- до шоколадно-коричневой. На семядолях образуются сквозные пятна с валикообразными наплывами по периферии. Пораженные семядоли засыхают, сморщиваются и опадают. Помимо пятнистости семядолей и листьев, появляются и на бобах. Пятна на бобах почти не отличаются от пятнистости на листьях [2].

Нет выступающего экссудата, как при поражении сои бактериальной угловатой пятнистостью. При влажной погоде заражение с нижних ярусов распространяется выше по растению, однако не всегда достигает верхних листьев до фазы созревания (рис. 1).



Рис. 1. Септориоз тройчатого листа

Церкоспороз или округлая серая пятнистость (*Cercospora sojina*) на семядолях образует коричневые поверхностные пятна или сквозные язвы с темно-бурым ободком. С пораженных семядолей распространяется на примордиальные листья в виде нескольких пятнышек, а наиболее интенсивное развитие этого заболевания происходит на тройчатых листьях в фазу налива бобов. На листьях образуются округлые белесовато-серые пятна с резко выраженным

коричневым ободком, напоминающие глаз лягушки. С нижней стороны листьев при достаточной влажности на пятнах образуется темно-серый налет спороношения гриба. На стеблях фиолетово-красные пятна имеют вытянутую форму, позднее темнеющие с сероватым центром и коричневым ободком [2].

Зараженные семена характеризуются образованием двух типов пятен. В одних случаях они имеют неправильную округлую форму, выпуклые или поверхностные, мелкие или крупные с резким коричневым ободком, на одном зерне бывают от 1 до 2 пятен, иногда больше. В других образуются выпуклые темно-коричневые пятна без ясно выраженного ободка с расплывчатыми краями в виде подтеков (рис. 2).



А



Б



В

Рис.2. Церкоспороз: А –листьев, Б –стеблей, В – семян

Пурпурный церкоспороз сои. В Амурской области все большее распространение получает пурпурный церкоспороз сои, который ранее отмечался только за рубежом – в Китае, Корее, США, Японии, Германии, Франции, Африке, Бразилии, Венесуэле, Индии, Ираке, Колумбии, Новой Гвинее, Никарагуа, Новой Зеландии, Родезии, Пакистане, Тайване, Танзании, Югославии, Уганде [2]. В Приамурье впервые это заболевание было зафиксировано в 1998 году, но не идентифицировано и отмечалось как красная пятнистость. В настоящее время это заболевание все большее распространение получает в посевах сои, где отмечается поражаемость семян до 10 % и выше (рис. 3).



Рисунок 3. Пурпурный церкоспороз семян

Впервые биологические особенности этого гриба описаны в отечественной литературе А.М. Овчинниковой, (1971) [3]. Автор предупреждает, что в связи с расширенным обменом растительной продукцией, в том числе и семенами, самое серьезное внимание должно быть обращено на тщательный досмотр обменного материала, своевременное выявление и предупре-

ждение распространения этого опасного заболевания в посевах сои.

Cercospora kikuchii (MatsumotoTomoyasu) M.W. Gardner этот гриб известен как возбудитель пурпурного окрашивания семян и листьев сои (Purplestain cercospora blight). Данный патоген может находиться в оболочке семян и вызывать их окрашивание от розового до бледно- и темно-пурпурного цвета, область окрашивания может варьировать от точечных пятнышек до окраски оболочки всего семени (рисунок 3). Иногда инфицированные семена не имеют внешних признаков поражения. Развившиеся из таких семян проростки имеют недоразвитые семядоли, приобретающие пурпурную окраску и легко опадающие. Растения плохо развиваются и могут погибнуть, гриб сохраняется в виде мицелия в оболочке семян и на растительных остатках. Споры семядолей распространяются ветром и дождем на листья и стебли. На листьях развиваются мелкие пурпурные угловатые пятна неправильной формы, до 1 см в диаметре, впоследствии сливающиеся и приобретающие кожистый вид. Подобные пятна образуются на бобах. В дальнейшем инфекция распространяется по стеблю, в виде опоясывающих красновато-пурпурных некротизированных пятен, на молодых проростках пораженная ткань, вдавленная с беловато-розовым мицелием возбудителя. Развитию заболевания способствует высокая температура и влажность.

Вредоносность пурпурного церкоспороза заключается в снижении посевных качеств семян. По данным, зараженные семена снижают полевую всхожесть на 6 % и более, высоту растения – на 22,2 см, количество бобов в 1,6 раза и семян – в 2 раза. По данным S.T. Liu, количество больных семян в Китае достигало 12–62 % [4].

При изучении пораженных частей растений и семян во влажных условиях, установлено, что на них образуются пучки коленчатых коричневых конидиеносцев с конидиями. В начале мицелий светлый, со временем, коричневеет. Конидии возбудителя заболевания бесцветные, удлиненные, слабоизогнутые, у основания тупые, на вершине заостренные (38,8–445 x 1,3–6,1 мкм), с 2–49 перегородками (чаще 10–20 перегородок размером 50–265 x 3,5 мкм) (рис. 4).

На картофельно-глюкозном агаре колонии *Cercospora kikuchii* оливково-серые в центре и беловатые по краям. Воздушный мицелий плотный с глубокими складками, отходящими от центра. С обратной стороны цвет колоний варьирует, но чаще всего темно-пурпурный с розовыми краями [5].

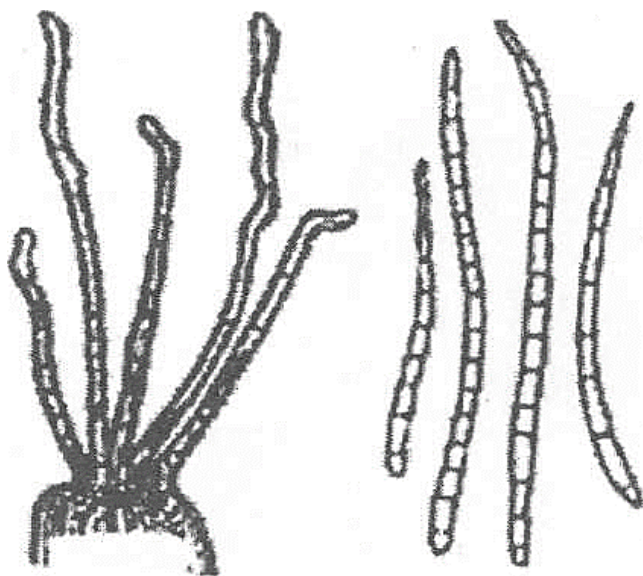


Рисунок 4. Морфологические признаки гриба (конидиеносцы и конидии гриба)

О распространении пурпурного церкоспороза сои, его биологических и морфологических особенностях и симптомах поражения в Приморском крае указывается в монографии Л.А. Дега [6].

В условиях Дальнего Востока **корневые гнили** наиболее вредоносны. Проявляются в течение всей вегетации от появления проростков и всходов до созревания семян. Имея сложную этиологию, приводит к загниванию корней и проростков, это в свою очередь ведет к пожелтению, засыханию листьев, боковых корешков, уменьшению количества клубеньков, растения легко выдерживаются, а при сильной степени поражения растения могут погибнуть [7].

Источниками инфекции являются: почва, семена и зараженные растительные остатки.

Корневую гниль сои вызывает комплекс грибов. Основными из них являются: *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Corynespora cassiicola*, *Cylindrocarpon destructans*, *Ascochyta sojaecola*. Доминирующим возбудителем в Амурской области является *Fusarium solani*[8].

Заражения грибами рода *Fusarium*, происходит как от больных семян, так и от почвенной инфекции. Кроме угнетенного состояния всходов, внешним отличительным признаком является появление на корешке коричневых и кармино-красных пятен, иногда проявляется размочаливание и водянистая гниль. По мере роста и развития растения пораженная ткань разрастается, инфекция распространяется на главный и боковые корни, вызывая побурение и загнивание. При сильном развитии болезни пораженная часть истончается, становится хрупкой, больные растения легко выдергиваются из почвы, образуют мало клубеньков [9].

Пораженная ткань ризоктониозной корневой гнилью имеет светло-коричневый цвет. В зависимости от развития болезни поражаются главный и боковые корни, стебелек и семядоли. При сильном поражении проростки зачастую ненормально развиты, без придаточных корешков, семядоли не раскрываются. Пораженная ткань размягчается, проросток увядает и гибнет, часть семени не прорастает.

Кориноспорозная корневая гниль проявляется на главном и боковых корешках в виде карминово-красных пятен. Они могут быть локальными или полностью охватывать корень. Корневая система постепенно отмирает, проростки отстают в росте и развитии, при сильном поражении погибают. Пораженные части покрываются черным бархатистым налетом спороношения грибов. Гриб продуцирует розовато-карминовый пигмент на картофельно-глюкозном агаре.

При поражении грибом коричневой гнили корневая система имеет темно-оранжевую окраску, несколько позднее – коричневую. Проростки отстают в развитии. Поражаются главный и придаточные корни и семядоли. На семядолях появляются коричневые, слегка вдавленные пятна округлой формы. На пораженных участках может обильно развиваться мицелий гриба [10].

Аскохитозная корневая гниль проявляется в виде расплывчатых овальных пятен на проростках. На участке в области прикрепления семени наблюдается чаще локальное поражение с побурением и загниванием, а затем подсыхает. На корнях образуются белые участки отмирающей ткани, на которой беспорядочно формируются пикниды гриба [2] (рис. 5).

**А****Б****В**

Рис. 5. Корневые гнили: А – аскохитозная, Б – ризиктониозная, В – фузариозная

Пероноспороз (*Peronospora manshurica*) распространяется через зараженные семена. Иногда налетом спороношения гриба покрываются простые листья. При локальной форме поражения на верхней стороне тройчатых листьев появляются пятна светло-зеленого цвета (к концу вегетации ткань пятен буреет и рвется). С нижней стороны листьев в местах поражений развивается серовато-фиолетовый войлочный налет спороношения гриба (рис.6).



А



Б

Рис.6. Пероноспороз: А – листьев, Б – семян

При диффузной форме поражения все листья и черешки покрываются сплошным войлочным налетом, растения значительно отстают в росте и зачастую не образуют бобов. При обеих формах поражения семена частично или полностью покрываются желтовато-серым, плотным мучнистым налетом. При локальной форме налет спороношения часто развивается и внутри створок бобов [2].

Бактериальная угловатая пятнистость или бактериальный «ожог» (*Pseudomonas syringae glycinea*) чаще всего встречается на листьях и проявляется вначале в виде мелких угловатых маслянистых пятен, просвечивающихся на свет. Постепенно пятна темнеют и к концу вегетации становятся буро-черными. Вокруг пятен наблюдается желтоватый ореол. При высокой влажности с нижней стороны пятен выступает желтовато-мутная жидкость (бактериальный экссудат). В сухую погоду она подсыхает и образует блестящие чешуйки. Со временем старые пятна выпадают, листовая пластинка продырявливается и разрывается [2] (рис. 7, 8, 9).



Рис. 7. Бактериоз семян



А



Б

Рис. 8. Бактериоз: А – листьев, Б – проростков



Рисунок 9. Бактериоз бобов

Белая гниль или **склеротиниоз** (*Sclerotinia sclerotiorum*) обычно развивается в фазу цветения – налива бобов. Листья становятся серовато-зелеными, буреют и отмирают. Стебель вокруг очага инфекции обесцвечивается. На пораженных участках стебля развивается белый ватообразный налет мицелия гриба, на котором формируются крупные склероции от округлой до неправильной формы. Вначале склероции имеют желто-серый цвет, затем постепенно темнеют до черного (рисунок 10).

Возбудитель белой гнили сохраняется мицелием на растительных остатках, семенах, склероциями – в почве или в виде примеси в семенах. При посеве семян склероции попадают в почву и сохраняют здесь жизнеспособность до 3-х лет. Заражение растений происходит кусочками грибницы или аскоспорами, образующимися в плодовых в плодовых телах при прорастании склероциев. При заделке на 6 см или более склероции погибают через 10–12 месяцев. Кроме сои, склеротиниоз поражает капусту, горох, фасоль и другие культуры.

Наиболее интенсивно заболевание развивается во влажную погоду в затененных местах при загущенной посадке [2].



А



Б



В

Рис. 10. Белая гниль (склеротиниоз):
А, Б – поражение стебля, В – склеротии (Б, В по Чэнь Цинэнь, 1987)

Оливковая пятнистость или **филлостиктоз** (*Phyllosticta sojaecolla*) заражает листья, иногда черешки и стебли. Развитие гриба начинается с образования очень мелких бесцветных точек на листе, постепенно разрастающихся в расплывчатые желтые, крупные пятна. Затем их окраска превращается в оливковую разных оттенков с неширокой бурой каймой. Со временем середина пятна несколько обесцвечивается. По краям листовой пластинки пятна могут сливаться, напоминая ожог. Развитие пятен зачастую ограничивается главными жилками, поэтому пятна становятся вытянутыми (до 2–4 см в длину и 1–2 см в ширину). От здоровой зеленой части пятна ограничиваются резкой черно-бурой каймой (рис.11).



Рис.11. Оливковая пятнистость (филлостиктоз) листьев

В периоды массового развития филлостиктоза, когда заболеванием поражается 50–75 % листовой поверхности растения, все поле приобретает мраморную расцветку листьев различных тонов: желтого, коричневого, оливкового и зеленого. При этом следует отметить одну особенность: даже при очень сильном развитии заболевания общего засыхания листьев не происходит, и преждевременный листопад, как при поражении септориозом, не наблюдается.

Заболевание переносят или способствуют его появлению на листьях сои некоторые виды тлей [2].

Аскохитозом (*Ascochyta sojaecola*) могут поражаться все органы сои. На листьях появляются светло-коричневые пятна округлой формы с темно-коричневым ободком. При отмирании ткани пятен просматриваются концентрические круги. Со временем центральная, более светлая часть пятна выпадает. На стеблях образуются удлиненные участки серовато-белесоватого цвета с пикнидами, а на бобах – углубленные бурые язвы с многочисленными пикнидами. При сильном поражении бобов их ткань становится трухлявой, разрушается; семена не развиваются вовсе или формируются мелкими, щуплыми, загнивают и покрываются белой грибницей [2] (рис. 12).

Антракнозом (*Colletotrichum glycines*) заражаются все надземные органы. При раннем заражении растений происходит отставание в росте, слабое ветвление. В таких случаях корневая система очень слабо развивается, и растения могут погибнуть в самом начале вегетационного периода.

При слабой степени поражения больные растения на общем фоне не выделяются, лишь в фазе налива бобов происходит побурение их листьев и затем полное засыхание. Бобы в большинстве случаев не образуют семян, или же они очень щуплые и мелкие. Пятна на бобах вначале мелкие, окаймленные бурым ободком, затем углубляются, увеличиваются в размерах и сливаются. К фазе налива бобов все органы растения буреют и покрываются обильным спороношением гриба – черными ложками со щетинками. Створки бобов разрушаются, и заболевание распространяется на семена, которые при увлажнении покрываются грязновато-серым мицелием и спороношением в виде черных лож (рис. 13).



А



Б



В

Рис. 12. Аскохитоз:

А – листьев, Б – бобов (Б по Чэнь Цинэнь, 1987), В – стебля

При позднем заражении на семенах отсутствуют признаки заболевания (или же появляются буроватые пятна), но это не исключает наличие под семенной оболочкой мицелия и хламидоспор гриба.

Массовому развитию антракноза способствует высокая относительная влажность воздуха, частые дожди [2].

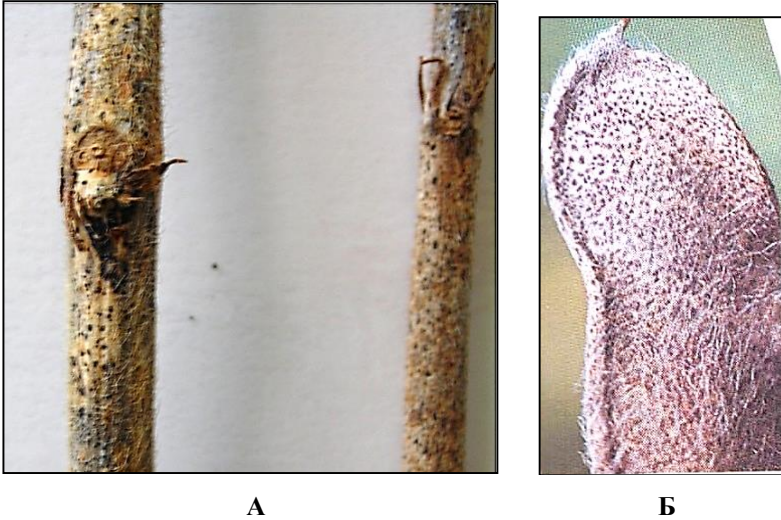


Рис. 13. Антракноз:
 А – стебля, Б – бобов (Б по Чэнь Цинэнь, 1987)

Вопросы для самопроверки

1. Симптомы проявления септориоза, возбудитель болезни.
2. Белая гниль сои, особенности биологии возбудителя, симптомы.
3. Какие отличительные признаки поражения бактериозом от септориоза, возбудитель болезни.
4. Признаки поражения пурпурным церкоспорозом.
5. Какие органы поражает аскохитоз, отличительные признаки при поражении листьев.
6. Какие условия способствуют массовому развитию антракноза, особенности проявления болезни на стеблях и бобах.
7. Какие типы корневых гнилей доминируют в условиях Амурской области, признаки проявления болезни.
8. Биологические особенности пероноспороза сои, какие органы поражает?
9. Зимующая стадия возбудителя белой гнили.
10. Признаки проявления на листьях оливковой пятнистости. Вызывает ли заболевание листопад?

2 МЕТОДЫ УЧЕТА БОЛЕЗНЕЙ СОИ

2.1 Макроскопический метод

Для правильной оценки, фитопатологического состояния посевов проводят маршрутные и детальные обследования, при которых учитывают распространение или частоту встречаемости болезни и интенсивность или степень поражения растений.

Маршрутные обследования осуществляют в период всходов, при цветении и перед уборкой. При оптимальных сроках посева сои болезни на семядолях должны учитываться не позднее, чем во вторую декаду июня, а на листьях учеты заканчиваются в первую декаду сентября. Своевременное проведение обследований очень важно. Оно обусловлено тем, что при более поздних сроках семядоли и листья отмирают, засыхают и опадают.

Растения во всех фазах развития просматривают непосредственно в поле. Если заболевания имеют нехарактерные внешние признаки или отсутствует спороношение, то пораженные части закладывают во влажную камеру. Для установления распространения заболеваний учитывают количество пораженных растений в поле. При равномерном распределении болезни пробы растений берут по одной диагонали поля. В случаях же неравномерного и слабого распространения – по двум диагоналям в виде буквы X или в шахматном порядке.

Количество и площадь обследуемых полей устанавливают в зависимости от общей площади культуры с таким расчетом, чтобы охватить наблюдением не менее 10 % ее посева. На площади до 10 га осматривают 100 растений (по 10 растений в 10 местах), до 25 га – 200 растений (по 10 растений в 20 местах), до 50 га – 300 растений (по 10 растений в 30 местах), до 100 га – 500 растений (по 10 растений в 50 местах). На каждые следующие 50 га осматривают дополнительно по 100 растений [1]. Тщательно исследуют и описывают симптомы болезни и характер ее развития в посевах: больные растения единичные, поражение носит очаговый характер, растения заражены по краю поля, затем детально описываются симптомы. Для пробы выбирают растения, как с начальными проявлениями болезни, так и с наиболее типичными симптомами [11].

Результаты учета болезней растений выражают следующими показателями: *распространение или частоту встречаемости болез-*

ни – количество больных растений, выраженное в процентах общего числа обследованных растений на участке определенной площади вычисляют по формуле:

$$P = \frac{n * 100}{N},$$

где *P* – распространение болезни, %;
n – количество больных растений;
N – общее число обследованных растений.

$$P_c = \frac{\sum SP}{S},$$

где *P_c* – средневзвешенный показатель распространения, %;
 $\sum SP$ – сумма произведения площади полей на соответствующий процент распространенности;
S – обследованная площадь.

Для характеристики проявления болезней, обуславливающих гибель растений или тех его частей, которые составляют урожай, в некоторых случаях достаточно одного показателя распространённости. Большинство же болезней сои приводят к снижению урожая в зависимости от степени их развития.

Степень развития болезни– качественный показатель болезни, он определяется площадью пораженной поверхности растения или отдельных его органов. Выражается в процентах или в баллах, для чего используют специальные условные шкалы. Наиболее распространена четырехбалльная шкала со следующими градациями:

Балл	Степень развития болезни на поверхности корня и листьях растения, %
0	0
1	1 – 10
2	11 – 25
3	26 – 50
4	свыше 50

Болезни на листьях сои учитывают в фазы цветения, налива бобов и регистрируют процент пораженных растений. При этом указывают характер поражения: полная или частичная гибель рас-

тений, сопровождающаяся сбрасыванием листьев, пониканием отдельных ветвей или же всего растения. Степень развития каждого заболевания вычисляют отдельно по следующей формуле:

$$r = \frac{\sum(ab) * 100}{NK},$$

где r – степень развития болезни, %;

$\sum(ab)$ – сумма произведений числа больных растений (a) на соответствующий им балл поражения (b);

N – общее количество просмотренных растений (здоровых и больных);

K – высший балл шкалы учета.

На основании данных учета распространения и развития болезни определяют размер ущерба, причиняемого ею. Прямой вред от болезней выражается в снижении урожая или его выбраковке вследствие низкого качества полученной продукции. Такие потери определяют по количеству (в процентах) погибших или не давших урожая растений [12].

В тех случаях, когда болезнь не приводит к гибели всего растения или его частей, составляющих урожай, ущерб устанавливают путем сравнения урожая здоровых и больных растений. Обычно потери выражают в процентах на учетную единицу (число растений, площадь). Расчет выполняют по формуле:

$$C = \frac{(A-a)*100}{A},$$

где C – потери урожая, %;

A – урожай здоровых растений;

a – урожай больных растений.

2.2 Диагностика корневых гнилей сои

Оценка сортов на устойчивость к корневым гнилям может осуществляться в течение года в лабораторных, вегетационных и полевых условиях.

В лабораторных условиях можно использовать экспресс-метод по оценке устойчивости сои к ризоктониозу и др. возбудителям корневой гнили [10].

Инфекционный материал получают в чашках Петри на соево-глюкозной (15 г соевой муки, 20 г глюкозы, 15 г агара) или картофельно-глюкозной (200 г картофеля, 15 г глюкозы, 15 г агара) средах. Питательная среда стерилизуется в автоклаве одноразово паром при 1 атм. в течение 40 мин. и разливается в стерильные чашки. Затем в стерильных условиях проводится посев чистых культур грибов микологическим крючком, который несколько раз проводят над пламенем горелки, берут на его конец небольшое количество культуры в виде конидий или кусочка мицелия и переносят уколами в среду. Чашки заворачивают в крафт-бумагу по 4–5 шт. и переносят в термостат для проращивания на 7–10 суток.

В качестве ложа для проращивания семян применяют рулоны из стерильной фильтровальной бумаги размером 18x100 см. Полосы фильтровальной бумаги нумеруют, погружают в чистую воду и дают стечь свободной воде. Семена сои дезинфицируют в 96%-м спирте в течение 1 мин., затем промывают в стерильной воде. Семена раскладывают по 50 шт. в одну линию на смоченные фильтровальные листы (двойные) с интервалом в 1 см на расстоянии 3 см от верхнего и боковых краев бумаги. Примерно на 1–1,5 см ниже семян раскладывают рядами полоски агара шириной 0,5–0,7 см, заросшие чистой культурой гриба, накрывают одним слоем фильтровальной бумаги. Поскольку при прорастании семена могут разрывать фильтровальную бумагу, то под нижний слой с наружной стороны подкладывают крафтовую полоску шириной 3 см.

Рулоны помещают в стаканы емкостью 1 литр и ставят в термостаты при температуре 22–24° С. По мере необходимости (на 3–4-е сутки) в стаканы подливают равное количество воды (50–100 мм).

Оценку на устойчивость к быстро растущим возбудителям фузариозной, ризоктониозной и питиозной корневой гнили проводят на 6–7-е сутки, медленно растущим возбудителям кориноспоровой и аскохитозной гнили на 10-е сутки. Использование рулонов из фильтровальной бумаги значительно упрощает техническую работу, снижает трудоемкость, сокращает сроки проведения работ и повышает точность оценки [10].

Вегетационные опыты в условиях теплицы проводят в сосудах по методике З.И. Журбицкого [13]. Грибы предварительно культивируют на питательных агаровых средах в течение 20 дней.

Для создания инфекционного фона семян перед посевом в почву вносят агаровые диски с культурой гриба или по 50 г мицелиальной массы соответствующего гриба, полученной размножением на стерилизованных зернах овса. Семена овса, взятые для заражения, стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 40–50 мин. в колбах емкостью 0,5–1 литр. Затем в колбы вносят чистую культуру гриба и выдерживают их в термостате при температуре 25°C в течении 10–15 дней. Инфекционный материал тщательно перемешивают с почвой и высевают семена сои, продезинфицированные в 0,5 % растворе марганцевокислого калия. Влажность в сосудах поддерживают в пределах 70 % от полной полевой влагоемкости [8].

Оценку на устойчивость к корневой гнили в полевых условиях лучше проводить в фазу 3-го тройчатого листа по общепринятой методике В.В. Котовой [14]. В более поздние периоды (цветение, налив бобов) в связи со значительным повреждением корневой системы личинками корневого минера и соевой цистообразующей нематодой пораженная ткань маскируется и диагностика затруднена.

2.3 Методы оценки на устойчивость к болезням на естественном и искусственном фоне

Развитие болезней в полевых условиях на естественном фоне учитывают в период всходов, цветения, налива и созревания бобов по методикам, разработанным для сои и других зернобобовых культур [3, 14, 15, 16].

На семядолях болезни определяют на 4–5-й день после появления всходов, на примордиальных листьях – после завершения их роста, на тройчатых листьях – в период максимального развития на них заболеваний. Это обычно совпадает с периодом конца налива бобов.

Важно своевременное обследование посевов. При запоздалых учетах пораженные органы отмирают, на них развиваются сапрофитные организмы. Это затрудняет выяснение причин гибели.

При оценке устойчивости растений к заболеваниям особое внимание следует обратить на продолжительность периода вегетации изучаемых сортов. Оценки необходимо проводить в несколько этапов. Вначале оценивают скороспелые сорта, затем среднеспелые и, наконец, позднеспелые.

Растения на всех фазах развития просматривают непосредственно в поле. При нехарактерных внешних признаках проявления заболевания, пораженные части закладывают во влажную камеру для последующего установления вида возбудителя болезни.

Распространение выражается в процентах, степень развития болезни характеризуется количеством пятен, язв, налета на пораженных органах (расчет описан выше).

Таблица 1

**Шкала для оценки поражения растений сои болезнями
(септориоз, пероноспороз, церкоспороз, аскохитоз, филлостиктоз
и другие)**

Степень развития болезни	Оценка		%	Иммунологическая характеристика
	по 5-бальной шкале	по классификатору ВИР		
Оч. слабое	1	1	1-10	УУ – высокоустойчивый
Слабое	2	3	11-25	У – устойчивый
Среднее	3	5	26-50	С – среднеустойчивый
Сильное	4	7	51-75	В – восприимчивый
Оч. сильное	5	9	75-100	ВВ – сильновосприимчивый

Глазомерную оценку степени развития фузариоза, проводят по шкале, сходной с той, которая приведена для листовых пятнистостей. В баллах отмечают процент растений с симптомами увядания.

К группе устойчивых растений относят образцы с баллами поражения 1–2 (1–3 по классификатору) и к группе восприимчивых – с баллами 3–5 (5–9 по классификатору) [15].

2.3.1. Подготовка инокулюма для искусственного заражения в полевых условиях

Для искусственного заражения растений требуется большое количество инфекционного материала. В связи с этим возникает необходимость в разработке наименее трудоемких способов приго-

товления инокулюма. Прежде всего, инфекционный материал должен отражать распространенную на данной территории популяцию патогена. Для заражения необходим свежий инфекционный материал или же хранившиеся споры, но с высоким процентом жизнеспособности.

Септориоз. В зависимости от объема заражаемого материала для приготовления суспензии возбудителя септориоза можно использовать споровый экссудат с пораженных органов или чистую культуру возбудителя.

Для сбора необходимого материала маршрутное обследование полей начинают с появления всходов сои. При максимальном развитии септориоза на семядолях их собирают и помещают в термостаты, во влажные камеры в чашки Петри (верхней стороной вверх) при температуре 24–26°C. Через 1–2 дня наблюдается появление обильного спорового экссудата грязно-белого цвета. Его собирают скальпелем или препаровальной иглой и смывают кисточкой в колбу с дистиллированной водой. Кроме семядолей для получения спороношения используют пораженные листья. После сбора их промывают в течение 30–40 минут под струей водопроводной воды и споласкивают дистиллированной водой, затем помещают во влажные камеры. В качестве влажных камер наиболее рационально использовать растильни, в которых промытые листья раскладывают нижней стороной на увлажненную фильтровальную бумагу и сверху закрывают продезинфицированными (96 % спиртом) стеклами. Растильни с листьями помещают в термостат при температуре 24–26°C. Через двое суток на листьях появляется экссудат гриба. Его собирают кисточками в колбы с дистиллированной водой. Для этих целей можно использовать также пораженные стебли сои. Их заготавливают осенью и хранят в зимний период под навесом или в сухом помещении. Для получения спороношения стебли закладывают во влажные камеры. Перед этим их стерилизуют 96 % спиртом в течение 3–х минут, затем несколько раз споласкивают в дистиллированной воде. Стебли во влажных камерах помещают в термостат при температуре 24–26°C. Через 2–3 суток ткань стебля размягчается, на его поверхности проявляется обильный серый споровый экссудат. Такие стебли переносят в колбу с дистиллированной водой и тщательно встряхивают. Содержимое процеживают в другую колбу через двухслойную марлю.

Для приготовления суспензии возбудителя из пораженных листьев, их дезинфицируют с обеих сторон ватой, смоченной в 96 % спирте и тщательно измельчают в фарфоровой ступке. Полученную растительную массу помещают в колбу с дистиллированной водой. Проще и намного производительнее использовать для этих целей гомогенизатор РТ-1, в котором измельчение тканей листа проводится в дистиллированной воде. Водную взвесь, измельченных тканей пораженных органов растений процеживают в колбу. При использовании такой суспензии затрудняется определение ее концентрации из-за наличия хлорофилловых зерен. Но, тем не менее, она позволяет проводить довольно успешное искусственное заражение растений.

Описанные выше способы дают возможность получать суспензии лишь в небольших объемах. Приготовить значительное количество инокулюма такими способами затруднительно, так как это связано с накоплением в больших количествах пораженных частей растений. Для этих целей обычно используют размножение чистой культуры возбудителя.

Для выделения возбудителя септориоза в чистую культуру следует использовать в качестве питательной среды картофельно-глюкозный агар в пропорциях:

очищенного картофеля	200 г
глюкозы	15 г
агара	20 г
50 % раствор лимонной к-ты	6 мл
вода	1000 мл

Во влажной камере на зараженных септориозом органах наблюдается обильное выделение спорового экссудата. Эту особенность возбудителя следует использовать при выделении его в чистую культуру. Наибольшего выхода спорового материала можно достигнуть при применении метода разлива. Для этого готовят споровую суспензию в пробирках 1–3 мл стерильной дистиллированной воды. Содержимое пробирки в стерильных условиях выливают в чашки Петри (с питательной средой) с таким расчетом, чтобы суспензия равномерно тонким слоем покрывала всю поверхность агара. Чашки Петри, засеянные возбудителем, выдерживают

в термостате при оптимальной для развития гриба температуре +25°C.

Через четыре дня на питательной среде наблюдается формирование мелких бурых кожистых колоний гриба. На десятый день агар в чашках Петри сплошь покрывается спороношением гриба с выделившимся грязно-белым экссудатом.

Для приготовления суспензии чистую культуру возбудителя из чашек Петри вместе с тонким слоем агара переносят в гомогенизатор РТ-1 или в фарфоровую ступку и измельчают до образования однородной серо-черной кашицы. Затем добавляют дистиллированную воду, тщательно взбалтывают и процеживают через двухслойную марлю или капрон. Приготовленную суспензию разбавляют дистиллированной водой. Для приготовления одного литра суспензии оптимальной для заражения концентрации требуется примерно 2–2,5 чашек Петри с чистой культурой возбудителя. Имея в наличии чистую культуру возбудителя септориоза можно быстро приготовить суспензию для заражения на инфекционном фоне. Быстрота приготовления суспензии, высокий выход спор, позволяют рекомендовать этот метод, приготовления инокулюма, как наиболее эффективный при оценке септориозо-устойчивости большого набора сортообразцов на инфекционном фоне.

Пероноспороз. Возбудитель пероноспороза является облигатным паразитом и может развиваться только на живых растениях. Поэтому накопление инфекции для искусственного заражения можно проводить только на растущих растениях сои. Для этих целей в теплице или в поле, изолированно от других посевов, выращивают сильно поражающиеся пероноспорозом сорта сои. Обязателен обильный полив почвы. Пораженные растения можно собрать и при маршрутных обследованиях производственных посевов. Особенно ценными при этом являются растения с диффузной формой поражения, листья которых сплошь покрыты налетом спороношения гриба.

При привлечении инфекционного материала важным моментом является время сбора конидий. Наблюдения показали, что конидии на пораженных листьях, в жаркие сухие дни, деформируются, а их содержимое переходит в состояние необратимого плазмолиза. На жизнеспособность конидий влияет не только температура, но и условия влажности предшествующего периода. Например, ко-

нидии, собранные после длительного сухого периода, оказываются нежизнеспособными. Наивысшей патогенностью обладают конидии, собранные через 14–20 часов после дождя. Поэтому пораженные пероноспорозом листья следует собирать после дождей или в пасмурную погоду в утренние часы (по росе). Листья с обильным налетом спороношения сразу используют для приготовления суспензии. Листья со слабым спороношением предварительно закладывают во влажные камеры для увеличения числа спор возбудителя. В качестве влажных камер обычно используют эксикаторы. Листья увлажняют водой и укладывают в эксикаторы послойно. Сосуды плотно закрывают крышками. Листья выдерживают во влажной камере 24–36 часов при температуре 18–19° С. Для приготовления суспензии возбудителя пероноспороза конидии гриба с листьев смывают кисточками в сосуды с дистиллированной водой.

Аскохитоз. Для искусственного заражения растений в полевых условиях необходимо в первую очередь использовать в качестве инокулюма инфекцию грибов из природных условий и штаммы возбудителя.

Размножение возбудителя аскохитоза можно проводить на гороховомагаре с глюкозой, стерильных семенах овса или стеблях донника белого, но выход спорового материала у 10–15 дневных культур больше, если размножение осуществлять на стерильных семенах какого-либо сорта овощного гороха.

Для одновременной оценки поражаемости аскохитозом большого числа линий или образцов можно накапливать инокулюм гриба на вегетирующих растениях восприимчивых сортов, выращиваемых изолированно в поле, теплице или лабораторной светостановке. Растения при этом выращиваются загущено и инокулируются в фазу бутонизации. Пораженные растения используются для приготовления рабочей суспензии спор.

Суспензию спор можно получать из соломы пораженных растений. Для этого солому измельчают, намачивают и выдерживают при температуре 22–24°С в течение 4 часов, а затем фильтруют через капрон.

При выращивании спор на питательной среде с поверхности агара (после 10-дневной инкубации культуры при 22°С) снимают верхний слой с пикнидами, помещают в фарфоровую ступку, растирают и затем фильтруют.

Для приготовления суспензии лучше использовать не дистиллированную, а водопроводную хлорированную воду, т.к. прорастание спор в ней происходит быстрее.

Искусственное заражение возбудителем аскохитоза оказывается более эффективно, если перед инокуляцией приготовленную суспензию пикноспор гриба выдержать в термостате при температуре 22–24° С в течение 3–4 часов. За этот период происходит набухание и прорастание спор.

Фузариоз. Оценку устойчивости сои к увяданию и гнили корней можно проводить на специально выделенном инфекционном фоне, который создается монокультурой в течение ряда лет, а также внесением чистой культуры гриба при весенней обработке почвы или перед посевом.

Для размножения чистой культуры возбудителей фузариоза применяют стерилизованные зерна пшеницы, овса, риса, семена гороха, сои. Для создания инфекционного фона в полевых условиях в почву вносят 20-дневную культуру гриба за 2–3 дня до посева из расчета 100 г инфекционного зерна или семян на 1 м².

В вегетационном опыте почву перед посевом стерилизуют в автоклаве в течение полутора часов при температуре 130°С (1,5 атмосфера), смешивают с чистой культурой гриба (100 г инфекционного зерна на 1 кг почвы), насыпают в вегетационные сосуды и через 2–3 дня проводят посев испытываемых образцов.

Церкоспороз. Для приготовления суспензии спор церкоспороза можно использовать пораженные вегетирующие растения. С этой целью вырезают пораженные участки листьев, помещают их в колбы с дистиллированной водой, тщательно встряхивают и процеживают через марлю. Накопление большего количества инокулюма можно провести на питательных средах, в частности, на картофельно-глюкозномагаре. Споры для посева можно брать с пораженных листьев или семян. Однако необходимо иметь в виду, что выделение патогена из семян лучше проводить сразу же после уборки или не позднее мая, июня следующего года, т.е. семян, хранившихся не более 8 месяцев.

Чистую культуру гриба целесообразно выделять заблаговременно, чтобы в нужное время была возможность для приготовления суспензии в больших количествах. Техника приготовления суспен-

зии возбудителя церкоспороза и филлостиктоза из чистой культуры такая же, как и суспензии септориоза.

Проверка жизнеспособности инокулюма. Для определения жизнеспособности конидий в суспензиях их прорастивают на предметных стеклах (по 10 капель исследуемой суспензии) во влажных камерах в чашках Петри. Для стимулирования прорастания конидий в капли суспензии добавляют кусочек (2–3 мм в диаметре) ткани листьев районированных сортов сои. Чашки Петри с каплями оставляют в термостате при температуре, оптимальной для развития возбудителей.

Время прорастания конидий у различных возбудителей болезней сои неодинаково. Так, подсчет проросших спор возбудителей церкоспороза и пероноспороза проводят через 3–4 часа, возбудителя септориоза – через 11–13 часов при 80-кратном увеличении микроскопа.

Подготовка инокулюма для заражения. Нецелесообразно использовать для заражения свежеприготовленную суспензию возбудителя септориоза или церкоспороза, так как энергия прорастания спор в такой суспензии сравнительно низкая. Это препятствует интенсивному развитию заболевания. Лучшие результаты заражения растений в полевых условиях получаются после суточного выдерживания суспензии при комнатной температуре. В случае неблагоприятных погодных условий для заражения можно хранить суспензию 2–3 суток в холодильнике при температуре +5°C. Выдерживание суспензии септориоза и церкоспороза более двух суток при комнатной температуре приводит к снижению эффективности заражения более чем в два раза.

Величина инфекционной нагрузки для искусственного заражения. Для многих возбудителей установлены определенные параметры инфекционной нагрузки. Различная инфекционная нагрузка может служить определенным критерием для выявления степени сортовой устойчивости растений.

Если ставится цель выявить иммунные образцы, то используют большую инфекционную нагрузку, которая способна преодолеть системы малых генов устойчивости и выявить степень защиты больших генов. Если в изучаемом генотипе, как отмечает Э.Э. Гешеле [17], существует только ограничение от наличия малых генов, то нужно ослаблять инфекционную нагрузку, с целью выявления

действия этих ограничителей заражения. При увеличении инфекционной нагрузки до оптимальной, возрастает интенсивность заражения и число очагов болезни. При превышении инфекционной нагрузки сверх оптимума в большинстве случаев число пораженных растений убывает. Причиной этого, вероятно, является взаимное угнетение конидий продуктами обмена веществ и недостаток питания.

Для выяснения влияния инфекционной нагрузки на интенсивность поражения испытаны различные концентрации спор возбудителей септориоза, церкоспороза и пероноспороза. Концентрация спор определялась в капле суспензии в поле зрения микроскопа при 80-кратном увеличении.

Выявлено, что при заражении возбудителем септориоза оптимальную инфекционную нагрузку дает суспензия с концентрацией 10 конидий. При дальнейшем увеличении концентрации интенсивность поражения не возрастает [15].

Наиболее эффективное заражение растений сои возбудителем церкоспороза происходит при использовании суспензии с минимальной концентрацией – три конидии. В этом случае гриб поражает растения на 100 % при степени развития 60 %. Для выявления высокоиммунных образцов можно увеличивать концентрацию суспензии церкоспороза до 20 конидий. В этом случае степень развития заболевания на районированных в Приморье сортах сои достигает 90 %. При дальнейшем увеличении концентрации интенсивность поражения несколько уменьшается.

Максимальная степень поражения растений пероноспорозом получается при заражении суспензией с концентрацией 30 конидий. В дальнейшем повышение инфекционной нагрузки увеличения поражаемости практически не наблюдается.

2.3.2. Инфекционный фон

Методы создания. Создание инфекционного фона накоплением инфекции путем насыщения почвы остатками пораженных растений или чистой культурой эффективен в отношении фузариозов, но применительно к возбудителям септориоза, церкоспороза и пероноспороза не обеспечивает интенсивного развития заболеваний в течение вегетационного периода. Почвенная инфекция способствует заражению всходов, а дальнейшее развитие этих болезней происходит вне связи с

ней и в значительной степени обуславливается иными причинами. Поэтому для таких заболеваний как септориоз, пероноспороз и церкоспороз четкая дифференциация сортов по устойчивости достигается лишь при инокуляции растений в определенные фазы развития сои.

Септориоз. Эффективное заражение септориозом происходит при инокуляции растений в фазы образования трех-четырёх тройчатых листьев и перед началом цветения. Двукратное заражение обеспечивает интенсивное развитие возбудителя септориоза, что дает возможность четко дифференцировать сорта по степени устойчивости к этому заболеванию. Наибольшая поражаемость растений сои септориозом наблюдается при последовательном заражении их возбудителем болезни во все фазы развития – от всходов до налива бобов. Однако многократное заражение очень трудоемкий процесс и может быть проведен лишь при небольшом объеме изучаемого материала.

Пероноспороз. Для дифференциации растений сои по устойчивости к этому заболеванию достаточно однократного заражения в период развития 3–4 тройчатых листьев.

Церкоспороз. Дифференциация растений сои по степени устойчивости к церкоспорозу достигается двукратным заражением их возбудителем заболевания. Первое заражение в фазе формирования 2–3 тройчатых листочков и второе – через 7–10 дней (период развития 3–4 листочков) после первого.

Создание провокационного фона путем обсева изучаемого материала восприимчивыми к церкоспорозу сортами (накопителями инфекции) обычно не способствует формированию оптимальной инфекционной нагрузки. Лишь в отдельные годы эпифитотий церкоспороза могут быть получены достоверные результаты по оценке поражаемости изучаемых сортов.

Организация инфекционного участка. В полевых условиях инфекционный фон целесообразно создавать на запольном участке, изолированном от других полей и расположенном на близком расстоянии от лабораторного здания. При заражении несколькими возбудителями изоляцию на инфекционном участке осуществляют посевом других вспомогательных культур или созданием отдельных участков. В качестве вспомогательных культур могут быть использованы овес, ячмень, гречиха и другие, которые к периоду образования 2–3 тройчатых листьев на растениях сои способны развивать зеленую массу, предохраняющую сортообразцы сои от перезаражения патогенами с других

участков. Вспомогательные культуры высевают в оптимальные для них сроки. Ширина защитной полосы из вспомогательной культуры должна быть не менее 10 м.

Заражение растений проводят в предвечерние часы для повышения эффективности заражения. Перед нанесением инфекции проводят обильный полив растений сои. Непосредственно перед заражением в споровую суспензию добавляют прилипатель ОП-7 из расчета 3–5 капель на 1 л суспензии. Обильный полив и добавление в споровую суспензию прилипателя позволяет получить эффективное заражение без трудоемкого приема по созданию влажных камер из полиэтиленовой пленки.

В связи с большим объемом заражаемого селекционного материала на инфекционном фоне, возникает необходимость в использовании техники, обеспечивающей высокую производительность и равномерное нанесение споровой суспензии на заражаемые растения. Эти требования могут быть выполнены при применении опрыскивателя – гидропульта типа ГШ–2. Он создает струю с мелким распылом жидкости. Экспериментально установлено, что в зависимости от облиственности растений расход рабочей суспензии на площади 0,01 га составляет 4–6 л.

Для оценки напряженности инфекционного фона, как и во всех иммунологических исследованиях, через 10–20 изучаемых образцов высевает стандарт – восприимчивый сорт. Инфекционный фон считается достаточно высоким, если стандарт имеет наивысшие баллы поражения (4–5). При более низких баллах поражения стандарта, результаты оценки ближайших к нему образцов считают недостоверными [15].

2.4 Микроскопические и другие лабораторные методы исследования

Многие грибы можно исследовать непосредственно под микроскопом без предварительной подготовки препаратов или срезов. Небольшие кусочки гриба исследуют невооруженным глазом или в стереоскопическом микроскопе, помещая в каплю воды на предметное стекло. Некоторые исследователи для приготовления препаратов используют 0,1 М раствор NaCl в дистиллированной воде. Покровным стеклом осторожно прикрывают препарат и придавливают его до нужного состояния. При малом увеличении покровное

стекло можно слегка сдвинуть для разделения частей наблюдаемого гриба [18].

Для устранения пузырьков воздуха в препарате можно вместо воды использовать следующий раствор:

глицерин – 10 мл
дистиллированная вода – 20 мл,
90%-ный этиловый спирт – 30 мл

Для таких препаратов иногда лучше применять вместо воды раствор Амана или лактофенола следующего состава:

молочная кислота – 20 г,
глицерин – 40 г,
фенол – 20 г,
дистиллированная вода – 20 мл.

Во время приготовления препарата из сухого материала применяют 2–10%-ный раствор КОН для его набухания. Если препарат слишком темный и недостаточно прозрачный, рекомендуется прокипятить его в 10%-ном растворе КОН.

Проращение спор, растущий мицелий и почкующиеся клетки удобнее наблюдать в висячей капле.

Препараты, приготовленные в воде и растворе Амана, можно сохранять в течение месяца, если края покровного стекла герметично закрыты. Для этой цели можно использовать смесь парафина и вазелина в отношении 1:1, бесцветный нитролак или другой быстро высыхающий лак.

Для фиксации препаратов грибов на предметных стеклах чаще всего применяют глицерин-желатиновую среду следующего состава:

желатин – 7 г,
дистиллированная вода – 42 мл,
глицерин – 50 мл,
фенол – 1 г.

Прокипяченная среда представляет собой в охлажденном виде чистую прозрачную желатиноподобную массу. Для каждого

препарата вырезают небольшой кусочек смеси, помещают на предметное стекло и расплавляют над пламенем горелки. Исследуемый кусочек гриба помещают в расплавленную каплю и в горячем состоянии покрывают покровным стеклом. Легким надавливанием лишнюю смесь удаляют из препарата. В таком виде он может храниться достаточно долго.

Препараты культур или спороношений грибов, обитающих на поверхности субстратов, обычно не требуют специального окрашивания, поскольку оно может помешать выявлению окраски гиф или спор, являющейся одним из признаков, используемых при их идентификации. Непосредственное наблюдение и изучение гиф грибов, растущих внутри субстрата (например, в тканях растения), затруднительно. В этом случае необходимо приготовление срезов и их окрашивание. Для окраски структур грибов внутри тканей растений наиболее удобен 0,05–0,1 %-ный раствор метиленового синего (cot-tonblue) в лактофеноле. Препараты метиленового синего в лактофеноле можно сделать прозрачными: легким нагреванием предметного стекла над небольшим пламенем.

Для выявления грибов в тканях животных или других субстратах применяют окрашивание реактивом Шиффа. Сущность метода заключается в следующем:

Фиксация: объект помещают на 20 мин. в метанол, затем промывают вначале этиловым спиртом, а затем проточной водой.

Окрашивание: препарат помещают на 20 мин. в 1 %-ный раствор HCl, а затем промывают, в проточной воде, после этого в течение 15 мин. окрашивают в реактиве Шиффа. Последний готовят, растворяя 0,5 г основного фуксина в 100 мл горячей дистиллированной воды и после охлаждения раствора до 50°C добавляют 5 мл 1 н соляной кислоты и 1 г метабисульфата калия. Раствор оставляют в темноте на один день. Если он не светло-желтого цвета, его фильтруют через активированный уголь. После окрашивания препарата реактивом Шиффа его раскрасивают дважды по 5 мин. в слабом растворе соляной кислоты и метабисульфата калия (0,5 г метабисульфата калия, растворенного в 0,05 н HCl). Затем препарат промывают проточной водой в течение 8 мин.

Контрастирующее окрашивание проводят в течение 1 мин. в растворе светло-зеленого красителя с последующим промыванием в проточной воде (краситель готовят, растворяя 1 г метило-

вого зеленого в 100 мл горячей 1%-ой уксусной кислоты). В результате окрашивания реактивом Шиффа элементы гриба будут окрашены темно-красным, а окружающие их ткани светло-зеленым.

В фитопатологической практике очень часто требуется установить наличие патогена внутри семян. В простейшем случае гриб можно наблюдать невооруженным глазом на их поверхности, например при значительном заражении семян *Peronospora manshurica* (рисунок 6 Б). Присутствие патогена на поверхности или внутри семян можно обнаружить с помощью влажной камеры, в которой патоген прорастает и спорносит. Грибы, проникающие внутрь семян, после поверхностного обеззараживания последних можно культивировать на соответствующей питательной среде непосредственным помещением целых семян или размельченных после гомогенизации частиц. При заражении семян возбудителями, вызывающими увядание или гниль, посев образцов семян в стерильную почву при соответствующей температуре может указать на наличие определенного возбудителя появлением симптомов или признаков заболевания. Указанные методы неприменимы для выявления всех заражающих семена патогенов отчасти потому, что некоторые из них не могут расти на искусственных питательных средах или для их развития требуется значительное время.

Иногда окрашивание грибов проводят для решения очень специфических задач, например для идентификации трудно определяемых видов.

При изучении микроскопических грибов, и особенно для определения их видов, важно выявить размеры их морфологических структур, спор, плодовых тел, конидиеносцев и т. п. Для этих целей применяют окуляр-микрометры. Диск микрометра чаще всего снабжен шкалой с делениями от 1 до 50. Стекланный диск помещают в окуляр микроскопа на плоский круг, вмонтированный в фокусе глаза наблюдателя. Измеряемый объект располагают таким образом, чтобы края измеряемой части располагались вдоль делений окуляр-микрометра. При этом легко можно установить, например, что диаметр споры при малом увеличении равен точно одному делению. Для измерения необходимо знать, скольким микронам соответствует каждое деление окуляр-микрометра. Это можно сделать определением цены деления окуляр-микрометраобъект-микрометром. Шкала объект-микрометра разделена на десятые и

сотые доли миллиметра. Наименьшее деление ее составляет точно 10 мк. Если одно деление шкалы окуляр-микрометра при малом увеличении микроскопа точно соответствует одному делению объект-микрометра при четкой фокусировке микроскопа, то одно деление окуляр-микрометра будет равно 10 мк. Таким образом, измеряемая нами спора будет иметь диаметр 10 мк. Определение цены деления нужно сделать для всех оптических комбинаций. Каждое изменение в увеличении ведет к изменению цены деления окуляр-микрометра. Мы должны точно знать соответствующий размер деления окуляра для каждой комбинации линз микроскопа. При этом в каждом случае необходимо, чтобы два любых деления окуляр-микрометра точно совпадали с двумя делениями объект-микрометра. Число делений объект-микрометра умножают на десять и делят на точное число делений окуляр-микрометра, которое совпадает с линиями объект-микрометра. Таким путем можно получить число микрон, равное одному делению окуляр-микрометра в каждом увеличении.

Измерения, проводимые винтовым окуляр-микрометром Филара, несколько отличаются от описанных выше. В этом случае перекрещенные нити в окуляре передвигают винтом вместе со шкалой. При движении расстояние, проходимое через поле зрения, можно определить непосредственно на шкале деления. При измерениях точка перекреста должна совпадать с одним концом споры. После регистрации положения шкалы винт подвинчивают назад до тех пор, пока перекрест не достигнет противоположного конца споры. После отметки этого положения на шкале можно вычислить из разницы двух значений расстояние между двумя измеренными точками или длину спор в окуляр-микрометре. Определение цены деления винтового окуляр-микрометра проводят с помощью объект-микрометра, описанного выше. Таким образом, путем передвижения винтом перекрещенных нитей при определенном увеличении можно подсчитать число микрон, соответствующее каждой шкале деления. Такие измерения должны быть проведены для каждой новой комбинации линз.

Определение плотности клеток или суспензии спор, т. е. числа отдельных микроорганизмов в ней, обычно проводят прямым подсчетом клеток или подсчетом на чашках после посева соответствующей суспензии спор с известным разведением. В последнем

случае по числу выросших через определенный период инкубации колоний из суспензии известного разведения можно подсчитать число жизнеспособных спор. Этот метод очень трудоемок и требует много времени. Поэтому необходимо проводить прямой подсчет клеток. Чаще всего применяют камеру или гематоцитометр Бюркера для подсчета кровяных телец (камера Горяева). Она представляет собой толстое предметное стекло с камерой для препарата площадью 9 мм^2 , глубиной $0,1 \text{ мм}$, вырезанным в стекле так, чтобы покровное стекло плотно притиралось к нему, обеспечивая толщину слоя воды $0,1 \text{ мм}$ в камере. Каждый квадратный миллиметр поверхности камеры под покровным стеклом содержит $0,1 \text{ мм}^3$ воды. Края квадрата камеры очерчены двумя линиями толщиной $0,2 \text{ мм}$ каждая. Центральный квадрат (1 мм^2) расчерчен на 25 больших и 16 малых квадратов. Основная площадь между двойными линиями – $0,04 \text{ мм}^2$. Площадь малого квадрата, образуемого перекрещиванием двойных линий толщиной $0,05 \text{ мм}$ каждая, составляет $0,0025 \text{ мм}^2$. Если толщина слоя жидкости $0,1 \text{ мм}$, то объем жидкости над каждым из 25 больших квадратов – $0,004 \text{ мм}^3$, а в каждом малом квадрате – $0,00025 \text{ мм}^3$. При подсчете числа спор или клеток, каплю суспензии следует помещать в угол покровного стекла для заполнения камеры так, чтобы избежать пузырьков воздуха и перетекания жидкости. Суспензия должна быть разведена так, чтобы в каждом большом квадрате площадью $0,2 \times 0,2 \text{ мм}$ находилось от 2 до 6 клеток. Число клеток подсчитывают по диагонали в 12 из 25 квадратов в двойной повторности и определяют среднее число клеток. Учитывая, что объем жидкости над каждым большим квадратом – $0,004 \text{ мм}^3$, можно рассчитать число клеток в 1 мл суспензии для взятого разведения по следующей формуле:

$$\text{среднее число клеток в одном большом квадрате} * \frac{1 \text{ мл}}{0,004 \text{ мм}^3}$$

или просто – среднее число клеток * 250 000.

Это число нужно умножить на исходное разведение суспензии, чтобы получить плотность исходной суспензии в виде числа клеток на 1 мл. Среднее число спор в малом квадрате рассчитывают, исходя из его площади $0,05 * 0,05 \text{ мм}$. Например, для того чтобы получить число клеток в 1 мл исходной суспензии, плотность бактериальной суспензии умножают:

среднее число клеток в малом квадрате * $\frac{1 \text{ мл}}{0,00025 \text{ мм}^3}$
или просто – среднее число клеток *4 000 000,

получаем плотность исходной суспензии в виде числа клеток на 1 мл.

Микроскопические и лабораторные методы исследований представлены по З. Кирай, З. Клемент [18].

2.4.1 Приготовление срезов на ультрамикротоме

Для микротомирования препарат специально обрабатывают (для получения блоков), обезвоживают, пропитывают и заливают метакрилатами (*n*-бутилметакрилатом или *n*-метилметакрилатом), которые легко проникают в различные ткани и клетки, хотя иногда искажают вид отдельных структур. Метакрилаты ядовиты, поэтому с ними работают под вытяжкой; хранят в холодном темном месте. Для заливки пригодны лишь метакрилаты без примеси гидрозинона (ингибитор).

Хорошие ультратонкие срезы получают при использовании блоков, твердость которых соответствует твердости объекта. Твердость полимеров метакрилата можно регулировать, добавляя к *n*-бутилметакрилату *n*-метилметакрилат (обычно в соотношении 4:1). Если готовят препараты тонких гиф, соотношение *n*-бутил- и *n*-метилметакрилатов составляет 9:1. Катализатором полимеризации служит 2%-ный спиртовой раствор перекиси бензоила, который хранят в темноте, а перед употреблением тщательно высушивают на фильтровальной бумаге в эксикаторе или термостате при 37° С в течение 15–30 мин. После добавления перекиси бензоила раствор полимеризуется при комнатной температуре, но этот процесс длится несколько суток. Поэтому обычно полимеризацию проводят в термостатах при температуре 45–60° С в течение 12–18 ч. Последовательность заливки объектов: после обезвоживания сливают последнюю порцию спирта и в тот же сосуд добавляют смесь для полимеризации – сначала пропитывают чистыми метакрилатами, затем метакрилатами с перекисью бензоила и меняют эти растворы каждые 30 мин. После этого объекты помещают в желатиновые капсулы № 1 или 2 (диаметрами 5 или 6,5 мм), доверху наполненные смесью метакрилатов с перекисью бензоила. Капсулы закры-

вают крышками, помещают в стойки и ставят в термостат. После окончания полимеризации капсуле извлекают из термостата, с них снимают крышки, верхние части блоков отрезают лезвием и выбрасывают, так как они обычно плохо полимеризованы. На блоках делают необходимые надписи специальными чернилами (2 г танина, 30 мл воды, 1 г фуксина и 30 мл 36%-ного спирта), складывают и микротоммируют [12].

2.4.2. Метод отпечатков Пфистерера

На предметное стекло наносят каплю стерильной воды, вносят в нее скобок из спороношений с незначительным количеством спор и оставляют на 3–5 часов для набухания (препараты некоторых видов грибов помещают в термостат). После испарения воды препарат подсушивают на воздухе, лучше всего на батарее, но не на пламени, так как в этом случае можно пережечь содержимое спор. На пластинки ацетобутирата толщиной не больше 0,2 мм, вымоченные в смеси 70%-ного спирта и ацетона (10:3), переносят разбухшие и подсушенные споры и прессуют их в течение 1–3 мин. до полного высыхания пластинки. Помещают пластинку со спорами в струю воды и осторожно промывают мягкой кисточкой. Пластинку подсушивают и напыляют кварцем перпендикулярно ее плоскости, покрывают слоем растопленного парафина толщиной 1 мм для предохранения препарата от повреждения при отмывании ацетобутирата. Затем растворяют ацетобутиратовую пластинку в метилацетате так, чтобы остался только участок с отпечатками спор, покрытый кварцем и парафином. Парафин растворяют в толуоле до полного исчезновения. Кварцевый отпечаток, даже если он разломан, переносят на сетки, подтягивают металлом, как обычно, и просматривают [12].

2.4.3. Методика выявления возбудителя бактериальной угловатой пятнистости из пораженных образцово и определение его патогенных свойств

Образцы пораженных растений для анализа собирают во время обследования посевов. Желательно анализировать свежий материал, так как из долго хранившихся образцов бактерии выделяются хуже или совершенно не выделяются. Из больших частей растения вырезают небольшие кусочки на границе здоровой и пораженной

ткани. Кусочек ткани промывают под струей проточной воды (10–15 мин.) и ополаскивают стерильной водопроводной водой. Подготовленные таким образом кусочки ткани растирают в стерильной ступке с каплей стерильной водопроводной воды до получения однородной массы. Стерильной петлей каплю кашицеобразной массы наносят на застывший картофельный агар (в чашки Петри), проводя посев штрихами от правой стороны чашки к левой. Засеянные чашки Петри дном вверх помещают в термостат при температуре 23–25° С и выдерживают 28 дней. Затем чашки просматриваются и колонии бактерий, которые по форме, цвету и характеру роста соответствуют определенному возбудителю, отсеиваются в пробирки со скошенным картофельным агаром для дальнейшего изучения [19].

Для выделения возбудителя из семян можно использовать следующий метод. Семена или створки бобов с бактериальными пятнами помещают во влажную камеру, через 4–5 ч. на их поверхности образуется бактериальная слизь в виде желтоватых или белых капель. Затем стерильной петлей каплю слизи наносят на поверхность картофельного агара в чашки Петри, где производят посев (как описано выше). Похожие на возбудителя бактерии отсеиваются на косяки с картофельным агаром для определения патогенных, культурально-биохимических свойств.

Необходимым условием для определения вида у выделенных культур является выявление у них способности вызывать патологический процесс у растения-хозяина. Для определения патогенных свойств изолированными бактериями производят заражение различных органов взрослых растений и заражение семян. При этом большое значение имеет комплекс условий внешней среды (температура, влажность воздуха, фаза развития растений, зараженный орган).

Для более быстрого получения результатов проверки патогенных свойств проводят заражение с предварительным поранением. Следует учесть, что старые листья обычно более устойчивы к инфекции. Наименьшая устойчивость у растений отмечается в 13–15 часов дня. Искусственное заражение в полевых условиях, а также в лаборатории и оранжерее следует проводить в наиболее уязвимый орган растений: на ранних стадиях развития – листья, на более поздних – бобы.

Для заражения листьев на нижнюю поверхность листовой пластинки стерильной пастеровской пипеткой наносят по капле бактериальной взвеси. Бактериальную взвесь готовят по стандарту изодно-двухсуточной культуры из расчета 1 млрд./мл бактериальных клеток. Затем делают легкий прокол листовой пластинки в местах каплей тремя иголочками, скрепленными на стержне в виде правильного треугольника, или шприцом. При отсутствии игл и шприцов заражение делают при помощи стерильного ватного тампона (небольшое количество ваты наматывают на палочку или спичку). При определении у возбудителя способности поражать сосудистую систему растения (вызывать его увядание), каплю бактериальной взвеси наносят на центральную жилку листовой пластинки, на черешок листа или стебель, а затем делают укол на месте нанесения капли. В пазухе листа можно оставлять тонкий стеклянный капилляр (от пастеровской пипетки), заполненный бактериальной взвесью изучаемых бактерий. Опрыскивание растений суспензией бактерий применяется реже, так как значительно удлиняет время проявления видимых признаков инфекции.

При проведении таких опытов необходимо иметь контрольные растения, равноценные с опытными по состоянию и фазе развития, на которые вместо бактериальной взвеси наносят капли стерильной водопроводной воды и делают уколы точно так же, как и при заражении бактериями.

При определении патогенных свойств, следует соблюдать правила стерильности инструмента: иглы для заражения следует опускать в спирт и прожигать над пламенем, пастеровские пипетки и шприцы для каждого штамма должны быть свежие и стерильные. Руки после каждого заражения моют в воде, протирают этиловым 70%-ным спиртом.

У бактерий, проявивших патогенные свойства, изучаются культурально-биохимические свойства, что дает возможность идентифицировать возбудителя [19].

2.4.4. Выделение фитопатогенных грибов из разных органов растения

В большинстве случаев необходимы специальные методы выделения грибов, связанные с особенностями их биологии и свойствами субстрата.

Поверхностную стерилизацию органов растения применяют для освобождения от флоры, находящейся на их поверхности. Для стерилизации используют сулему в разведении 1:1000 (исследуемый объект погружают в раствор на 1–2 мин. и затем многократно промывают водой), формалин в разведении 1:300 (объект погружают в раствор, а затем выдерживают в парах формалина в течение 30 мин. – 2ч.); 0,1–1%-ную бромную воду (исследуемый объект погружают в раствор на несколько секунд); 3%-ную перекись водорода; 2 %-ный раствор марганцовокислого калия (объект выдерживают в растворе в течение 1–5 мин. и многократно промывают стерильной водой). Выбор концентрации дезинфектора и экспозиции зависит от целей исследования и характера исследуемого материала.

Для освобождения от посторонних организмов, главным образом от бактерий, посеvy исследуемых грибов и первичное выделение культур производят на средах с рН 4,0 с добавлением в среду для посева антибиотиком с широким спектром антибактериального действия (стрептомицин и др.).

Метод влажной камеры и его модификации применяют для выделения чистой культуры гриба. В стерильные чашки Петри кладут 2–3 кружка стерильной фильтровальной бумаги, увлажненные стерильной водой (реже жидкой питательной средой). Исследуемый материал, чаще после поверхностной дезинфекции, помещают в чашку и ставят в термостат при соответствующей температуре. За ростом грибов наблюдают под бинокулярной лупой при 20–50 кратном увеличении. При этом представляется возможным выделить из мицелия гриба или его спороношения чистую культуру и в ряде случаев при микроскопировании определить его вид. Пользуясь методом влажных камер, можно создавать различные условия влажности, а при исследовании материала с достаточной влажностью, например, зеленых частей растений, наблюдать за ростом грибов, не увлажняя фильтровальную бумагу в чашке Петри. Этим методом можно также дифференцированно исследовать разные ча-

сти изучаемого материала и выделять из них грибы, так как в начальные периоды грибы растут гнездами, скудно и их выделение не представляет затруднений [12].

Корень. При поражении растений зернобобовых культур фузариозной корневой гнилью изоляцию возбудителей проводят непосредственно из пораженных органов. При этом свежевыкопанные больные корни или прикорневые части растения тщательно промывают под струей водопроводной воды, а затем хорошо обсушивают между слоями фильтровальной бумаги. После чего пораженные части растений подвергают поверхностной дезинфекции и высевают на питательную среду (сусло-агар, картофельный агар и др.) или закладывают во влажную камеру и ставят в термостат при температуре 26° С. Наблюдение за ростом грибов и их выделение производят через 24–48 ч. и в последующие дни роста. При образовании мицелия на пораженных органах его пересевают в чашки Петри с питательной средой или в пробирки.

Для дезинфекции применяют различные вещества. Этиловый спирт – в концентрации 70 %, при этом объект погружают в раствор на 60 секунд, а затем многократно промывают стерильной водой. Формалин используют в обычной концентрации (1:300), выдерживают в растворе кусочки пораженных растений 30 минут. После чего их тщательно промывают. Марганцовокислый калий применяют в 0,5%-ной концентрации с экспозицией в 20 минут.

Можно производить выделение гриба непосредственно из пораженной ткани без предварительной дезинфекции. В таких случаях растения должны быть тщательно промыты под струей водопроводной воды (в течение нескольких часов) и хорошо просушены между слоев фильтровальной бумаги, что снижает развитие сапрофитной бактериальной флоры. Затем прокаленным скальпелем отрезают небольшой кусочек пораженной ткани на границе со здоровой и быстро, перенося его над пламенем спиртовки, помещают на питательную среду – картофельный или сусло-агар со стрептомицином (100 мг/л), в чашки Петри. После того, как на пораженных частях растения или среде появится белый или бело-розовый мицелий гриба, его пересевают в пробирки. Выделенные в чистую культуру грибы определяют на 15-й день, по Билай [20], после культивирования их на стандартной питательной среде (сусло-агар) [14].

Сосудистая система. Стебли и корни отмывают от почвы, стерилизуют поверхностно, прокаленным скальпелем разрезают стебель поперек на расстоянии 5–15 см от корневой шейки и небольшой участок пораженного, побуревшего сосуда высевают на поверхность кислого сушеного агара; отдельные кусочки ткани помещают во влажную камеру [12].

Стебли и листья. В ряде случаев грибы можно выделить не только из свежего материала, но и из гербарных образцов. Необходимым условием при сборе для этих целей является немедленная фиксация гербарного материала высушиванием, а также предохранение от заражения посторонней микрофлорой. Наиболее приемлемый метод приготовления гербарного материала – немедленное помещение листьев, стеблей или их частей в стерильный пакет из фильтровальной бумаги и высушивание их в этом пакете. После высушивания листьев пакет помещают во второй пакет, также стерильный, но из более плотной бумаги. В таком виде материал можно хранить до исследования.

Материал помещают во влажную камеру, образцы просматривают под бинокулярной лупой. Выделение грибов производят через сутки и более [12].

Семена. При выделении видов грибов, развивающихся во внутренних тканях семян, пользуются в основном методом влажной камеры. Семена после поверхностной дезинфекции укладывают на фильтровальную бумагу с интервалом 1 см; из одной исследуемой партии семян среднего образца берут 100 семян. При этом следует принимать во внимание зараженность грибами и их пораженность. Зараженность определяют числом грибных зародышей в определенном количестве семян; пораженность характеризуется степенью роста тех или иных видов грибов и поражения ими исследуемого субстрата. Зараженность определяют путем посева, смыва определенной навески семян и последующего пересчета количества грибных организмов на единицу их массы [12].

2.4.5. Методики полевых обследований почвы и растений сои на нематоду

Наиболее тщательные обследования следует проводить на особо опасного паразита сои – соевую цистообразующую нематоду (рис.14).

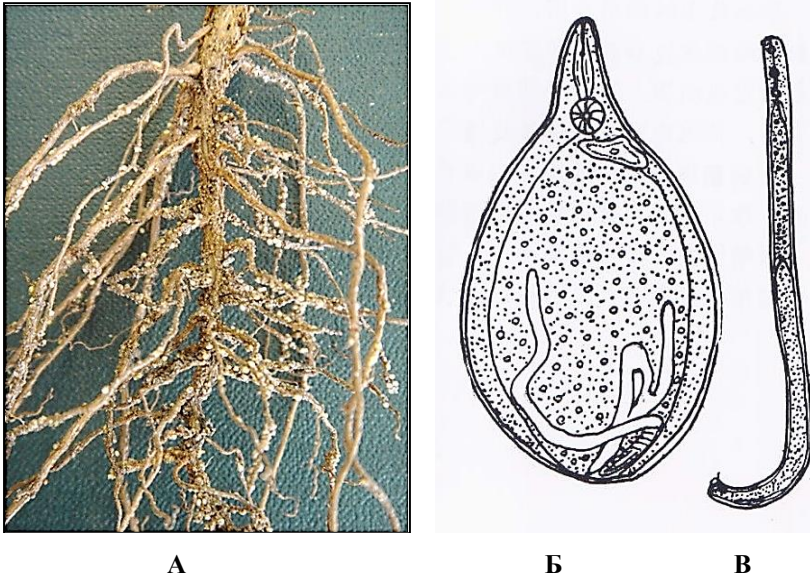


Рис. 14. Цистообразующая нематода:
 А – цисты на корнях, Б – самка, В – самец (Б, В по Чэнь Цинэнь, 1987)

Обследования проводят в первую очередь на посевах с угнетёнными, больными растениями методом отбора и анализа корневых проб в период начала фазы цветения, когда на пораженных корнях хорошо видны овальные самки молочно-белого цвета. Можно обследовать растения выборочно, отбирая отдельные экземпляры с резко выраженными симптомами гетеродероза, или обследовать всё поле маршрутным методом. При этом на каждом гектаре обследуемой площади отбирают в 50 местах через одинаковые интервалы по одному растению сои. Корни выкапывают очень осторожно, чтобы не осыпались самки нематод. Общее число растений для микроскопического анализа – 50 штук с одного гектара. Корни вместе с прикорневой почвой отрезают от надземной части и помещают в полиэтиленовый мешочек.

Обследование на выявление очагов нематоды в почве необходимо проводить сразу после уборки сои до поднятия зяби. На полях, засевавшихся соей в прошлые годы, можно отбирать сапреля по октябрь.

На обследуемом участке пробы почвы следует брать по равномерной квадратной или прямоугольной сетке в зависимости от площади участка с таким расчётом, чтобы на каждую пробу приходилась примерно одинаковая площадь. Крайние ряды проб рекомендуется располагать на расстоянии 0,5–2 м от границы участка в зависимости от его размеров и формы. На каждом гектаре обследуемой площади через одинаковые интервалы отбирают 50 проб примерно по 100 г каждая. Почвенные пробы берут буром с глубины 0–20 см, 50 исходных образцов сыпают на утрамбованную площадку, тщательно перемешивают, отбирают 1000 г почвы и помещают в полиэтиленовый мешочек. Пробы, собранные с одного поля, упаковывают в один пакет и карандашом заполняют учётную карточку. Затем пакет доставляют в лабораторию для анализа [21].

При переходе с одного поля на другое инструменты, обувь необходимо тщательно очистить или отмыть от приставшей к ним почвы, чтобы не разнести заражение на другие поля.

Анализ корневых и почвенных проб на зараженность соевой нематодой

Выделение нематод из корней. Корни помещают в стакан, ёмкостью 0,5–1 л, и заливают на 1–2 часа водой, чтобы очистить их от налипших частиц почвы. Промытые корни режут на кусочки, длиной 3–5 см, помещают в чашки Петри и под бинокулярной лупой подсчитывают имеющиеся на них цисты. Полученный в стакане осадок также анализируют на содержание цист.

Выделение нематод из почвы. Для анализа почвы на цистообразующих нематод при отсутствии специальных приборов можно использовать более простой и доступный метод. Необходимо иметь фильтровальную бумагу или капроновую сетку, набор сит, стаканы ёмкостью 0,5–1 л, воронку, стеклянную палочку.

Отобранные средние пробы просушивают до воздушно-сухого состояния на воздухе или в термостате при температуре не выше 40°C. Предварительно размельченную сухую почву (1000 г) просеивают через сито с диаметром отверстий 2–4 мм для удаления крупных частиц различных примесей. После просеивания пробу тщательно перемешивают и выделяют из неё пять навесок, весом 100 г каждая. Затем каждую навеску отдельно высыпают в литровый стакан, заливают водой на 2/3 объёма, тщательно перемешивают палочкой и в течение 3 минут отстаивают взвесь. После этого её пропускают через набор сит: на верхнем сите (3 мм) задержива-

ются растительные остатки, а на нижнем (0,25 мм) цисты. С нижнего сита делают смыв в химический стакан и сливают на фильтр, вложенный в воронку, затем фильтр снимают, подсушивают, режут на ленты и при помощи бинокля по краям фильтра находят цист[21].

Разработка плана защитных мероприятий предшествует обнаружению очагов нематоды в почве, а также составление многолетнего и сезонного прогнозов ее численности.

Для биологического обеззараживания почвы вводят 6–8-польный севооборот с фитосанитарными культурами. По данным Н.Н. Кравцовой, И.Б. Кожушко [22, 23], кормовые культуры обладают очищающим эффектом, в связи с чем донник снижает плотность нематоды в почве на 73 %, кострец безостый на 71, рапс на 88, редька масличная на 80, пайза на 75, суданская трава на 74, люцерна желтая на 75, тимофеевка луговая на 74 %.

Весьма эффективное возделывание устойчивых сортов и их региональное размещение с учетом расового состава возбудителя.

В особо опасных очагах применяют комплекс мероприятий, учитывая примерную биологическую эффективность отдельных приемов, %:

- севооборот, фитосанитарные культуры (60 %);
- устойчивые сорта (80 %);
- устойчивые сорта + нематодцид (95 %).

По окончании работы на зараженных нематодой участках технику следует тщательно смыть водой от прилипшей почвы, которая является передатчиком возбудителей на другие поля [2].

Вопросы для самооценки

1. Как проводится обследование полей и отбор проб при учете болезней, какие формулы используются?
2. Шкала оценки растений на устойчивость.
3. Как подготовить инокулюм к заражению растений в полевых условиях?
4. Как выделить возбудителя бактериоза из пораженных образцов?
5. Выделение возбудителей на семенах.
6. Как провести анализ корневых и почвенных проб на зараженность нематодой?

3 ВИДОВОЙ СОСТАВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ СОИ РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ

На сое встречается около 120 грибных заболеваний, из которых в России и на Дальнем Востоке зарегистрировано около 30 видов. Кроме того, сою также поражают бактерии и вирусы.

Из грибных болезней сои наиболее опасны фузариоз, альтернариоз, белая гниль (склеротиниоз), септориоз, корневые гнили. Распространение болезней во многом зависит от экологических факторов, и в разных агроклиматических зонах их проявление бывает частым или периодическим [2, 24].

Таблица 2

Болезни сои, распространенные на Дальнем Востоке [2]

Грибные болезни	
Класс	Phycomycetes
1) <i>Peronospora manshurica</i>	всходы, семена, листья, стебли, бобы
2) <i>Rhizopus nigricans</i>	семена
Класс	Ascomycetes
1) <i>Mycosphaerella phaseolicola</i>	листья
2) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	семена, стебли, бобы,
Класс	Basidiomycetes
1) <i>Phakopsora vignae</i>	листья
Класс	Fungiimperfecti
Порядок <i>Hypphales</i>	
1) <i>Alternaria brassicae</i>	листья
2) <i>Alternaria tenuis</i>	семена, листья
3) <i>Botrytis cinerea</i>	семена, всходы, стебли
4) <i>Cercospora sojae</i>	семена, листья, стебли, бобы
5) <i>Cercospora kikuchii</i>	семена, листья, стебли, бобы
6) <i>Cladosporium herbarum</i>	семена
7) <i>Dendryphion sp.</i>	корни
8) <i>Epicoccum neglectum</i>	семена, листья
9) <i>Fusarium avenaceum</i>	семена
10) <i>Fusarium gibbosum</i>	семена
11) <i>Fusarium oxysporum</i>	вилт (трахеомикоз)
12) <i>Fusarium semitectum</i>	семена
13) <i>Fusarium solani</i>	семена, всходы, корни

14) <i>Fusarium sporotrichiella</i>	семена
15) <i>Gliocladium roseum</i>	семена, всходы, корни, бобы
16) <i>Isariopsis griseola</i>	листья
17) <i>Periconia pycnospora</i>	листья
18) <i>Trichothecium roseum</i>	семена, бобы, стебли
Порядок <i>Melanconiales</i>	
1) <i>Colletotrichum truncatum</i>	семена, всходы, стебли, бобы
Порядок <i>Pucciniales</i>	
1) <i>Ascohyta sojaecola</i>	семена, листья, бобы, стебли
2) <i>Macrophomina phaseoli</i>	семена, листья, стебли, корни
3) <i>Phomopsis sojae</i>	стебли, бобы
4) <i>Phomopsis sojaecola</i>	листья, всходы, бобы
5) <i>Septoria glycines</i>	семена, листья, всходы, стебли, бобы
6) <i>Sclerotium bataticola</i>	семена, корни, стебли
Бактериальные болезни Дальнего Востока (по Г.Ф. Солотчиной, 1971) [2]	
1) <i>Pseudomonas glycinea</i> - Coerper	бактериальная угловатая пятнистость или бактериальный ожог
2) <i>Xanthomonas phaseoli</i> var <i>sojense</i> (Hedges) - Starr and Burkholder	пустульная или ржаво-бурая пятнистость (Приморье)
Вирусы по Л.А.Дега [6]	
1) <i>Soja virus 1</i> , Sm.	вирус мозаики сои
2) <i>Phaseolus virus 2</i>	вирус желтой мозаики фасоли
3) <i>Soybean stunt virus</i>	вирус задержки роста
4) <i>Nicotiana virus 12</i>	вирус кольцевой пятнистости табака или некроз верхушечной почки

4 ОПРЕДЕЛИТЕЛЬ БОЛЕЗНЕЙ СОИ (по А.М. Овчиниковой (1971) [3].

1(4). Поражены всходы, на которых образуются пятна или язвы.

2(3). На пятнах или язвах налет.

а) язвы образуются с верхней или нижней стороны семядолей с беловато-розовым ватообразным или розовато-оранжевым восковидным налетом, состоящим из многочисленных веретеновидно-серповидных слабоизогнутых конидий от 0 до 4, но чаще всего с 3 перегородками, размером 5,07– 40,5 х2,53–6,76 мк; всходы часто загнивают и погибают.

- фузариоз– *Fusarium solani* (Mart.) Appel et Wr. (1).

б) язвы или пятна буро-коричневые с темно-бурым ободками грязно-серым налетом спороношения; конидии бесцветные, обратнобулавовидные или цилиндрические, суженные к вершине, тупоконечные 30,42–86,19х5,07–6,70 мк с 1 – 7 перегородками.

- церкоспороз – *Cercospora sojae* Нага (2).

в) пятна хлоротичные, на обратной стороне листанежно-, светло-серый быстро исчезающий налет спороношения; конидии одноклеточные, округлые светло-серые или почти бесцветные 17,7–28,9х15,2–20,3 мк; семядоли желтеют и опадают.

- пероноспороз – *Peronospora manshurica* (Naum.)Syd.(3).

г) пятна темно-пурпурные, сморщенные с серовато-белым налетом спороношения; конидии бесцветные удлинённые, слабоизогнутые, у основания тупые, на вершине заостренные 38,8–445х1,3–6,1 мк, с 2–49 перегородками.

- пурпурный церкоспороз *C. kikuchii* T. Matsu. etTomoyasu(4).

3 (2). Язвы или пятна с пикнидами.

а) язвы или пятна буровато-коричневые с хорошо заметными концентрическими кругами пикнид; иногда концентричность может отсутствовать; пикноспоры бесцветные, цилиндрические с закругленными краями, с одной поперечной перегородкой и перетяжкой у основания 5,2–8,7х3,0–4,5 мк.

- аскохитоз – *Ascochyta sojaecola* Abramoff.

б) светло-коричневые, сухие с валикообразными наплывами ткани и поверхностными темно-бурыми шаровидными пикнидами;

споры бесцветные, нитевидные изогнутые с 1–4 перегородками, размером 31,5–49,0 x 1,75–2,50 мк; семядоли засыхают и опадают.

- септориоз – *Septoria glycines* Hemmi (6).

4 (1). Поражены взрослые растения.

5 (10). Поражены листья.

6 (7). На листьях пятна с налетом.

а) пятна округлые от 2 до 7 мм в диаметре, белесовато-серые, с резко выраженным коричневым ободком и грязновато-серым слабобархатистым налетом спороношения гриба с нижней стороны листа. При сильном поражении пятна сливаются, подсыхают и продырявливаются; листья, при этом разрываются, засыхают и опадают. Конидии бесцветные обратнобулавовидные или цилиндрические, суженные к вершине, тупоконечные; на простых листьях 25,28–76,14x5,64–8,46 мк с 2–9 перегородками; на сложных – 116,61x7,65–10,14 мк с 2–7 перегородками.

- церкоспороз (2).

б) пятна неправильно округлые, от 3 до 15 мм в диаметре, бледно-коричневые, с фиолетово-красным ободком серовато-белым налетом спороношения гриба с нижней стороны листа.

- пурпурный церкоспороз (4).

в) пятна сквозные, вначале хлоротичные, позднее буреющие, угловатые, неправильно округлые расплывчатые с серовато-фиолетовым паутинистым или войлочным налетом спороношения с нижней стороны листьев; конидии одноклеточные, округлые, светло-серые, размером 17,7–28,9x15,2–20,3 мк

- пероноспороз (3).

7 (6). На листьях пятна с пикнидами.

8 (9). Пятна крупные, округлые или овальные.

а) пятна светло-коричневые с резко выраженным темно-бурым ободком, 2–10 мм в диаметре, располагающиеся в любой части листа, в том числе и по жилкам; позднее центральная часть пятен выкрашивается, остается лишь темно-бурое окаймление; пикниды 155–224 мк в диаметре, слабопогруженные в ткань листа, располагаются концентрическими кругами или же беспорядочно; пикноспоры 3,5–7,0x3,0–3,5 мк.

- аскохитоз (5).

б) пятна от 7 до 50 мм в диаметре, светло-коричневые с узкой темно-бурой каймой; ткань в центральной части пятен утончается;

и разрывается; пикниды мелкие, слабопогруженные в ткань 70,5–129,0 мк в диаметре; споры одноклеточные, овально-цилиндрические, бесцветные, часто с капельками жира, 4,70–7,05x2,35–3,52 мк.

- филлостиктоз – *Phyllosticta sojaecola* Massal. (7).

9 (8). Пятна мелкие угловатые, сквозные, желтоватые, без ободка, вначале одиночные, затем сливаются в ржаво-бурые участки и к концу вегетационного периода становятся темно-бурыми; на простых листьях пятна более крупные, 3–5 мм в диаметре; на сложных – пятнистость несколько меньше и не превышает обычно 1–3 мм; пикниды крупные, шаровидные 60–70 мк в диаметре, споры 27,75–55,50x1,7–2,0 мк; листья желтеют и опадают.

- септориоз (6).

10 (5). Поражены другие органы.

11 (16). Поражены стебли.

12 (15). На стеблях созревающих растений пикниды или подушечки.

13 (14). На стеблях пикниды.

а) пикниды располагаются беспорядочно или концентрическими кругами различной величины белесых участках отмирающей ткани; диаметр пикнид 103,0–206,0 мк; пикноспоры двуклеточные, бесцветные, 7,60–10,14x3,38–4,04 мк.

- аскохитоз (5).

б) пикниды располагаются рядами, шаровидной формы, погруженные в ткань, размером 112–542x98–385 мк; споры бесцветные, одноклеточные, обычно с 2–4 каплями жира, 4,9–9,8x1,8–3,2 мк или бесцветные нитевидные, 14,1–35,1x1,2–1,7 мк. Перитеции сферические, погруженные в строму, 148–282x185–346 мк. Сумки удлиненные, булавовидные, 8-споровые, размером 37,2–50,2x7,2–12,2 мк. Аскоспоры бесцветные, удлиненно-эллиптические с одной перегородкой, 9,2–13,5x3,3–5,6 мк.

- ожог стеблей – *Diaporthe phaseolorum* (Cke.EtEll.) Sacc.var. *sojae* (Lehman) Wehm. (*Phomopsis sojae* Lehman) (8).

14 (13). На стеблях рыхлые черные подушечки со щетинками, которые образуются на буроватых, позже – белесовато-серых участках отмирающей ткани; конидии слабоизогнутые, суженные к краям, 15,21–25,35x3,38–5,07 мк.

- антракноз—*Colletotrichum truncatum* (Schw.)Andrus et W.D. Moore (9).

15(12). На стеблях пятна или язвы.

а) пятна вытянутые в длину, фиолетово-красные, позднее — темнеющие, с сероватым центром и коричневым ободком; на пятнах слабозаметный грязновато-серый налет; конидии бесцветные обратно-булавовидные или цилиндрические, 30,42–81,12x5,07–10,14 мкс 2–8 перегородками.

- церкоспороз (2).

б) пятна красновато-коричневые с темно-фиолетовым ободком, часто охватывают стебли; последние в местах поражений часто сгибаются и переламываются.

- пурпурный церкоспороз (4).

в) пятна или язвы бурые вдавленные, опоясывают стебель, растения увядают и засыхают. Листья засыхают, но не опадают. Плодовые тела (перитеции) образуются только зимой. Перитеции углистые, 120–370 мк в диаметре. Сумки удлинено-цилиндрические, 23–28x7–12 мк. Аскоспоры двуклеточные, эллипсоидальные с закругленными концами, 8–12x46 мк.

- рак стеблей. *D. phaseolorum* (Cke. et Ell.) Sacc.var. *batatatis* (Harter et Field) Wehm. (10).

16(11). Поражены другие органы.

17(18). Поражено основание стебля или все растение.

а) корни и основание стебля становятся буро-коричневыми и загнивают; листья темнеют, засыхают и опадают; растения увядают и легко выдергиваются из почвы

- корневая гниль — *F. solani* (1).

б) основание стеблей становится темно-коричневым или черным, листья поникают, засыхают и опадают; растения увядают; на отмершей ткани стеблей образуется белый ватообразный налет и оранжевые подушечки спороношения гриба, состоящего из многочисленных серповидных конидий, размером 34–51x3,5–5,0 мк; заболевание развивается очагами.

-фузариозное увядание — *F. oxysporum* Schlecht. (11).

в) на прикорневой части стебля вначале появляются удлиненные буровато-пурпурные пятна; позднее они темнеют, сливаются и окольцовывают стебли; ткань в местах поражений растрескивается, боковые корни отмирают; растения увядают. На поражен-

ной ткани развивается белый, позднее розовеющий налет, состоящий из мелких округлых конидий, образующихся в многочисленных слизистых головках; размеры конидий 3,38–7,60x1,69–2,53 мк.

- трахеомикоз – *Gliocladium roseum* Bain (12).

г) стебли буреют, загнивают, покрываются сероватым налетом спороношения, растения увядают и погибают. Наблюдается потемнение сосудостебля. Листья становятся хлоротичными и разрываются. Зооспорангии яйцевидные или эллиптические, 23,3–88,8x16,6–51,8 мк в диаметре, ооспоры округлые, размером 19,2–38,3 мк с оболочкой 1,3–3,3 мк.

- фитофтороз – *Phytophthora sojae* Kaufmann et Gerdemann (13).

д) стебли буреют, загнивают и покрываются белым плотным ватообразным налетом; позднее пораженные части стеблей обесцвечиваются, а на поверхности и внутри их образуются различной величины и формы черные с белой сердцевинной склероции; стебли легко расщепляются на продольные полосы, теряют прочность и надламываются. Растения увядают и погибают.

- склеротиниоз – *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) dBy. (14).

18 (17). Поражены бобы и семена.

19 (26). Поражены бобы.

20 (25). На бобах пятна.

21 (22). На пятнах налет.

а) пятна округлые, 2–5 мм в диаметре, белесовато-серые с резко выраженным коричневым ободком; перед созреванием бобов центральная часть пятен темнеет и становится серовато-черной; налет грязновато-серый, очень слабовыраженный; конидии бесцветные, обратно-булавовидные или цилиндрические, суженные к концам, тупоконечные, 25,35–86,19 x 5,07–10,14 мк, с 1–11 перегородками.

- церкоспороз (2).

б) пятна неправильно округлой формы, до 1 см в диаметре, вначале красновато-пурпурные, позднее – пурпурно-красные .

- пурпурный церкоспороз (4).

22 (21). На пятнах пикниды или подушечки.

23 (24). На пятнах пикниды.

а) пятна серовато-белесые, вызывающие обесцвечивание створок бобов; пикниды буро-черные, располагаются беспорядочно

или концентрическими кругами, 103–206 мк в диаметре; пикноспоры размером 5,25–10,50 x 2,62–5,25 мк.

- аскохитоз (5).

б) на отмирающей ткани створок бобов пикниды располагаются беспорядочно или линейными рядами.

- ожог бобов (8).

в) на бобах многочисленные буровато-коричневые выпуклые угловатые пятна, 0,5–2,0 мм в диаметре; пикниды, погруженные в ткань, и не заметны при внешнем осмотре пятен.

- септориоз (6).

24(23). На пятнах подушечки. Пятна неправильно округлые, бурые, гниющие. Подушечки черные, со щетинками; конидии бесцветные, слабоизогнутые, заостренные к краям 20,28–25,35 x 3,38–5,07 мк.

- антракноз (9).

25(20). На бобах налет.

а) налет белый или розовый, ватообразный, часто образуется оранжево-красный восковидный налет, состоящий из многочисленных серповидных конидий; бобы обесцвечиваются и загнивают.

- фузариоз. Виды рода *Fusarium* (15)

б) налет серовато-фиолетовый, войлочный, обильный внутри и малозаметный снаружи бобов; бобы не загнивают.

- пероноспороз (3).

в) налет сероватый, слабовыраженный; бобы загнивают.

- фитофтороз (13).

г) налет белый ватообразный, плотный, с образующимися позднее черными склероциями различной величины и формы.

- склеротиниоз (14).

д) налет черный бархатистый; конидиеносцы и конидии оливково-бурые; конидии обратно-булавовидные, размером 20,28–65,91 x 10,14–20,28 мк с 1–4 продольными и 2–7 поперечными перегородками.

- альтернариоз – *Alternaria tenuis* Fr (16).

26 (19). Поражены семена.

27(28). На семенах пятна.

а) пятна неправильно округлые, выпуклые или поверхностные, мелкие или крупные, серовато-коричневые или темно-коричневые с резким коричневым ободком или расплывчатыми

краями; на пятнах только во влажной камере образуется грязновато-серый налет спороношений, состоящих из буровато-оливковых конидиеносцев с густо переплетенному основания мицелием в виде клубочков и бесцветных обратно-булавовидных или цилиндрических конидий, размером 47,42–163,56 x 5,64–8,46 мк с 3–14 перегородками.

- церкоспороз (2).

б) пятна мелкие или крупные, светло- или темно-пурпурные, часто охватывающие всю поверхность семени; семенная кожура растрескивается продольными трещинами и становится шероховатой.

- пурпурный церкоспороз (4).

28 (27). На семенах налет.

29(30). Налет рыхлый состоящий из спороношения гриба.

а) налет белый или желтовато-рыжий, ватообразный; семена становятся щуплыми трухлявыми; при сильном поражении они загнивают и не прорастают. Конидии веретеновидно-серповидные, слабоизогнутые, с 0–5 перегородками размером 6,64–40,56 x 3,32–6,76 мк.

- фузариоз – *F. solani* (1).

б) налет розовато-лиловый, конидии слабоизогнутые, слабосуженные к концам с 0–5 перегородками, величиной 7,28–59,76 x 2,43–5,07 мк.

- фузариоз–*F. avenaceum* (Fr.) Sacc.(17).

в) налет беловато-желтый; конидии слабоизогнутые, веретеновидно-серповидные, постепенно суживающиеся к концам, преимущественно с 3 перегородками, размером 5,81–29,88 x 1,66–3,32 мк.

- фузариоз– *F. semitectum* Berk. Et Rav. (18).

г) налет белый, ватообразный, позднее образуются черные пикниды; семена щуплые, загнивают и не прорастают или дают всходы с пораженными семядолями.

- аскохитоз (5).

д) налет, образующийся на бурых расплывчатых пятнах, вначале белый, пышный, позднее – розоватый, уплотняющийся.

- вертицеллез (12).

е) налет черный, в виде рыхлых точковидных образований – подушечек со щетинками; конидии размером 20,28–25,35 x 3,38–5,07 мк.

- антракноз (9).

30 (29). Налет иной.

31 (34). Налет плотный.

32 (33). Налет белый в виде очагов; на семенах образуются различной величины и формы черные склероции.

- склеротиниоз (14).

33 (32). Налет в виде кремовой, легко соскабливаемой корочки, состоящей из ооспор гриба; ооспоры округлые, слабо-зеленоватые, 30,4–50,7 мк в диаметре; пораженные семена неотличаются по величине от здоровых.

- пероноспороз (3).

34 (31). Налет порошащий, светло- или ярко-окрашенный.

а) налет розовый в виде дерновинок; конидии бесцветные, грушевидные, неравнобокие, с одной поперечной перегородкой, величиной 12,67–19,22 x 7,60–10,14 мк.

- розовая плесень – *Trichothecium roseum* Fr. (19).

б) налет темный из-за обилия черных мелких головок, (спорангиев), в которых образуются округлые, слабоокрашенные в темный цвет споры 5,07–12,67 мк в диаметре.

- черная плесень – *Rhizopus nigricans* Ehr. (20).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диагностика болезней растений / Юннатский вестник на Амуре: сб. науч. тр. – Благовещенск: изд-во «Зея» № 3 – С. 35–37.
2. Заостровных В.И. Вредные организмы сои и система фито-санитарной оптимизации ее посевов / В.И. Заостровных, Л.К. Дубовицкая / Монография. Под ред. Чулкиной В.А. – Новосибирск, 2003. – 528 с.
3. Болезни и вредители сои на юге Дальнего Востока и меры борьбы с ними. Под ред. В.Г. Рейфман. – Владивосток 1971. – 183 с.
4. Liu S.T. Seed borne diseases of soybean // Bot. Bull. Acad. Sinica. – 1948.–Vol.2,¹ 1. – P. 69–80.
5. Адаптивные технологии в растениеводстве Амурской области: сб. научн. тр. ДальГАУ. – Благовещенск: ДальГАУ, 2013. – Вып. 9. – 84 с.
6. Дега Л.А. Вредители и болезни сои на Дальнем Востоке. Владивосток: Дальнаука, 2012. – 98 с.
7. Шкалик В. А. Защита растений от болезней / В. А. Шкалик, О.О. Белошапкина. М.: Колос С, 2003. – 255 с.
8. Дубовицкая Л.К. Корневая гниль сои в Приамурье и обоснование борьбы с ней.: Дис. канд. с.-х. наук., Благовещенск, 1986. – 194 с.
9. Простакова Ж.Г. Грибные болезни сои и меры борьбы с ними / Ж.Г. Простакова, А.И. Ганя; АН Молдавской ССР. – Киев: Штиинца, 1983. – 35 с.
10. Ускоренная оценка исходного материала сои на устойчивость корневым гнилям: Метод. рекомендации/ РАСХН. Сиб. отд-ние Дальневост. отд-ние ВНИИ сои. – Новосибирск, 1991. – 12 с.
11. Попкова К.В. Общая фитопатология. М.: ДРОФА – 2005. – 446 с.
12. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др. // Справочник. Под ред. В.Л. Билай. Киев, Наукова думка, 1982. – 550 с.

13. Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. – М.: Наука, 1968. – 266 с.
14. Котова В.В. Диагностика корневых гнилей зернобобовых культур (горох, вика) (методические рекомендации) / В.В. Котова, М.Ю. Степанова. – Ленинград. ВИЗР, 1979. – 28 с.
15. Корсаков Н.И. Изучение устойчивости сои к грибным болезням / Н.И. Корсаков, А.М. Овчинникова, В.М. Мизева. – Ленинград. ВИР, 1979. – 46 с.
16. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве / под ред. член-кор. Россельхозакадемии В.И. Долженко. – Санкт-Петербург: ВИЗР, 2009. – 378 с.
17. Гешеле Э. Э. Основы фитопатологической оценки в селекции. – М.: Колос, 1964. – 200 с.
18. Кирай З. Методы фитопатологии / З. Кирай, З. Клемент, Ф. Шоймоши, Й. Вереш / Под. ред. М.В. Горлинко. – М.: Колос, 1974. – 342 с.
19. Головин П.Н. Практикум по общей фитопатологии / П.Н. Головин, М.В. Арсеньева, А.Т. Тропова и др. – Санкт-Петербург: Лань, 2002. – С. 50–60.
20. Билай В.И. Фузариозы – Киев: Наукова думка, 1977. – 442 с.
21. Глотова Л.Е. Методические указания по диагностике и учету соевой цистообразующей нематоды. – М.: ВАСХНИЛ, 1982. – 14 с.
22. Кравцова Н.Н. Соевая нематода в Приамурье // Защита растений. – 1979. № 5. – С. 46–47.
23. Кожушко И.Б. Оценка коллекции сои на устойчивость к соевой цистообразующей нематоды: Сб. науч. тр. / ДальГАУ. Благовещенск, 2001. – Вып. 6. – С. 13–18.
24. Васильев Д.С. Комплексная система защиты посевов сои от сорняков, вредителей и болезней / Д.С. Васильев, О.И. Тихонов, Д.В. Подкина и др. – М.: Агропромиздат, 1987. – 48 с.

Учебное издание

*Иван Николаевич Новосадов,
Любовь Кондратьевна Дубовицкая,
Юлия Викторовна Положиёва*

ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ СОИ

*Учебное пособие
для обучающихся по агрономическим направлениям*

Лицензия ЛР 020427 от 25.04.1997 г.
Подписано к печати 09.01.2017 г. Формат 60×90/16.
Уч.-изд.л. – 2,8. Усл.-п.л. – 4,0.
Тираж 100 экз. Заказ 07.

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии
издательства Дальневосточного ГАУ
675005, г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86

